



(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 201302796 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：101111195

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 29 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P39/02 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2011/03/30

美國

61/469,207

(71)申請人：百靈佳殷格翰國際股份有限公司 (德國) BOEHRINGER INGELHEIM

INTERNATIONAL GMBH (DE)

德國

(72)發明人：凡 萊恩 瓊安 VAN RYN, JOANNE (CA)；賈納達 凱斯 CANADA, KEITH

(US)；寇本 羅伯 COPENHAVER, ROBERT (US)；郝爾 諾柏特 HAUEL,

NORBERT (DE)；利茲柏格 托比亞斯 LITZENBURGER, TOBIAS (DE)；薩可

克里斯多夫 羅納德 SARKO, CHRISTOPHER RONALD (US)；辛 山加亞 SINGH,

SANJAYA (US)；瓦特曼 亞莉莎 K WATERMAN, ALISA K. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：42 項 圖式數：11 共 145 頁

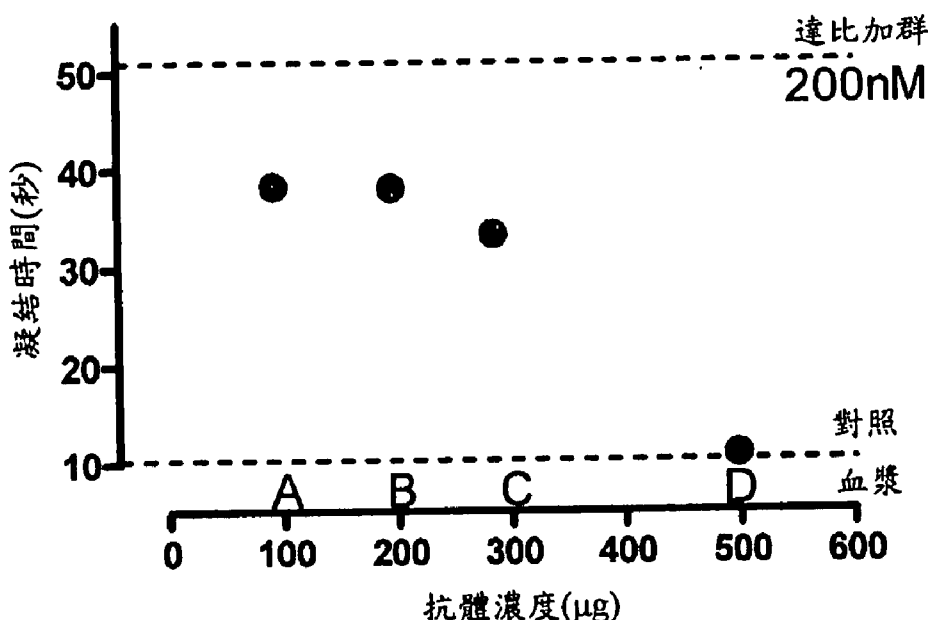
(54)名稱

抗凝血劑解毒劑

ANTICOAGULANT ANTIDOTES

(57)摘要

本發明係關於針對抗凝血劑，特定言之達比加群(dabigatran)之抗體分子及其作為此等抗凝血劑之解毒劑之用途。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201302796 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：101111195

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 29 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P39/02 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2011/03/30

美國

61/469,207

(71)申請人：百靈佳殷格翰國際股份有限公司 (德國) BOEHRINGER INGELHEIM
INTERNATIONAL GMBH (DE)

德國

(72)發明人：凡 萊恩 瓊安 VAN RYN, JOANNE (CA)；賈納達 凱斯 CANADA, KEITH
(US)；寇本 羅伯 COPENHAVER, ROBERT (US)；郝爾 諾柏特 HAUEL,
NORBERT (DE)；利茲柏格 托比亞斯 LITZENBURGER, TOBIAS (DE)；薩可
克里斯多夫 羅納德 SARKO, CHRISTOPHER RONALD (US)；辛 山加亞 SINGH,
SANJAYA (US)；瓦特曼 亞莉莎 K WATERMAN, ALISA K. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：42 項 圖式數：11 共 145 頁

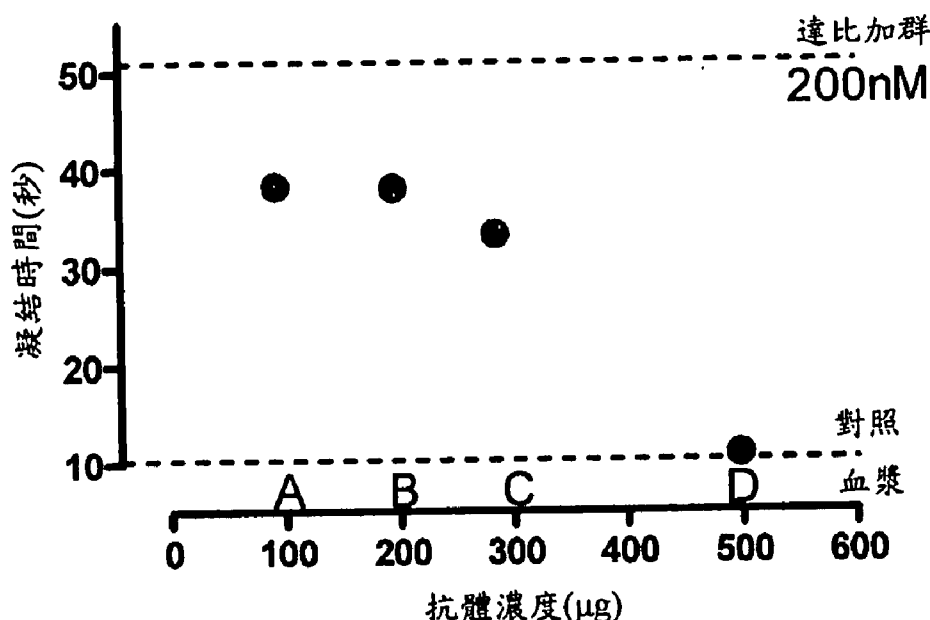
(54)名稱

抗凝血劑解毒劑

ANTICOAGULANT ANTIDOTES

(57)摘要

本發明係關於針對抗凝血劑，特定言之達比加群(dabigatran)之抗體分子及其作為此等抗凝血劑之解毒劑之用途。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

101111195

※ 申請日：

※IPC 分類：C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 39/02 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗凝血劑解毒劑

ANTICOAGULANT ANTIDOTES

二、中文發明摘要：

本發明係關於針對抗凝血劑，特定言之達比加群 (dabigatran) 之抗體分子及其作為此等抗凝血劑之解毒劑之用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to antibody molecules against anticoagulants, in particular dabigatran, and their use as antidotes of such anticoagulants.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於醫藥領域，特定言之係關於抗凝血劑療法領域。

【先前技術】

抗凝血劑為阻止凝血之物質；亦即其阻止血液凝結。抗凝血劑在人類療法中廣泛用作用於血栓性病徵之藥物，例如初級及二級預防易患該等病徵者之深靜脈血栓(deep vein thrombosis)、肺栓塞(pulmonary embolism)、心肌梗塞(myocardial infarction)及中風。

一類重要經口抗凝血劑藉由拮抗維生素K之效應而起作用，例如包括華法林(warfarin)之香豆素(coumarin)。第二類化合物經由諸如抗凝血酶III (antithrombin III)或肝素輔因子II (heparin cofactor II)之輔因子間接抑制凝血。其包括若干低分子量肝素產品，該等產品經由抗凝血酶III主要催化對因子Xa(及在較低程度上對凝血酶(thrombin))之抑制(貝米肝素(bemiparin)、舍托肝素(certoparin)、達肝素(dalteparin)、依諾肝素(enoxaparin)、那屈肝素(nadroparin)、帕肝素(panaparin)、瑞肝素(reviparin)、亭紫肝素(tinzaparin))，較小鏈寡糖(磺達肝素(fondaparinux)、艾卓肝素(idraparin))經由抗凝血酶III僅抑制因子Xa。類肝素(Heparinoid)(達那肝素(danaparoid)、舒洛地特(sulodexide)、硫酸皮膚素(dermatan sulfate))經由該兩種輔因子起作用且抑制因子Xa與凝血酶兩者。第三種類別代表直接凝血抑制

劑。直接因子Xa抑制劑包括阿皮沙班(apixaban)、依度沙班(edoxaban)、奧他米沙班(otamixaban)、瑞伐沙班(rivaroxaban)，且直接凝血酶抑制劑包括二價水蛭素(hirudin)(比伐盧定(bivalirudin)、來匹盧定(lepirudin)、地西盧定(desirudin))及單價化合物阿加曲班(argatroban)及達比加群(dabigatran)。

因為血液凝結為一種阻止出血之生物機制，所以抗凝血劑療法之副作用可為不當出血事件。因此，希望提供一種能夠在此等抗凝血劑相關出血事件發生時對其進行阻止之解毒劑(Zikria及Ansell, Current Opinion in Hematology 2009, 16(5): 347-356)。一種達成此目的之方式為中和在投藥後存在於患者體內之抗凝血劑化合物的活性。

當前可用之抗凝血劑解毒劑為魚精蛋白(protamine)(用於中和肝素)及用於中和維生素K拮抗劑(如華法林)之維生素K。新鮮冷凍血漿及重組因子VIIa亦已在正進行低分子量肝素治療之罹患重度創傷或嚴重出血之患者中用作非特异性解毒劑(Lauritzen, B.等人, Blood, 2005, 607A-608A.)。亦報導魚精蛋白片段(美國專利第6,624,141號)及小合成肽(美國專利第6,200,955號)作為肝素或低分子量肝素解毒劑；及凝血酶突變蛋白(美國專利第6,060,300號)作為凝血酶抑制劑之解毒劑。凝血酶原(Prothrombin)中間物及衍生物已報導為水蛭素及合成凝血酶抑制劑之解毒劑(美國專利第5,817,309號及第6,086,871號)。對於直接因子Xa抑制劑，已提出非活性因子Xa類似物作為解毒劑(WO

2009042962)。此外，重組因子VIIa已用於逆轉間接抗凝血酶III依賴性因子Xa抑制劑(諸如磺達肝素及艾卓肝素)之作用(Bijsterveld, NR等人, Circulation, 2002, 106: 2550-2554; Bijsterveld, NR等人, British J. of Haematology, 2004 (124): 653-658)。對抗凝血劑逆轉之方法之評述提供於Schulman及Bijsterveld, Transfusion Medicine Reviews 2007, 21(1): 37-48中。

國際專利申請案WO 2011089183揭示可結合及中和達比加群之活性之抗體。

需要提供用於抗凝血劑療法之經改良解毒劑，且特定言之需要提供迄今尚未揭示特異性解毒劑之直接凝血酶抑制劑(如達比加群)的解毒劑。

【發明內容】

在一個態樣中，本發明係關於一種能夠中和抗凝血劑之活性之抗體分子。

在另一態樣中，抗體分子對抗凝血劑具有結合特異性。

在另一態樣中，抗凝血劑為直接凝血酶抑制劑、因子Xa抑制劑或維生素K拮抗劑。

在另一態樣中，抗凝血劑為達比加群、阿加曲班、美拉加群(melagatran)、希美加群(ximelagatran)、水蛭素、比伐盧定、來匹盧定、地西盧定、阿皮沙班、奧他米沙班、依度沙班、瑞伐沙班、去纖維蛋白多核苷酸(defibrotide)、雷馬曲班(ramatroban)、抗凝血酶III或除栓素 α (drotrecogin alpha)。

在另一態樣中，本發明係關於一種針對達比加群、達比加群酯(dabigatran exetilate)及/或達比加群之O-醯基葡萄糖苷酸之抗體分子。

在另一態樣中，抗體分子為多株抗體、單株抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、抗體之片段(特定言之Fab、Fab'或F(ab')₂片段)、單鏈抗體(特定言之單鏈可變片段(scFv))、域抗體、奈米抗體、雙功能抗體或DARPin。

在另一態樣中，本發明係關於如上所述之抗體分子，其係用於醫藥中。

在另一態樣中，本發明係關於如上所述之抗體分子，其係用於療法中或預防抗凝血劑療法之副作用。

在另一態樣中，副作用為出血事件。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療或預防抗凝血劑療法之副作用之方法，其包含向有需要之患者投與有效量之如上所述之抗體分子。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含所述抗體分子以及容器及標籤之套組。

【實施方式】

在一個態樣中，本發明係關於一種能夠中和抗凝血劑之活性之抗體分子。

抗體(亦稱為免疫球蛋白，縮寫為Ig)為可見於脊椎動物之血液或其他體液中之 γ 球蛋白蛋白質，且由免疫系統用於鑑別及中和外來物體，諸如細菌及病毒。其通常由基本結構單元-各自具有兩個較大重鏈及兩個較小輕鏈-構成以

形成例如具有一個單元之單體、具有兩個單元之二聚體或具有五個單元之五聚體。抗體可藉由非共價相互作用結合稱為抗原之其他分子或結構。此結合在抗體將僅以高親和力結合特定結構之意義上具有特異性。抗原中由抗體識別之獨特部分稱為抗原決定基或抗原決定子。結合抗原決定基之抗體部分有時稱為互補位且存在於抗體之所謂可變域或可變區(Fv)中。可變域包含由構架區(FR)間隔開之三個所謂互補決定區(CDR)。

在本發明之上下文中，對CDR之提及係基於Chothia (Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917)以及Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller及H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983))之定義。

此項技術已另外開發抗體且使其成為醫藥及技術中之多功能工具。因此，在本發明之上下文中，術語「抗體分子」或「抗體」(在本文中以同義使用)不僅包括如在自然界中可見之包含例如兩個輕鏈及兩個重鏈或如駱駝科物種中僅包含兩個重鏈的抗體，而且此外亦涵蓋包含至少一個對抗原具有結合特異性且與免疫球蛋白之可變域具有結構類似性之互補位的所有分子。

因此，本發明之抗體分子可為多株抗體、單株抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、抗體之片段(特定言之Fv、Fab、Fab'或F(ab')₂片段)、單鏈抗體(特定言之單鏈可變片段(scFv))、小模組免疫醫藥(SMIP)、域抗體、奈米抗

體、雙功能抗體。

多株抗體表示具有不同胺基酸序列之抗體分子之集合且可在藉由此項技術中熟知之方法用抗原免疫後自脊椎動物之血液獲得。

單株抗體(mAb或moAb)為胺基酸序列相同之單特異性抗體。其可藉由融合瘤技術自代表產生特定抗體之B細胞與骨髓瘤(B細胞癌症)細胞融合物之純系的雜交細胞株(稱為融合瘤)產生(Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.)。或者，單株抗體可藉由於宿主細胞中重組表現產生(Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (1997年5月)。「Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells.」*J Immunol Methods* 204 (1): 77-87；亦參見下文)。

對於在人類中應用，通常需要降低最初來源於其他物種(如小鼠)之抗體之免疫原性。此可藉由構築嵌合抗體或藉由稱為「人類化」之方法進行。在此情形下，「嵌合抗體」應理解為包含來源於一個物種(例如小鼠)之序列部分(例如可變域)融合於來源於不同物種(例如人類)之序列部分(例如恆定域)的抗體。「人類化抗體」為包含最初來源於非人類物種之可變域之抗體，其中某些胺基酸已進行突變以使彼可變域之總體序列更密切類似於人類可變域之序列。抗體之嵌合及人類化之方法在此項技術中為熟知的

(Billetta R, Lobuglio AF. 「 Chimeric antibodies 」 . Int Rev Immunol. 1993;10(2-3):165-76 ; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) 。 「 Reshaping human antibodies for therapy 」 . *Nature*: 332:323.) 。

此外，已開發基於來源於人類基因組之序列產生抗體之技術，例如藉由噬菌體呈現或使用轉殖基因動物(WO 90/05144 ; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths及 G. Winter (1991) 「 By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. 」 J.Mol.Biol., 222, 581-597 ; Knappik 等人， J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000 ; S. Carmen及 L. Jermutus, 「 Concepts in antibody phage display 」 . Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2):189-203 ; Lonberg N, Huszar D. 「 Human antibodies from transgenic mice 」 . Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93 ; Brüggemann M, Taussig MJ. 「 Production of human antibody repertoires in transgenic mice 」 . Curr Opin Biotechnol. 1997年8月 ; 8(4):455-8.) 。 在本發明之上下文中，此等抗體為「人類抗體」。

本發明之抗體分子亦包括免疫球蛋白之保留抗原結合性質之片段，如 Fab、Fab'或F(ab')₂ 片段。此等片段可藉由例如藉由蛋白水解消化使免疫球蛋白斷裂，或藉由重組表現此等片段來獲得。舉例而言，免疫球蛋白消化可藉助於常規技術達成，例如使用木瓜蛋白酶(papain)或胃蛋白酶

(pepsin)(WO 94/29348)或內切蛋白酶(endoproteinase) Lys-C (Kleemann等人, Anal. Chem. 80, 2001-2009, 2008)。抗體之木瓜蛋白酶或Lys-C消化通常產生所謂Fab片段之各自具有單一抗原結合位點之兩個相同抗原結合片段、及殘餘Fc片段。胃蛋白酶處理會產生F(ab')₂。以下更詳細概述藉由於宿主細胞中重組表現來產生Fab分子之方法。

已開發許多將免疫球蛋白之可變域或來源於此等可變域之分子安置於不同分子情形中的技術。其亦應視為本發明之「抗體分子」。一般而言，相較於免疫球蛋白，此等抗體分子之尺寸較小，且可包含單一胺基酸鏈或由若干胺基酸鏈構成。舉例而言，單鏈可變片段(scFv)為免疫球蛋白之重鏈及輕鏈可變區以短連接子(通常為絲胺酸(S)或甘胺酸(G))連接在一起之融合物(WO 88/01649；WO 91/17271；Huston等人；International Reviews of Immunology，第10卷，1993，195-217)。「單域抗體」或「奈米抗體」在單一Ig樣域中具有抗原結合位點(WO 94/04678；WO 03/050531；Ward等人，Nature. 1989年10月12;341(6242):544-6；Revets等人，Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24, 2005)。對相同或不同抗原具有結合特異性之一或多個單域抗體可連接在一起。雙功能抗體為由包含兩個可變域之兩個胺基酸鏈組成之二價抗體分子(WO 94/13804；Holliger等人，Proc Natl Acad Sci U S A. 1993年7月15;90(14):6444-8)。抗體樣分子之其他實例為免疫球蛋白超家族抗體(IgSF；Srinivasan及Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2):

185-96)。一種不同概念產生所謂小模組免疫醫藥(SMIP)，其包含Fv域連接於單鏈鉸鏈及缺乏恆定域CH1之效應域(WO 02/056910)。

在另一態樣中，本發明之抗體分子甚至可與免疫球蛋白可變域僅具有疏遠結構相關性或完全不具有此相關性，只要其具有與免疫球蛋白可變域類似之結合特異性及親和力即可。此等非免疫球蛋白「抗體模擬物」，有時稱為「骨架蛋白質」，可基於蛋白質A、脂質運載蛋白、纖維結合蛋白域、錨蛋白共同重複域及硫氧還蛋白之基因(Skerra, *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18(4): 295-304)。在本發明之上下文中，一較佳實施例為經設計之錨蛋白重複蛋白(DARPin；Steiner等人，*J Mol Biol.* 2008年10月24;382(5): 1211-27；Stumpp MT, Amstutz P. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007年3月；10(2):153-9)。

抗體分子可融合(如融合蛋白)或以其他方式連接(藉由共價或非共價鍵)於對抗體分子之性質具有所要影響之其他分子實體。舉例而言，可能需要改良抗體分子之藥物動力學性質，例如在諸如血液之體液中之穩定性，特定言之在單鏈抗體或域抗體之情況下。就此而言已開發許多技術來特定言之延長此等抗體分子在循環中之半衰期，該等技術諸如聚乙二醇化(WO 98/25971；WO 98/48837；WO 2004081026)、使抗體分子融合或以其他方式共價連接於對血清蛋白質(如白蛋白)具有親和力之另一抗體分子(WO 2004041865；WO 2004003019)、或使抗體分子表現為與血清蛋白質(如

白蛋白或轉鐵蛋白(transferrin))之全部或一部分之融合蛋白(WO 01/79258)。

在另一態樣中，抗體分子對抗凝血劑具有結合特異性。「結合特異性」意謂抗體分子對抗凝血劑之結合親和力顯著高於對結構上不相關之分子之結合親和力。

親和力為抗體分子上單一抗原結合位點與單一抗原決定基之間的相互作用。其由締合常數 $K_A = k_{\text{締合}} / k_{\text{解離}}$ 或解離常數 $K_D = k_{\text{解離}} / k_{\text{締合}}$ 表示。

在本發明之一個態樣中，如例如藉由表面電漿子共振分析(Malmqvist M., 「Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.」, Curr Opin Immunol. 1993年4月；5(2):282-6.)所測定，抗體結合抗凝血劑之親和力的 K_D 值在0.1 pM至100 μ M、較佳1 pM至100 μ M、較佳1 pM至1 μ M之範圍內。抗體親和力亦可使用動力學排除分析(KinExA)技術量測(Darling, R.J.及Brault P-A., 「Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions.」 ASSAY and Drug Development Technologies. 2004年12月2(6): 647-657)。

抗體分子之結合親和力可藉由稱為親和力成熟之方法增強(Marks等人，1992, Biotechnology 10:779-783；Barbas等人，1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813；Shier等人，1995, Gene 169:147-155)。因此，親和力成熟抗體亦包括在本發明中。

在本發明之另一態樣中，抗體分子能夠中和抗凝血劑之活性。亦即在結合抗體分子時，抗凝血劑不再能夠施加其抗凝血劑活性，或以顯著降低之量值施加此活性。較佳地，在抗體結合時，抗凝血劑活性降低至少2倍、5倍、10倍或100倍，如在適於所論述抗凝血劑之活性分析，特定言之凝血酶敏感性凝結分析，諸如蛇靜脈酶(ecarin)凝結時間或凝血酶凝結時間分析中所測定(H. Bounameaux, Marbet GA, Lammle B 等人「Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III」. American Journal of Clinical Pathology 1980 74(1): 68-72)。

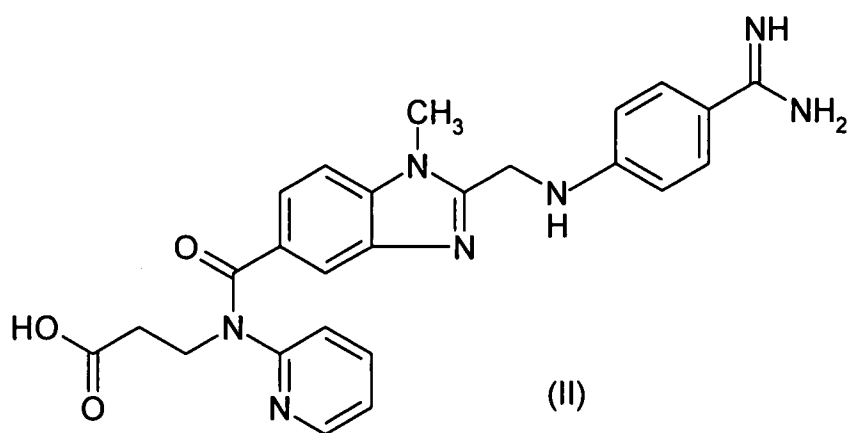
對於製造本發明之抗體分子，熟練技術人員可自此項技術中熟知之多種方法進行選擇(Norderhaug 等人，J Immunol Methods 1997, 204 (1): 77-87；Kipriyanow及Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39-60, 2004；Shukla等人，2007, J. Chromatography B, 848(1): 28-39)。

如上文所概述，抗凝血劑在此項技術中為熟知的。在本發明之另一態樣中，抗凝血劑為直接凝血酶抑制劑、因子Xa抑制劑或維生素K拮抗劑。維生素K拮抗劑之實例為香豆素，其包括華法林。間接主要因子Xa抑制劑之實例為經由活化抗凝血酶III起作用之肝素物質群組，包括若干低分子量肝素產品(貝米肝素、舍托肝素、達肝素、依諾肝素、那屈肝素、帕肝素、瑞肝素、亭紮肝素)、某些寡醣

(磺達肝素、艾卓肝素)、類肝素(達那肝素、舒洛地特、硫酸皮膚素)；及直接因子Xa抑制劑(阿皮沙班、奧他米沙班、瑞伐沙班)。凝血酶抑制劑之實例包括二價水蛭素(比伐盧定、來匹盧定、地西盧定)及單價化合物阿加曲班及達比加群。

因此，在另一態樣中，抗凝血劑為達比加群、阿加曲班、美拉加群、希美加群、水蛭素、比伐盧定、來匹盧定、地西盧定、阿皮沙班、依度沙班、奧他米沙班、瑞伐沙班、去纖維蛋白多核苷酸、雷馬曲班、抗凝血酶III或除栓素 α 。

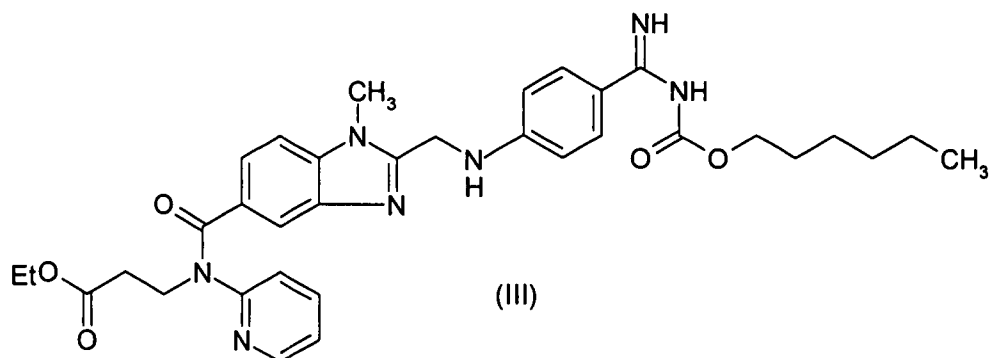
在本發明之上下文中，一較佳抗凝血劑為具有化學式(II)之達比加群(CAS 211914-51-1，*N*-[2-(4-甲脒基苯胺基甲基)-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-5-基羰基]-*N*-(2-吡啶基)- β -丙胺酸)：



達比加群係以名稱1-甲基-2-[*N*-(4-甲脒基苯基)-胺甲基]-苯并咪唑-5-基-甲酸-*N*-(2-吡啶基)-*N*-(2-羥基羰基乙基)-醯胺自WO 98/37075得知，該文獻揭示具有凝血酶抑制作用

及延長凝血酶時間之作用的化合物。亦參見Hauel等人J Med Chem 2002, 45 (9): 1757-66。

達比加群係以式(III)之前藥形式施用：



式 III 化合物 (稱為達比加群酯 (dabigatran etexilate), CAS 211915-06-9; 3-[(2-{[4-(己氧基羰基胺基-亞胺基-甲基)-苯胺基]-甲基}-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-5-羰基)-吡啶-2-基-胺基]-丙酸乙酯) 在進入身體之後轉化成活性化合物 (II)。達比加群酯之一較佳多晶型物為達比加群酯甲磺酸鹽。

達比加群之主要適應症為手術後預防深靜脈血栓、治療已形成之深靜脈血栓及預防患有心房纖維性顫動 (atrial fibrillation) 之患者之中風 (Eriksson 等人, Lancet 2007, 370 (9591): 949-56; Schulman S 等人, N Engl J Med 2009, 361 (24): 2342-52; Connolly S 等人, N Engl J Med 2009, 361 (12): 1139-51; Wallentin 等人, Lancet 2010, 376 (9745): 975-983)。

在人體中，羧酸酯部分之葡萄糖醛酸苷化 (glucuronidation) 為達比加群之主要人類代謝路徑 (Ebner 等

人，Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75)。其導致形成1-O-醯基葡萄糖苷酸(β 變旋異構體)。除少量水解成糖苷配基之外，1-O-醯基葡萄糖苷酸亦可在水溶液中經歷非酶促醯基轉移，從而導致形成2-O-醯基葡萄糖苷酸、3-O-醯基葡萄糖苷酸及4-O-醯基葡萄糖苷酸。用經純化之1-O-醯基葡萄糖苷酸及其異構重排產物進行之實驗揭示相較於達比加群，等效延長活化部分凝血活酶時間。

在本發明之另一態樣中，抗體分子結合達比加群與達比加群酯兩者。

在本發明之另一態樣中，抗體分子結合達比加群與達比加群之O-醯基葡萄糖苷酸(特定言之達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸)兩者。

在本發明之另一態樣中，抗體分子此外結合達比加群之2-O-醯基葡萄糖苷酸、3-O-醯基葡萄糖苷酸及4-O-醯基葡萄糖苷酸。

在本發明之另一態樣中，抗體分子能夠中和達比加群及達比加群之O-醯基葡萄糖苷酸(特定言之達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸)的活性。

在下文中，除非另外指示，否則提及SEQ ID No.係指表1之序列。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有選自由SEQ ID NO: 1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61及67組成之群之CDR1、選自由SEQ ID NO: 2、8、14、20、26、32、38、44、50、

56、62及68組成之群之CDR2及選自由SEQ ID NO: 3、9、15、21、27、33、39、45、51、57及63組成之群之CDR3的重鏈可變域、以及具有選自由SEQ ID NO: 4、10、16、22、28、34、40、46、52、58及64組成之群之CDR1、選自由SEQ ID NO: 5、11、17、23、29、35、41、47、53、59及65組成之群之CDR2及選自由SEQ ID NO: 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66及69組成之群之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 1之CDR1、SEQ ID NO: 2之CDR2及SEQ ID NO: 3之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 4之CDR1、SEQ ID NO: 5之CDR2及SEQ ID NO: 6之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 7之CDR1、SEQ ID NO: 8之CDR2及SEQ ID NO: 9之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 10之CDR1、SEQ ID NO: 11之CDR2及SEQ ID NO: 12之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 13之CDR1、SEQ ID NO: 14之CDR2及SEQ ID NO: 15之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 16之CDR1、SEQ ID NO: 17之CDR2及SEQ ID NO: 18之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合

特異性且包含具有SEQ ID NO: 19之CDR1、SEQ ID NO: 20之CDR2及SEQ ID NO: 21之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 22之CDR1、SEQ ID NO: 23之CDR2及SEQ ID NO: 24之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 25之CDR1、SEQ ID NO: 26之CDR2及SEQ ID NO: 27之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 28之CDR1、SEQ ID NO: 29之CDR2及SEQ ID NO: 30之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 31之CDR1、SEQ ID NO: 32之CDR2及SEQ ID NO: 33之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 34之CDR1、SEQ ID NO: 35之CDR2及SEQ ID NO: 36之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 37之CDR1、SEQ ID NO: 38之CDR2及SEQ ID NO: 39之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 40之CDR1、SEQ ID NO: 41之CDR2及SEQ ID NO: 42之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 43之CDR1、SEQ ID NO: 44之CDR2及SEQ ID NO: 45之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 46之CDR1、SEQ ID NO: 47之CDR2及SEQ ID NO: 48之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 49之CDR1、SEQ ID NO: 50之CDR2及SEQ ID NO: 51之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 52之CDR1、SEQ ID NO: 53之CDR2及SEQ ID NO: 54之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 55之CDR1、SEQ ID NO: 56之CDR2及SEQ ID NO: 57之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 58之CDR1、SEQ ID NO: 59之CDR2及SEQ ID NO: 60之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 61之CDR1、SEQ ID NO: 62之CDR2及SEQ ID NO: 63之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 64之CDR1、SEQ ID NO: 65之CDR2及SEQ ID NO: 66之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子對達比加群具有結合特異性且包含具有SEQ ID NO: 67之CDR1、SEQ ID NO: 68之CDR2及SEQ ID NO: 9之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 64之CDR1、SEQ ID NO: 65之CDR2及SEQ ID NO: 69之CDR3的輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 70之重鏈可變域及SEQ ID No: 71之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 72之重鏈可變域及SEQ ID No: 73之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 74之重鏈可變域及SEQ ID No: 75之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 76之重鏈可變域及SEQ ID No: 77之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 78之重鏈可變域及SEQ ID No: 79之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 80之重鏈可變域及SEQ ID No: 81之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 82之重鏈可變域及SEQ ID No: 83之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 84之重鏈可變域及SEQ ID No: 85之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 86之重鏈可變域及SEQ ID No: 87之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 88之重鏈可變域及SEQ ID No: 89之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 90之重鏈可變域及SEQ ID No: 91之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 92之重鏈可變域及SEQ ID No: 93之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 92之重鏈可變域及SEQ ID No: 94之輕鏈可變域。

在本發明之另一態樣中，任一上述輕鏈可變域融合於SEQ ID NO: 97之恆定域。

在本發明之另一態樣中，任一上述重鏈可變域融合於 SEQ ID NO: 98之恆定域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含 SEQ ID NO: 95 之重鏈及 SEQ ID No: 96之輕鏈。

在某些態樣中，本發明係關於於水性介質中之溶解性較高且聚集趨勢較低的針對達比加群之抗體。

在本發明之另一態樣中，抗體分子為 scFv 分子。在此格式中，本文揭示之可變域可以適合連接子肽彼此融合。構築體可自 N 端至 C 端按以下順序包含此等元件：(重鏈可變域)-(連接子肽)-(輕鏈可變域)、或(輕鏈可變域)-(連接子肽)-(重鏈可變域)。

此項技術中已知使編碼 sFv 構築體之核酸在宿主細胞(如大腸桿菌(*E. coli*)、甲醇酵母(*Pichia pastoris*)或哺乳動物細胞株，例如 CHO 或 NS0)中重組表現，從而產生功能性 scFv 分子的方法(參見例如 Rippmann 等人，*Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(12): 4862-4869；Yamawaki 等人，*J. Biosci. Bioeng.* 2007, 104(5): 403-407；Sonoda 等人，*Protein Expr. Purif.* 2010, 70(2): 248-253)。

特定言之，本發明之 scFv 抗體分子可如下產生。構築體可在誘導性啟動子控制下於不同大腸桿菌菌株，如 W3110、TG1、BL21、BL21(DE3)、HMS174、HMS174(DE3)、MM294 中表現。此啟動子可選自 lacUV5、tac、T7、trp、trc、T5、araB。培養基較佳根據 Wilms 等人，2001(Wilms 等人，*Biotechnology and Bioengineering* 2001,

73(2): 95-103)、DeLisa等人, 1999 (DeLisa等人, Biotechnology and Bioengineering 1999, 65(1): 54-64)或等效物完全確定。然而, 對分批培養基及/或進料培養基補充胺基酸(諸如異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、蘇胺酸、色胺酸及纈胺酸)或複合培養基組分(諸如大豆蛋白胨或酵母提取物)可能有益。醱酵過程以進料-分批模式進行。條件: 溫度 20-40°C, pH 5.5-7.5, DO 保持在 20% 以上。在消耗初始碳源之後, 向培養物中饋入上述進料培養基(或等效物)。當在醱酵罐中達到 40 至 100 g/L 之乾細胞重量時, 培養物用對應於所用啟動子系統之適當誘導劑(例如 IPTG、乳糖、阿拉伯糖)誘導。誘導可以脈衝完全誘導形式或以藉由歷經延長時間將各別誘導劑饋入醱酵罐中進行之部分誘導形式或以其組合進行。產生階段應持續至少 4 小時。藉由在碗式離心機、管碗式離心機或盤式堆疊離心機中離心來回收細胞, 丟棄培養物上清液。

將大腸桿菌細胞塊再懸浮於 4 至 8 倍量之溶解緩衝液(磷酸鹽或 Tris 緩衝液, pH 7-8.5)中。細胞溶解較佳藉由以下方式進行: 高壓均質化, 隨後藉由在碗式離心機、管碗式離心機或盤式堆疊離心機中離心來回收離心塊。含有 scFv 包涵體之離心塊用 20 mM Tris、150 mM NaCl、5 mM EDTA、2 M 脲、0.5% 曲通(Triton)X-100 (pH 8.0)洗滌 2-3 次, 隨後使用 20 mM Tris、150 mM NaCl、5 mM EDTA (pH 8.0)進行兩個洗滌步驟。scFv 包涵體最終藉由在碗式離心機、管碗式離心機或盤式堆疊離心機中離心加以回

收。可於含有離液劑(諸如 6 M 胍-HCl 或 8-10 mM 胍)之 100 mM 甘胺酸/NaOH、5 mM EDTA、20 mM 二硫蘇糖醇(9.5-10.5)中進行 scFv 包涵體之溶解。在培育 30-60 分鐘之後，離心溶液且回收含有目標蛋白質之上清液以進行後續再摺疊。再摺疊較佳以進料分批模式藉由於再摺疊緩衝液中按 1:10-1:50 稀釋蛋白質溶液至最終蛋白質濃度為 0.1-0.5 mg/ml 來進行。再摺疊緩衝液可含有 50-100 mM Tris 及/或 50-100 mM 甘胺酸、50-150 mM NaCl、1-3 M 胍、0.5-1 M 精胺酸、2-6 mM 氧化還原系統(諸如半胱胺酸/胱胺酸或氧化麩胱甘肽/還原麩胱甘肽)，pH 9.5-10.5。在 4°C 下培育 24-72 小時之後，再摺疊溶液視情況使用 0.22 μ m 過濾器過濾，稀釋且將 pH 值調整至 pH 7.0-8.0。蛋白質經由在 pH 7.0-8.5 下以結合模式進行陽離子交換層析(例如 Toyopearl GigaCap S-650M、SP 瓊脂糖 FF 或 S HyperCelTM)加以分離。藉由線性增加 NaCl 梯度進行溶離。匯合含有目標蛋白質之溶離份且隨後以非結合模式在陰離子交換管柱(例如 Toyopearl GigaCap Q-650M、Q-瓊脂糖 FF、Q HyperCelTM)上分離，繼而進行陽離子交換精製步驟(例如 SP 瓊脂糖 HP)。匯合含有純度最低為 90% 之目標蛋白質之溶離份且藉由透濾或尺寸排阻層析於 PBS 中調配。藉由還原性 SDS-PAGE 分析所產生 scFv 分子之身分及產物品質，其中 scFv 可以一個約 26 kDa 之主要條帶偵測到。表徵 scFv 之其他分析包括質譜、RP-HPLC 及 SE-HPLC。

在本發明之另一態樣中，抗體分子為 Fab 分子。在彼格

式中，以上揭示之可變域可各自融合於免疫球蛋白恆定域，較佳人類來源之免疫球蛋白恆定域。因此，重鏈可變域可融合於CH₁域(所謂Fd片段)，且輕鏈可變域可融合於CL域。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 99之重鏈及SEQ ID No: 100之輕鏈。較佳地，抗體分子為Fab分子。

在本發明之另一態樣中，抗體分子包含SEQ ID NO: 99之重鏈及SEQ ID No: 101之輕鏈。較佳地，抗體分子為Fab分子。

在本發明之另一態樣中，抗體分子為由SEQ ID NO: 99之重鏈及SEQ ID No: 100之輕鏈組成之Fab分子。

在本發明之另一態樣中，抗體分子為由SEQ ID NO: 99之重鏈及SEQ ID No: 101之輕鏈組成之Fab分子。

編碼Fab構築體之核酸可用於在宿主細胞，如大腸桿菌、甲醇酵母或哺乳動物細胞株(例如CHO或NS0)中表現此等重鏈及輕鏈。此項技術中已知允許此等鏈適當摺疊、締合及雙硫鍵結成包含Fd片段及輕鏈之功能性Fab分子的方法(Burtet等人，J. Biochem. 2007, 142(6), 665-669；Ning等人，Biochem. Mol. Biol. 2005, 38: 204-299；Quintero-Hernandez等人，Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315；Willems等人J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003; 786:161-176.)。

特定言之，本發明之Fab分子可如下在CHO細胞中產

生。根據製造商之說明書，使用 Lipofectamine™ 及 Plus™ 試劑 (Invitrogen)，用編碼 Fab 分子之重鏈及輕鏈之表現構築體轉染懸浮生長於無血清培養基中之 CHO-DG44 細胞 (Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M. 及 Chasin, L.A. (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. Cell 33, 405-412.)。48 小時後，細胞於含有 200 µg/mL 抗生素 G418 且無次黃嘌呤及胸苷之培養基中進行選擇以產生穩定轉染之細胞群體。隨後藉由以遞增濃度 (直至 100 或 400 nM) 添加甲胺喋呤 (methotrexate, MTX) 至培養基中使此等穩定轉染物進行基因擴增。一旦細胞已適應，即歷時 10 至 11 天對其進行進料-分批醱酵以產生 Fab 蛋白質物質。

CHO-DG44 細胞及其穩定轉染物之懸浮培養物在化學限定之無血清培養基中進行培育。種子儲備培養物每 2-3 天分別以 3×10^5 - 2×10^5 個細胞/毫升之接種密度進行次培養。細胞於搖瓶中在 Multitron HT 培育箱 (Infors) 中在 5% CO₂、37°C 及 120 rpm 下生長。對於進料-分批實驗，細胞於無抗生素或 MTX 之 BI 專有生產培養基中以 3×10^5 個細胞/毫升接種至搖瓶中。在 37°C 及 5% CO₂ 中在 120 rpm 下攪拌培養物，5% CO₂ 隨後隨細胞數增加而降至 2%。每日測定包括細胞計數、活力、pH 值、葡萄糖及乳酸鹽濃度之培養物參數且需要時使用碳酸鹽將 pH 值調整至 pH 7.0。每 24 小時添加 BI 專有進料溶液。在不同時間點獲取來自上清液之樣品以藉由 ELISA 測定 Fab 產物濃度。10 至 11 天後，藉由離心收

集細胞培養物流體且轉送至純化實驗室。

藉助於層析及過濾自進料-分批培養物之上清液純化Fab分子。作為初級捕捉步驟，應用親和層析(例如蛋白質G或蛋白質L)。或者，在結合親和力及能力較低之情況下，利用分子之pI藉由陽離子交換層析(CEX)對Fab進行捕捉。藉由其他正交純化步驟移除宿主細胞蛋白質及污染物，例如DNA或病毒。

所產生Fab分子之身分及產物品質藉由Fab可作為一個約50 kDa之主要條帶偵測到所依之電泳法，例如SDS-PAGE加以分析。表徵Fab產物之其他分析包括質譜、等電聚焦及尺寸排阻層析。藉由BIAcore分析監測結合活性。

經由夾心式酶聯結免疫吸附劑分析(ELISA)對細胞培養物上清液中之Fab或全長IgG分子進行定量。全長IgG可使用針對人類Fc片段產生之抗體(Jackson Immuno Research Laboratories)及針對人類κ輕鏈產生之抗體(經過氧化酶結合，Sigma)進行偵測。Fab片段由山羊多株抗人類IgG (H及L，Novus)固定且由針對人類IgG產生之綿羊多株抗體(經過氧化酶結合，The Binding Site)偵測。

Fab分子亦可藉由酶促裂解自全長抗體分子產生。此方法之優勢在於可應用用於穩定及高效醱酵及純化之平台方法，此可用於在所要產物品質下達成按比例擴大及高產率。對於純化，使用重組蛋白質A樹脂進行之親和層析可用作通常產生高純度之初級捕捉步驟。

出於此目的，使編碼Fab序列之重鏈融合於人類IgG抗體



分子之Fc區。所得表現構築體接著使用脂質體轉染(lipofection)來轉染至懸浮生長於無血清培養基中之CHO-DG44細胞中。48小時後，細胞於含有200 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素G418且無次黃嘌呤及胸苷之培養基中進行選擇以產生穩定轉染之細胞群體。隨後藉由以遞增濃度(直至100或400 nM)添加甲胺喋呤(MTX)至培養基中對此等穩定轉染物進行基因擴增。一旦細胞已適應，即歷時10至11天對其進行進料-分批醱酵以產生IgG蛋白質物質。

IgG蛋白質藉由使用重組蛋白質A親和層析自培養物上清液純化。為獲得所要中和性Fab片段，全長IgG接著在於鉸鏈區內裂解IgG之木瓜蛋白酶存在下培育，藉此釋放兩個Fab片段及Fc部分。

Fab分子藉由親和層析，例如蛋白質G或蛋白質L進行分離。或者，在結合親和力及能力較低之情況下，利用分子之pI藉由陽離子交換層析(CEX)對Fab進行捕捉。藉由其他正交純化步驟移除宿主細胞蛋白質及污染物，例如木瓜蛋白酶、DNA或病毒。

在本發明之另一態樣中，抗體分子為如本文所述之抗體分子之胺基酸序列變異體。

抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當核苷酸變化引入抗體DNA中或藉由肽合成進行製備。此等變異體包括例如本文實例之抗體之胺基酸序列內的殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所要特徵。胺

基酸變化亦可改變人類化或變異型抗體之轉譯後加工，諸如改變糖基化位點之數目或位置。

一種適用於鑑別抗體中作為較佳突變誘發位置之某些殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells(*Science*, 244:1081-1085 (1989))所述。此處，鑑別某一殘基或一組目標殘基(例如帶電荷殘基，諸如 arg、asp、his、lys 及 glu)且置換為中性或帶負電荷之胺基酸(通常為丙胺酸)以影響胺基酸與抗原之相互作用。顯示對取代具有功能敏感性之彼等胺基酸位置接著藉由在取代位點處或對取代位點引入進一步或其他變異體加以改進。因此，儘管引入胺基酸序列變化之位點預先確定，但突變性質本身無需預先確定。舉例而言，為分析指定位點處之突變之效能，在目標密碼子或目標區處進行丙胺酸掃描或隨機突變誘發並篩檢具有所要活性之所表現之抗體變異體。

胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽之範圍內的胺基端及/或羧基端融合物，以及單一或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括抗體融合於抗原決定基標籤。抗體分子之其他插入變異體包括增加抗體血清半衰期之酶或多肽與抗體之N端或C端的融合。

另一類型之變異體為胺基酸取代變異體。此等變異體使抗體分子中之至少一個胺基酸殘基移除且在其位置中插入不同殘基。最相關之取代突變誘發位點包括高變區，但亦



預期FR改變。保守性取代展示於下表中之標題「較佳取代」下。若此等取代導致生物活性變化，則可引入稱為「例示性取代」或如以下關於胺基酸類別進一步描述之更實質性變化且篩檢產物。

原始殘基	例示性取代	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)	arg ; asn ; gln ; lys ;	arg
Ile (I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; 正白胺酸	leu
Leu (L)	ile ; 正白胺酸 ; val ; met ; ala ; phe	ile
Lys (K)	arg ; gln ; asn	arg
Met (M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe (F)	tyr ; leu ; val ; ile ; ala ;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr ; phe	tyr
Tyr (Y)	phe ; trp ; thr ; ser	phe

Val (V) leu ; ile ; met ; phe ; ala ; 正白胺酸 ; leu

在蛋白質化學中，普遍公認抗體之生物性質可藉由選擇對維持以下方面之影響顯著不同之取代來達成：(a)取代區域中多肽骨架之結構，例如呈片或螺旋構形，(b)目標位點處分子之電荷或疏水性，或(c)側鏈之體積。天然存在之殘基基於共同側鏈性質分成以下各組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 鹼性：asn、gin、his、lys、arg；
- (5) 影響鏈定向之殘基：gly、pro；及
- (6) 芳族：trp、tyr、phe。

非保守性取代將導致此等類別之一之一個成員轉換成另一類別。

不涉及於維持人類化或變異型抗體之適當構形中之任何半胱胺酸殘基亦可進行取代，通常經絲胺酸取代以改良分子之氧化穩定性、防止異常交聯、或提供與細胞毒性或細胞抑制性化合物之確定結合點。反之，可添加半胱胺酸鏈至抗體中以改良其穩定性(特定言之當抗體為諸如Fv片段之抗體片段時)。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選用於進一步開發之所得變異體相對於其藉以產生之親本抗體將具有改良之生物性質。一種產生此等取代變異體之適

宜方式為使用噬菌體呈現進行親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點(例如6-7個位點)突變以在各位點處產生所有可能之胺基取代。由此產生之抗體變異體以單價方式自絲狀噬菌體粒子呈現為與各粒子內包裝之M13之基因III產物的融合物。接著篩檢具有生物活性(例如結合親和力)之噬菌體呈現變異體。為鑑別供修飾之候選高變區位點，可進行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或此外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與人類達比加群之間的接觸點可能有益。此等接觸殘基及相鄰殘基為根據本文詳述之技術進行取代之候選物。一旦產生此等變異體，即如本文所述對該組變異體進行篩檢，且可選擇在一或多個相關分析中具有優越性質之抗體用於進一步開發。

抗體之另一類型胺基酸變異體改變抗體之原始糖基化型態。「改變」意謂缺失抗體中所存在之一或多個碳水化合物部分、及/或添加抗體中不存在之一或多個糖基化位點。

在一些實施例中，可能需要修飾本發明抗體以添加糖基化位點。抗體之糖基化通常為N連接型或O連接型。N連接型係指碳水化合物部分連接於天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為碳水化合物部分酶促連接於天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，在多肽中存在此等三肽序列中之任一者皆會產生潛在糖基化位點。O連接型糖基

化係指糖 N-乙醯半乳糖胺、半乳糖或木糖之一連接於羥基胺基酸，最通常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用 5-羥基脯胺酸或 5-羥基離胺酸。因此，為使指定蛋白質(例如抗體)糖基化，對該蛋白質之胺基酸序列進行工程改造以含有一或多個上述三肽序列(針對 N 連接型糖基化位點)。改變亦可藉由在原始抗體之序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或用一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基進行取代來進行(針對 O 連接型糖基化位點)。

編碼抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子藉由此項技術中已知之多種方法製備。此等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體之情況下)或藉由對如本文所述之抗體分子之較早製備變異體或非變異形式進行寡核苷酸介導之(或定點)突變誘發、PCR 突變誘發及卡匣突變誘發加以製備。如上文所概述，本發明抗體分子之抗原為抗凝血劑。使用該抗原藉由對動物進行免疫或藉由如同噬菌體呈現方法自序列文庫選擇抗體序列來產生抗體分子。

動物之免疫方案在此項技術中為熟知的。為達成適當免疫反應，可能需要組合抗原與佐劑，如磷酸鋁、氫氧化鋁、角鯊烯(squalene)或佛氏完全/不完全佐劑(Freund's complete/incomplete adjuvant)。

在本發明之情形中，抗原(如達比加群)大多為相對較小之有機分子，其有時在向動物投與時並不刺激抗體形成。因此，如同半抗原一樣，可能需要使抗原連接於巨分子。

在另一態樣中，本發明係關於如上所述之抗體分子，其係用於醫藥中。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥組合物，其包含如先前所述之抗體分子及醫藥載劑。

為在療法中使用，將抗體分子包括在適於有助於向動物或人類投與之醫藥組合物中。抗體分子之典型調配物可藉由混合抗體分子與生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑製備成凍乾或以其他方式乾燥之調配物或水溶液或水性或非水性懸浮液形式。載劑、賦形劑、調節劑或穩定劑在所用劑量及濃度下應無毒。其包括緩衝系統，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽及其他無機或有機酸及其鹽；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑，諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨、氯化六羥季銨、氯化苯甲煙銨、苜索氯銨(benzethonium chloride)、苯酚、丁醇或苯甲醇、對羥基苯甲酸烷酯(諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯)、兒茶酚(catechol)、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間甲酚；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮或聚乙二醇(PEG)；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖、寡糖或多糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖、糊精或葡聚糖；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或離子性或非離子性界面活性劑，諸如

TWEEN™(聚山梨醇酯)、PLURONICS™或脂肪酸酯、脂肪酸醚或糖酯。此外，抗體調配物中可含有有機溶劑，諸如乙醇或異丙醇。賦形劑亦可具有改進釋放或改進吸收之功能。

在一個態樣中，醫藥組合物包含於水性緩衝溶液中濃度為10-20 mg/ml之抗體分子、或由該種溶液製成之凍乾物。

較佳施用模式為藉由輸注或注射(靜脈內、肌肉內、皮下、腹膜內、皮內)進行之非經腸施用，但亦可應用其他施用模式，諸如藉由吸入、經皮、鼻內、經頰、經口進行施用。

在另一態樣中，本發明係關於如上所述之抗體分子，其係用於療法中或預防抗凝血劑療法之副作用，特定言之出血事件。

在另一態樣中，本發明係關於一種如上所述之抗體分子，其係用於逆轉抗凝血劑(特定言之達比加群或達比加群酯)之過度給藥。

在另一態樣中，本發明係關於如上所述之抗體分子，其係用作抗凝血劑(特定言之達比加群或達比加群酯)之解毒劑。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療或預防抗凝血劑療法之副作用之方法，其包含向有需要之患者投與有效量之如上所述之抗體分子。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療抗凝血劑療法中

之過度給藥事件之方法，其包含向有需要之患者投與有效量之如上所述之抗體分子。

所欲投與抗體之「治療有效量」為預防、改善或治療抗凝血劑療法之副作用所必需的最小量，特定言之有效阻止出血之最小量。此可以化學計量之量的抗體分子達成。

舉例而言，當在推薦劑量下給予時，達比加群可達成200 nM之量值的血漿濃度。當使用分子量約50 kD之單價抗體分子時，在以大丸劑形式靜脈內給予之情況下可例如在約1 mg/kg之劑量下達成中和。在另一實施例中，施用於人類患者之Fab分子之劑量可為每次施用50-1000 mg，例如100、200、500、750或1000 mg。視情形而定，例如當達比加群已在患者中過度給藥時，施用甚至更高之劑量，例如每次施用1250、1500、1750或2000 mg可能適當。視所投與抗凝血劑之類型及劑量；自此投藥之後流逝之時間；抗原分子之性質；患者之狀況及其他因素而定，適當劑量可能不同。熟練專家已知用以確定在治療上既有效亦安全之劑量的方法。

在另一態樣中，本發明係關於一種對達比加群及/或達比加群酯具有結合親和力之抗體分子。較佳地，如例如藉由表面電漿子共振分析(Malmqvist M., 「Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.」 Curr Opin Immunol. 1993年4月；5(2):282-6.)或動力學排除分析(KinExA)技術(Darling, R.J.及 Brault P-A., 「Kinetic exclusion assay technology:

Characterization of Molecular Interactions.」ASSAY and Drug Development Technologies. 2004年12月2(6): 647-657) 所測定，抗體分子結合達比加群及/或達比加群酯之親和力的 K_D 值在0.1 pM至100 μ M、較佳1 pM至100 μ M、更佳1 pM至1 μ M之範圍內。

本發明之抗體分子亦可用於分析及診斷程序，例如以測定諸如血漿、血清或其他體液之樣品中之抗原濃度。舉例而言，抗原分子可用於酶聯結免疫吸附劑分析(ELISA)中，如實例中所述。因此，在另一態樣中，本發明係關於包含如本文所述之抗體分子之分析及診斷套組、及各別分析及診斷方法。

在另一態樣中，本發明係關於一種製造如前述技術方案中任一者之抗體分子之方法，其包含：

- (a) 提供包含與表現控制序列功能性締合之一或多個編碼該抗體分子之核酸的宿主細胞，
- (b) 培養該宿主細胞，及
- (c) 自細胞培養物回收該抗體分子。

本發明另外提供一種含有適用於中和經口抗凝血劑，特定言之直接凝血酶抑制劑之物質的製品及套組。製品包含具有標籤之容器。適合容器包括例如瓶、小瓶及試管。容器可由多種材料形成，諸如玻璃、金屬、塑料或其組合。容器容納包含本文所述之抗體或達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的醫藥組合物。醫藥組合物中之活性劑為特定抗體或達比加群、達比加群

酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽。抗體容器上之標籤指示醫藥組合物用於在活體內中和或部分中和達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽。

本發明套組包含一或多個上述容器。其可另外包括就商業及使用者觀點來看合乎需要的其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及具有使用說明之藥品說明書。

在本發明之一個實施例中，套組包含本文所述之任一抗體或其醫藥組合物。舉例而言，套組可包含(1)本文所述之任一抗體或其醫藥組合物，(2)容器及(3)標籤。

在另一實施例中，套組包含本文所述之任一抗體或其醫藥組合物、及達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的抗體。達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽之形式可呈固體、液體或凝膠形式。在一較佳實施例中，達比加群酯之醫藥學上可接受之鹽為甲磺酸鹽。在另一較佳實施例中，每劑量單位達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的強度介於約50 mg與約400 mg、約75 mg與約300 mg、約75 mg與150 mg、或約110 mg與約150 mg之間，一天一次(QD)或一天兩次(BID)給予。舉例而言，套組可包含(1)本文所述之任一抗體或其醫藥組合物，(2)達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的醫藥組合物，(3)容器及(4)標籤。

在一替代性實施例中，套組包含(1)包含達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的第一醫藥組合物，(2)包含本文所述之任一抗體或其組合之第二醫藥組合物，(3)用於向患者分開投與該第一及第二醫藥組合物之說明書，其中該第一及第二醫藥組合物含於各別容器中且該第二醫藥組合物係向需要中和或部分中和達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸的患者投與。

本發明亦提供一種用以中和或部分中和正用達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽治療之患者中的達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸之診斷方法，其包含投與本文所述之任一抗體、其組合或其醫藥組合物。特定言之，本發明提供一種中和或部分中和患者中之達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸的方法，其包含以下步驟：(a)確認患者正用達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽治療，及該患者所服用之量；(b)在進行達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸將干擾測試或分析結果之準確讀數的凝結或凝血測試或分析之前，用本文所述之任一抗體或其組合中和達比加群或1-O-醯基葡萄糖苷酸；(c)對取自該患者之樣品進行該凝結或凝血測試或分析以測定不存在達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸時凝塊形成之程度；及(d)調整向該患者投與之達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的量以在患者中達成凝塊形成與降解之間的適當平衡。抗體與達比加群或達



比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸的莫耳比為介於0.1與100之間、較佳介於0.1與10之間的莫耳比。測試或分析結果之準確讀數可為血纖維蛋白原含量、活化蛋白質C抗性或相關測試之準確讀數。

實例

I. 產生多株抗達比加群抗體

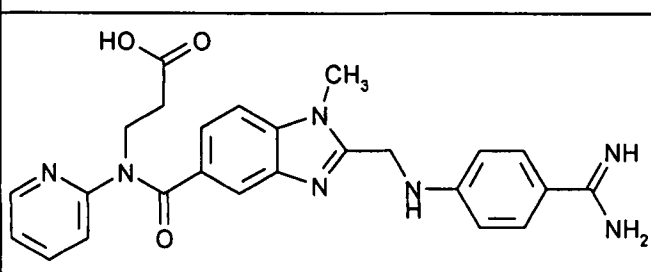
對於產生多株抗達比加群抗體，以兩種不同半抗原且在半抗原與載體蛋白(BSA)之不同莫耳輸入比率下產生3種不同免疫原。

對於篩檢，製造酶辣根過氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)結合物且開發酶-免疫吸附劑分析(ELISA)。

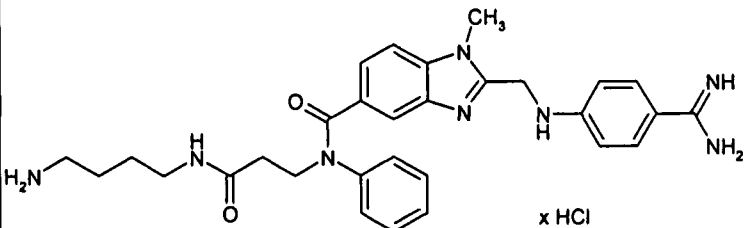
藉由在蛋白質A瓊脂糖FF上進行親和層析來對多株抗體進行進一步純化。

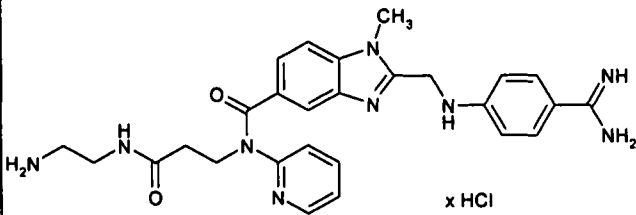
1. 材料及方法

測試化合物(達比加群)

代號：	達比加群，兩性離子
結構式：	 $C_{25}H_{25}N_7O_3$ 分子量：471.5 g/mol

1.1 用於合成免疫原及示蹤劑之半抗原

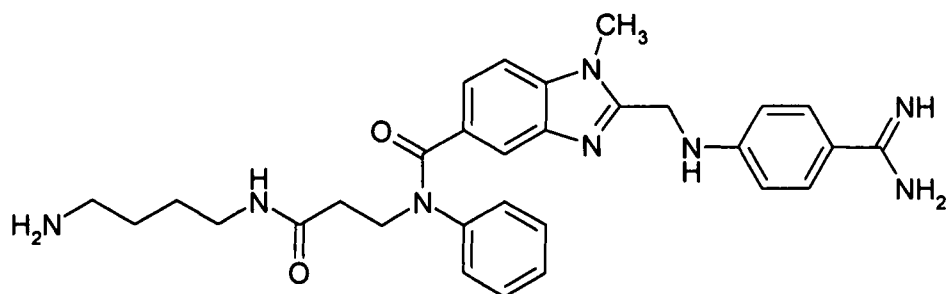
代號：	半抗原1
配體之結構式：	 $C_{30}H_{36}N_8O_2 \cdot HCl$ 分子量：577.13 g/mol

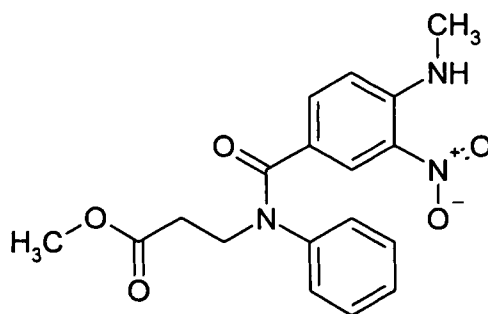
代號：	半抗原2
配體之結構式：	 $C_{27}H_{31}N_9O_2 \cdot HCl$ 分子量：550.07 g/mol

1.2 合成半抗原

如下合成半抗原：半抗原1及半抗原2：

半抗原1 2-[(4-甲脒基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸[2-(4-胺基-丁基胺甲醯基)-乙基]-苯基-醯胺



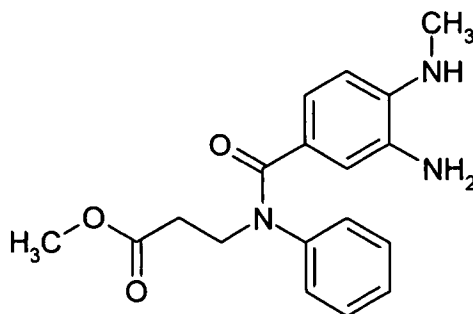
1a 3-[(4-甲基氨基-3-硝基-苯甲醯基)-苯基-胺基]-丙酸甲酯

在室溫下在攪拌下向4-甲基氨基-3-硝基-苯甲酸氯化物 (23.3 mmol)及3-苯基-胺基-丙酸甲酯(23.3 mmol)於80 mL 無水四氫呋喃(THF)中之溶液中逐滴添加三乙胺(50.2 mmol)。3小時後，反應混合物蒸發至乾燥，剩餘固體用水濕磨且經由過濾分離固體產物。

產率：99%

$C_{18}H_{19}N_3O_5$ (357.36)

TLC (矽膠；二氯甲烷/乙醇19:1)： $R_f=0.48$

1b 3-[(3-胺基-4-甲基氨基-苯甲醯基)-苯基-胺基]-丙酸甲酯

藉由在室溫下於乙醇中用Pd(10%於木炭上)作為催化劑進行氫化來還原產物1a之硝基。

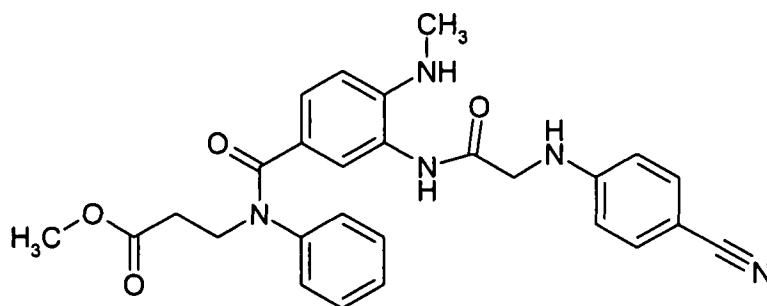
產率：99%

$C_{18}H_{21}N_3O_3$ (327.38)

TLC (矽膠；二氯甲烷/乙醇9:1)： $R_f=0.23$

質譜(ESI): $[M+H]^+=328$

1c 3-({3-[2-(4-氰基-苯胺基)-乙醯胺基]-4-甲基胺基-苯甲醯基}-苯基-胺基)-丙酸甲酯



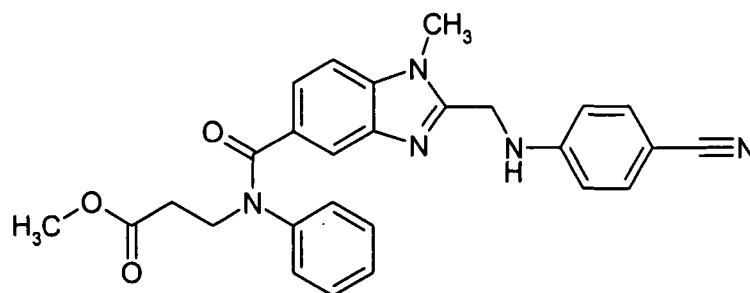
在室溫下於無水 THF 中用 CDI (23.2 mmol) 使產物 1b (23.2 mmol) 與 N-(4-氰基-苯基)-甘胺酸 (23.2 mmol) 偶合。反應完成後，混合物蒸發至乾燥且粗產物不經進一步純化即使用。

產率：97%

$C_{27}H_{27}N_5O_4$ (485.54)

質譜(ESI): $[M+H]^+=486$

1d 3-({2-[(4-氰基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-苯基-胺基)-丙酸甲酯



產物 1c (22.6 mmol) 於 100 mL 濃乙酸中之溶液加熱至回流維持 1 小時。溶液接著蒸發至乾燥，剩餘固體用水濕磨且在攪拌下將 pH 值調整至約 8-9。粗產物經由用乙酸乙酯萃取加以分離且藉由矽膠層析 (溶離劑：二氯甲烷/乙醇 1:1) 進行純化。

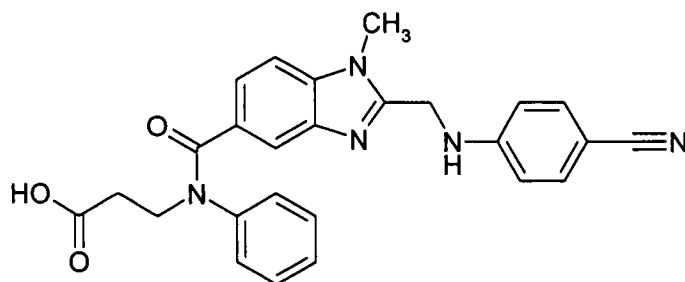
產率：58%

$C_{27}H_{25}N_5O_3$ (467.52)

TLC (矽膠；二氯甲烷/乙醇 9:1)： $R_f=0.71$

質譜 (ESI): $[M+H]^+=468$

1e 3-({2-[(4-氰基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-苯基-胺基)-丙酸



向產物 1d (13.0 mmol) 於 100 mL 甲醇中之溶液中添加氫氧化鈉 (20.0 mmol)。在 40°C 下攪拌混合物 2.5 小時且接著蒸發至乾燥。剩餘固體與 100 mL 水一起攪拌且 pH 值用濃乙酸調整至約 6。沈澱之產物藉由過濾分離，用水洗滌且在 60°C 下乾燥。

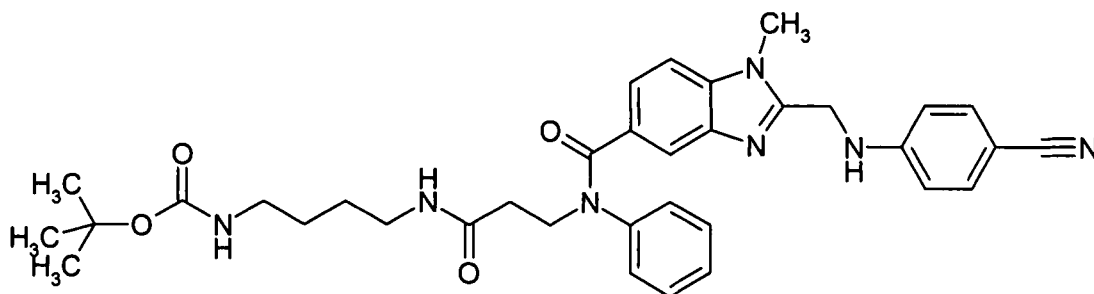
產率：88%

$C_{26}H_{23}N_5O_3$ (453.49)

TLC (矽膠；二氯甲烷/乙醇 9:1)： $R_f=0.33$

質譜 (ESI): $[M+H]^+ = 454$

1f {4-[3-({2-[(4-氰基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-苯基-胺基)-丙醯胺基]-丁基}-胺基甲酸第三丁酯



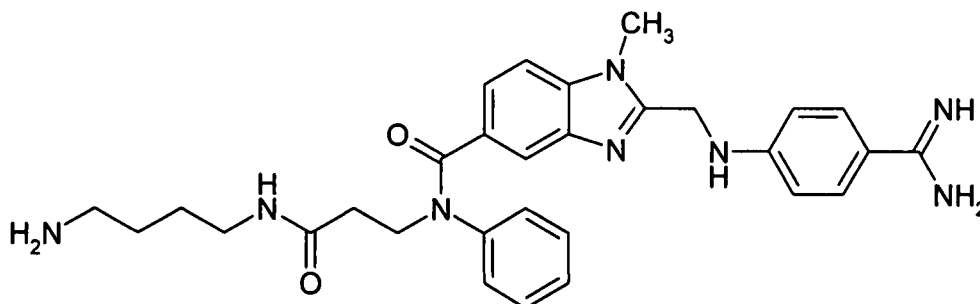
在室溫下攪拌產物 **1e** (5.23 mmol)、四氟硼酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫 (TBTU, 5.23 mmol) 及 N-甲基-嗎啉 (5.23 mmol) 於 20 mL DMF 中之溶液 30 分鐘。接著添加 (4-胺基-丁基)-胺基甲酸第三丁酯 (5.23 mmol) 且在室溫下再攪拌混合物 24 小時。混合物接著用水 (100 mL) 稀釋且產物經由用乙酸乙酯萃取加以分離。

產率：92%

$C_{35}H_{41}N_7O_4$ (623.75)

TLC (矽膠；二氯甲烷/乙醇 9:1)： $R_f = 0.51$

1g 2-[(4-甲脒基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸[2-(4-胺基-丁基胺甲醯基)-乙基]-苯基-醯胺



將產物 1f(4.81 mmol)溶解於 HCl 於乙醇中之飽和溶液 (250 mL) 中，混合物在室溫下攪拌隔夜且接著在 30°C 下蒸發至乾燥。將剩餘原料溶解於 200 mL 無水乙醇中，接著添加碳酸銨(48.1 mmol)且混合物在室溫下攪拌隔夜。蒸發溶劑後，剩餘原料用約 5 mL 乙醇濕磨，未溶解物質藉由過濾分離且在 30°C 下蒸發溶劑。接著將產物溶解於 30 mL 水中，溶液與約 2 g 木炭一起攪拌，過濾且蒸發至乾燥。

產率：90%

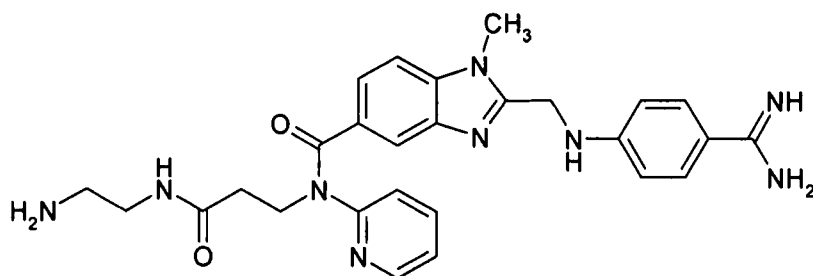
$C_{30}H_{36}N_8O_2$ (540.67)

TLC (逆相 RP-8；甲醇/5% NaCl 水溶液 9:1)： $R_f=0.79$

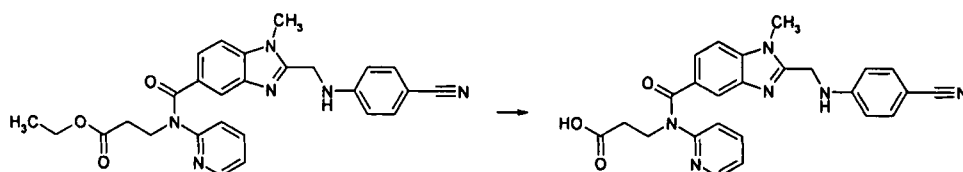
質譜 (ESI): $[M+H]^+=541$

$[M+Cl]^- = 575/7$

半抗原 2 2-[(4-甲脒基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸[2-(2-胺基-乙基胺甲酯基)-乙基]-吡啶-2-基-醯胺



2a 3-({2-[(4-氰基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羧基}-吡啶-2-基-胺基)-丙酸

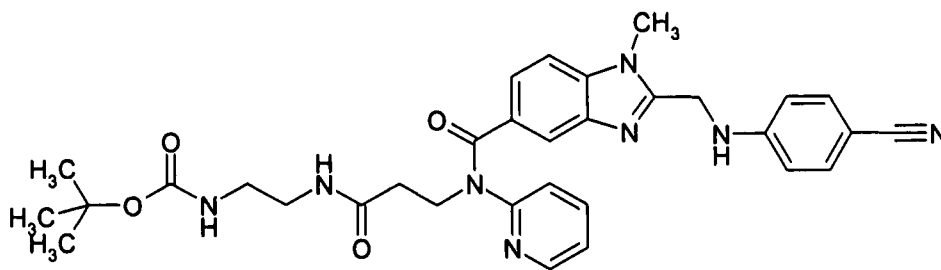


向氫氧化鈉(50.0 mmol)於500 mL乙醇及50 mL水中之溶液中添加3-({2-[(4-氟基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-吡啶-2-基-胺基)-丙酸乙酯(41.4 mmol)。混合物在室溫下攪拌3小時，接著蒸餾除去約350 mL乙醇，添加約100 mL水且pH值調整至6。接著添加乙醚(50 mL)且混合物攪拌隔夜。產物藉由過濾分離且不經進一步純化即使用。

產率：78%

$C_{25}H_{22}N_6O_3$ (454.48)

2b {2-[3-({2-[(4-氟基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-吡啶-2-基-胺基)-丙醯胺基]-乙基}-胺基甲酸第三丁酯



在室溫下攪拌產物2a (2.20 mmol)、四氟硼酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫(TBTU, 2.20 mmol)及N-甲基-嗎啉(2.20 mmol)於無水四氫呋喃(100 mL)中之溶液15分鐘。接著添加(2-胺基-乙基)-胺基甲酸第三丁酯(2.20 mmol)且在室溫下再攪拌混合物24小時。混合物接著用40 mL水稀釋，產物經由用乙酸乙酯萃取加以分離且藉由層析(矽膠；二氯甲烷/甲醇15:1)進行純化。

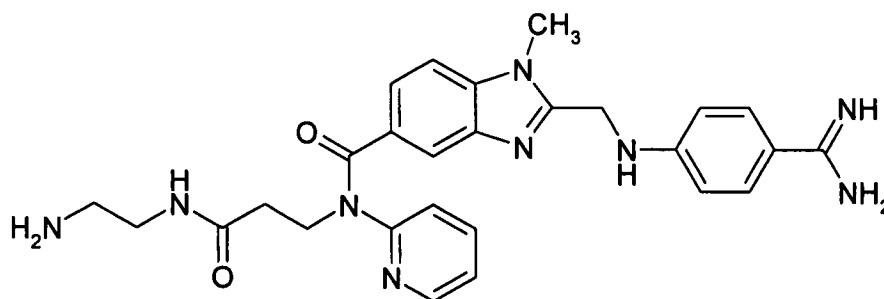
產率：61%

$C_{32}H_{36}N_8O_4$ (596.68)

質譜 (ESI): $[M+H]^+ = 597$

$[M+H]^- = 595$

2c 2-[(4-甲脒基-苯胺基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸[2-(2-胺基-乙基胺甲鹽基)-乙基]-吡啶-2-基-鹽胺



添加產物 2b (1.34 mmol) 至 HCl 於無水乙醇中之飽和溶液 (30 mL) 中。在室溫下攪拌溶液 5 小時，接著在 30°C 下蒸發至乾燥。添加乙醇 (30 mL) 及碳酸銨 (13.0 mmol) 且混合物在室溫下攪拌隔夜。接著蒸發溶劑，殘餘物質用約 4 mL 二氯甲烷/甲醇 (30:1) 之混合物濕磨 5 次，過濾並蒸發以使產物與無機鹽分離。

產率：27%

$C_{27}H_{31}N_9O_2$ (513.61)

質譜 (ESI): $[M+Cl]^- = 548/50$

$[M+HCl+Cl]^- = 584/6$

$[M+H]^+ = 514$

2. 化學品

2.1 用於試劑合成之化學品

名稱	規格	供應商	目錄號
1,4-苯醌		Fluka	12309
牛血清白蛋白(BSA)		Serva	11920
1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)		Fluka	21861
檸檬酸	分析級	Riedel-De Haën	33114
N,N-二甲基甲醯胺(DMF)	供合成用	Merck	822275
乙醇	分析級	Baker	8006
佛氏佐劑(CFA)	完全	Sigma	F-5881
佛氏佐劑(IFA)	不完全	Sigma	F-5506
甘油	純	Merck	104093
辣根過氧化酶HRP	25000 U/100 mg	Boehringer Mannheim	108090
H ₂ SO ₄	分析級	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	分析級	Merck	4873
NaHCO ₃	分析級	Merck	106329
Na ₂ CO ₃	分析級	Merck	106392
(NH ₄) ₂ SO ₄	分析級	Merck	101217
鄰苯二胺	30 mg錠劑	Sigma	P8412
過硼酸鈉	純	Riedel-De Haën	11621
瑞香草酚(Thymol)	純	Merck	8167

2.2 用於ELISA之化學品

名稱	規格	供應商	目錄號
檸檬酸	分析級	Riedel-De Haën	33114
H ₂ SO ₄	分析級	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	分析級	Merck	4873
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	分析級	Merck	6580
NaCl	分析級	Merck	6404
NaOH	分析級	Merck	6498
鄰苯二胺	30 mg錠劑	Sigma	P8412
過硼酸鈉	純	Riedel-De Haën	11621
吐溫20(Tween 20)	純	Serva	37470

2.3 用於ELISA之緩衝液

名稱	成分	用途
緩衝液1 穩定性：	0.05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.15 M NaCl , pH=7.4 在約+4°C下4週	塗佈
緩衝液2 穩定性：	與緩衝液1相同，但具有5 g/l BSA 在約+4°C下10天	分析緩衝液
緩衝液3 穩定性：	與緩衝液1相同，但具有5 g/l BSA及 0.1 g/L 硫柳汞(thimerosal) 在約+4°C下4週	微盤阻斷；儲存
緩衝液4 穩定性：	0.1 M 檸檬酸，用NaOH調整至pH 5.0， 6.5 mmol/L 過硼酸鈉 檸檬酸： 在約+4°C下6個月 在過硼酸鹽存在下： 在約+4°C下10天	用於鄰苯二胺之受質緩衝液
洗滌溶液 穩定性：	水、0.5 g/L 吐溫20 在環境溫度下10天	微盤洗滌
終止試劑 穩定性：	2.25 M H_2SO_4 在環境溫度下5年	遏止鄰苯二胺顯色

來自 Elgastat Maxima-HPLC 超純水處理系統之水用於製備緩衝溶液。

3. 合成免疫原

為刺激兔之免疫系統以產生針對達比加群之多株抗體，藉由使用 1,4-苯醌或 1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)作為偶合試

劑使半抗原：半抗原1及半抗原2偶合於載體蛋白牛血清白蛋白(BSA)來合成三種免疫原(批號GL256、GL258及GL262)。

對於合成GL256，使用1,4-苯醌作為具有兩個反應性位點之同雙官能性化合物。首先，其在酸性pH值下僅在兩個位點之一處且在鹼性pH值下在另一位點處以最小聚合與胺基反應。

GL258及GL262係使用1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)作為偶合試劑在半抗原與載體蛋白之不同輸入比率下合成。

3.1 合成GL256

向0.75 μMol BSA於8.5 mL 0.1 M KH_2PO_4 緩衝液(pH=4.5)中之溶液中添加0.416 mM 1,4-苯醌(於1.5 mL乙醇中)且在室溫下在黑暗中培育1.5小時。此後，溶液穿過用0.15 M NaCl平衡之葡聚糖凝膠G25管柱以消除過量1,4-苯醌(最終體積12.5 mL)。

在攪拌下緩慢添加2.5 mL(0.15 μMol)經純化BSA溶液至525 μMol 半抗原：半抗原1溶解於2 mL 0.1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液(pH=8.5)中之溶液中。在添加BSA溶液期間，將pH值調整至約8.0。半抗原與載體蛋白之莫耳輸入比率為3500:1。

在室溫下培育隔夜後，免疫原相對於1公升蒸餾水透析6次。薄層層析顯示不存在半抗原-載體結合物中殘留之未結合半抗原的斑點。

免疫原以等分試樣冷凍儲存在 -20°C 下。免疫原之上清



液中半抗原對BSA之取代度為約1:18，如藉由在302 nm下進行之紫外吸收光譜術所測定。最終溶液中免疫原之含量為0.75 mg GL256/mL。

3.2 合成GL258

在室溫下製備158 μMol 半抗原2於6.3 mL N,N-二甲基甲醯胺(DMF)中之溶液。添加158 μMol 1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)且首先在10°C下培育4小時且此後在室溫下培育30分鐘。用薄層層析檢查化學反應且為約20-25%。

接著將0.75 μMol BSA溶解於2 mL 0.13 M NaHCO_3 中且在攪拌下逐滴添加1 mL N,N-二甲基甲醯胺(DMF)。將pH值調整至約8.3。此後，在攪拌下逐滴添加半抗原溶液(6.3 mL)及4 mL 0.13 M NaHCO_3 至BSA溶液中且將pH值調整至8.4。對於免疫原GL258而言，半抗原與載體蛋白之莫耳輸入比率為210:1。

在室溫下在攪拌條件下培育隔夜後，免疫原相對於1公升蒸餾水透析6次。薄層層析顯示不存在半抗原-載體結合物中殘留之未結合半抗原的斑點。

免疫原以等分試樣冷凍儲存在-20°C下。免疫原之上清液中半抗原對BSA之取代度為約1:5，如藉由在302 nm下進行之紫外吸收光譜術所測定。最終溶液中免疫原之含量為0.28 mg GL258/mL。

3.3 合成GL262

在室溫下製備225 μMol 半抗原2於8.75 mL N,N-二甲基甲醯胺(DMF)中之溶液。添加225 μMol 1,1'-羰基-二-(1,2,4-

三唑)且在10℃下培育4小時。用薄層層析檢查化學反應且為約20-25%。

接著將0.49 μMol BSA溶解於2 mL 0.13 M NaHCO_3 中且在攪拌下逐滴添加1 mL N,N-二甲基甲醯胺(DMF)。將pH值調整至約8.2。此後，在攪拌下逐滴添加半抗原溶液(8.75 mL)及6 mL 0.13 M NaHCO_3 至BSA溶液中且將pH值調整至8.3。對於免疫原GL262而言，半抗原與載體蛋白之莫耳輸入比率為460:1。

在室溫下在攪拌條件下培育隔夜後，免疫原相對於1公升蒸餾水透析6次。薄層層析顯示不存在半抗原-載體結合物中殘留之未結合半抗原的斑點。

免疫原以等分試樣冷凍儲存在-20℃下。免疫原之上清液中半抗原對BSA之取代度為約1:32，如藉由在302 nm下進行之紫外吸收光譜術所測定。最終溶液中免疫原之含量為0.71 mg GL262/mL。

4. 合成結合物

4.1 合成GL261

在室溫下製備37.4 μMol 半抗原2於1.5 mL N,N-二甲基甲醯胺(DMF)中之溶液。添加37.5 μMol 1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)且首先在10℃下培育4小時且此後在室溫下培育30分鐘。用薄層層析檢查化學反應且為約20-25%。

接著將1.125 μMol 酶辣根過氧化酶(HRP)溶解於0.4 mL 0.13 M NaHCO_3 中且在攪拌下逐滴添加0.267 mL N,N-二甲基甲醯胺(DMF)。將pH值調整至約8.2。此後，在攪拌下逐

滴添加 0.9 mL 半抗原溶液 (22.5 μ Mol) 及 0.57 mL 0.13 M NaHCO_3 至 HRP 溶液中且將 pH 值調整至 8.4。對於 HRP 結合物 GL261 而言，半抗原與 HRP 之莫耳輸入比率為 20:1。

在室溫下在攪拌條件下培育隔夜後，藉由凝膠層析使 HRP 結合物與有機溶劑及過量半抗原分離。溶液穿過用 0.1 M 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0) 平衡之葡聚糖凝膠 G25 管柱。

向最終濃度之半抗原-HRP 結合物 (示蹤劑，5.64 mg/mL) 中外加得以產生約 10 mg/mL 之濃度之 BSA、用以防止冷凍之等體積甘油及用以防止細菌生長之瑞香草酚晶體。示蹤劑溶液標記為批號 GL261 且以等分試樣儲存在 -20°C 下。

半抗原對 HRP 之取代度為 1:0.2，如藉由在 302 nm 下進行之紫外光譜分析所測定。

使用鄰苯二胺 (OPD) 作為受質且使用天然 HRP 作為參照物質，在經 BSA 阻斷之微量滴定盤中量測示蹤劑之比活性。經稀釋 HRP 標準物或半抗原-HRP 結合物與受質溶液之混合物在黑暗中培育 30 分鐘，用硫酸終止且量測 490 nm 下之吸收。剩餘活性為天然 HRP 之 94% 且於甘油中之結合物調配物之比活性為 611 U/mL。

示蹤劑規格之概述：

類型：	半抗原 2-辣根過氧化酶 (批號 GL 261)
蛋白質含量：	5.64 mg/mL
比活性：	108 U/mg 611 U/ml (受質愈創木酚 (Guajacol) 及 H_2O_2 ， 25°C)
儲存：	在約 -20°C 下
工作稀釋度：	1:40000

5. 免疫及產生抗體

5.1 兔之免疫

用 100 μ g 免疫原 GL256、GL258 及 GL262 於 0.5 mL 0.9% NaCl 溶液及 0.5 mL 完全佛氏佐劑 (CFA) 中之乳液免疫 12 隻 3 月齡雌性栗色兔。隨後在次月進行數次追加免疫 (booster immunization)。對於第三次免疫，使用 0.5 mL 不完全佛氏佐劑 (IFA)。各免疫皆在 4 個皮下部位及 4 個肌肉內部位進行。

A 組 - 免疫原 GL256

兔 1 #50

兔 2 #51

兔 3 #52

兔 4 #53

B 組 - 免疫原 GL258

兔 5 #54

兔 6 #55

兔 7 #56

兔 8 #57

C 組 - 免疫原 GL262

兔 9 #46

兔 10 #47

兔 11 #48

兔 12 #49

免疫流程

第1天	每隻動物用於CFA中之每毫升100 µg免疫原進行第一次免疫
第29天	每隻動物用於CFA中之每毫升100 µg免疫原進行第二次免疫
第57天	每隻動物用於IFA中之每毫升100 µg免疫原進行第三次免疫 兔之健康狀況可能因使用免疫原GL256及GL258而變得惡化 兔7 #56未處理
第67天	第一次放血(每隻動物2 mL)
第81天	每隻動物用於CFA中之每毫升100 µg免疫原進行第四次免疫
第91天	第二次放血(每個動物25 mL)
第112天	每隻動物用於CFA中之每毫升100 µg免疫原進行第五次免疫
第122天	對動物編號之指定被遺失 第三次最終放血(驅血(Exsanguination))*

* 第1-12號兔在第五次免疫之後10天完全驅血。

在用賽拉嗪(xylazin)(Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany)及鹽酸氯胺酮(ketamine hydrochloride) (Ketavet®, Parke-Davis, Freiburg, Germany)麻醉下經由頸動脈進行驅血。

5.2 分析兔血清

藉由離心凝結之兔血液來製備血清。藉由硫酸銨沈澱並經由葡聚糖凝膠G25管柱脫鹽來獲得蛋白質溶離份。

藉由標準ELISA程序篩檢來自兔血清之具有抗達比加群效價之個別蛋白質溶離份。

篩檢-ELISA：

步驟	程序
A	來自各次放血之蛋白質溶離份於緩衝液1中在環境溫度下於微量滴定盤(100微升/孔；1、2或4 µg/mL)上吸附隔夜。 洗滌微盤4次，每次450 µL 用250 µL緩衝液3阻斷至少1小時
B	洗滌微盤4次，每次450 µL
C	一式三份向微量滴定盤之各孔中添加： + 50 µL緩衝液2 + 50 µL含校正標準物之緩衝液2 + 25 µL達比加群-辣根過氧化酶(HRP)結合物GL 261(示蹤劑)(1/40000)
D	用黏著性箔片密封微盤，對所有微盤進行完全樣品分配 在環境溫度下在振盪器上培育4小時
E	洗滌微盤4次，每次450 µL
F	向微量滴定盤之各孔中添加100 µL鄰苯二胺HCl，2.7 mg/mL(1個30 mg錠劑於11 mL緩衝液4中) 在環境溫度下在黑暗中培育30分鐘
G	向微量滴定盤之各孔中添加100 µL H ₂ SO ₄ (2.25 M) 振盪5分鐘
H	讀取吸光度；測試波長：490 nm，參照波長：650 nm

5.3 偵測兔血清中之抗達比加群抗體

最後3欄：數值係針對達比加群

第2次放血

兔	免疫原	塗佈濃度 [µg/ml]	濃度 [Mol]	[Ext]	[%]
1 #50	GL256	2	0	1.812	100%
			2.E-12	1.574	87%
			2.E-11	0.461	25%
			2.E-10	0.059	3%

2	#51	GL256	1	0	2.193	100%
				2.E-12	2.086	95%
				2.E-11	1.515	69%
				2.E-10	0.207	9%
3	#52	GL256	2	0	1.513	100%
				2.E-12	1.419	94%
				2.E-11	0.728	48%
				2.E-10	0.107	7%
4	#53	GL256	2	0	1.474	100%
				2.E-12	1.388	94%
				2.E-11	0.848	58%
				2.E-10	0.142	10%
5	#54	GL258	1	0	2.114	100%
				2.E-12	1.892	89%
				2.E-11	0.646	31%
				2.E-10	0.159	8%
6	#55	GL258	1	0	1.295	160%
				02.E-12	0.937	72%
				2.E-11	0.265	20%
				2.E-10	0.140	11%
7	#56	GL258	2	0	1.611	100%
				2.E-12	1.372	85%
				2.E-11	0.424	26%
				2.E-10	0.145	9%
8	#48	GL258	1	0	1.640	100%
				2.E-12	1.290	79%
				2.E-11	0.426	26%
				2.E-10	0.196	12%
9	#47	GL262	2	0	1.854	100%
				2.E-12	1.534	83%
				2.E-11	0.530	29%
				2.E-10	0.254	14%
10	#48	GL262	2	0	1.458	100%
				2.E-12	1.142	78%
				2.E-11	0.300	21%
				2.E-10	0.131	9%

11	#49	GL262	4	0	1.646	100%
				2.E-12	1.393	85%
				2.E-11	0.460	28%
				2.E-10	0.257	16%
12	#50	GL262	2	0	1.605	100%
				2.E-12	1.400	87%
				2.E-11	0.389	24%
				2.E-10	0.109	7%

末次放血

兔	免疫原	塗佈濃度 [μg/ml]	濃度 [Mol]	[Ext]	[%]
1	?	1	0	1.589	100%
			2.E-12	1.442	91%
			2.E-11	0.491	31%
			2.E-10	0.130	8%
2	?	1	0	1.375	100%
			2.E-12	1.041	76%
			2.E-11	0.293	21%
			2.E-10	0.101	7%
3	?	1	0	1.400	100%
			2.E-12	1.081	77%
			2.E-11	0.288	21%
			2.E-10	0.097	7%
4	?	1	0	1.183	100%
			2.E-12	0.882	75%
			2.E-11	0.396	33%
			2.E-10	0.183	15%
5	?	1	0	1.335	100%
			2.E-12	1.066	80%
			2.E-11	0.183	14%
			2.E-10	0.057	4%
6	?	1	0	1.214	100%
			2.E-12	0.976	80%
			2.E-11	0.250	21%
			2.E-10	0.123	10%

7	?	2	0	1.822	100%
			2.E-12	1.702	93%
			2.E-11	0.661	36%
			2.E-10	0.189	10%
8	?	2	0	1.234	100%
			2.E-12	1.085	88%
			2.E-11	0.671	54%
			2.E-10	0.147	12%
9	?	1	0	1.911	100%
			2.E-12	1.862	97%
			2.E-11	0.980	51%
			2.E-10	0.292	15%
10	?	1	0	1.933	100%
			2.E-12	1.891	98%
			2.E-11	1.055	55%
			2.E-10	0.076	4%
11	?	1	0	1.874	100%
			2.E-12	1.817	97%
			2.E-11	1.539	82%
			2.E-10	0.181	10%
12	?	2	0	1.599	100%
			2.E-12	1.425	89%
			2.E-11	0.475	30%
			2.E-10	0.050	3%

在篩檢所有兔之來自第2次放血之蛋白質溶離份後，使用較佳半抗原：半抗原2免疫之第5號(#54)兔顯然具有最高抗達比加群抗體效價。此外，有可能僅用低濃度分析物(達比加群)自抗體結合位點置換示蹤劑。

對於最後第3次放血之篩檢，用低濃度分析物(達比加群)自抗體結合位點置換示蹤劑用作主要判定準則，因為丟失關於所用免疫原之資訊。因此，第2、3及5號兔用於進一步純化。

5.4 純化多株抗體

用硫酸銨使第5號(#54)兔第2次放血及第2、3及5號兔第3次放血(末次放血)之抗血清沈澱。沈澱物在10℃下在4500 U/min下離心30分鐘，自溶液分離且再溶解於Tris緩衝液中。重複此程序。藉由在蛋白質A瓊脂糖FF上進行親和層析來進行進一步純化。管柱緩衝液為0.01 M Tris (pH=7.5) 且使用0.1 M甘胺酸(pH=3.0)進行溶離。組合含有兔IgG之溶離份。藉由在280 nm下進行紫外光譜分析來測定蛋白質濃度。

抗體規格之概述：

免疫原：	半抗原2-BSA (批號GL258)
兔：	第5號(#54)血清(第2次放血)
蛋白質含量：	1.85 mg/mL
儲存：	在約-20℃下

免疫原：	半抗原1-BSA (GL256)或 半抗原2-BSA (批號GL258)或 半抗原2-BSA (批號GL262)
兔：	收集之第2號血清(末次放血)
蛋白質含量：	3.9 mg/mL
儲存：	在約-20℃下

免疫原：	半抗原1-BSA (GL256)或 半抗原2-BSA (批號GL258)或 半抗原2-BSA (批號GL262)
兔：	第3號血清(末次放血)
蛋白質含量：	9.96 mg/mL
儲存：	在約-20℃下

免疫原：	半抗原1-BSA (GL256)或 半抗原2-BSA (批號GL258)或 半抗原2-BSA (批號GL262)
兔：	第5號血清(末次放血)
蛋白質含量：	5.72 mg/mL
儲存：	在約-20°C下

II. 中和達比加群

進行兩個系列之實驗以展示針對達比加群抗凝血劑活性之抗體之活體外作用。在實驗室中接收4種多株抗體並進一步在人類血漿中進行測試。此係在功能性分析，亦即凝血酶凝結時間分析中進行測試。

分析描述：

簡言之，藉由將全血置入3.13%檸檬酸鈉中來獲得人類血漿。接著對其進行離心以獲得無血小板血漿且轉移至單獨管中並冷凍直至在分析當天被需要。在分析當天在37°C下解凍血漿。

如下進行凝血酶凝結時間分析。首先，於所提供(Dade Behring測試套組)且預升溫至37°C之緩衝液中將凝血酶稀釋至製造商之規格(3 IU/mL凝血酶)。其在製備後2小時內使用。所有分析皆在市售CL4凝結機(Behnk Electronics, Norderstadt, Germany)上進行。50 µL血漿吸移至所提供之具有磁性攪拌器之比色管中且在CL4機器中於預加熱至37°C之孔中攪拌2分鐘。此時，添加100 µL凝血酶溶液且由CL4自動記錄血漿樣品凝結所需之時間。達比加群於血

漿中在所提供之比色管中預培育5分鐘，隨後添加凝血酶並開始量測。若亦測試抗體(加50 μ L儲備溶液)，則在37°C下再培育5分鐘，隨後開始凝結(亦即與達比加群一起培育總計10分鐘，與抗體一起培育總計5分鐘且接著用凝血酶起始凝結)。

最初藉由添加遞增濃度之達比加群至人類血漿中並在添加凝血酶之後量測凝結時間來作出達比加群標準曲線(圖1)。凝血酶凝結時間隨達比加群之濃度增加而以濃度依賴性方式增加。

對於第一組中和實驗，添加200 nM臨床相關濃度之達比加群至所有血漿樣品中進行中和。所有4個抗體製劑皆能夠使含有達比加群之血漿中之凝結時間縮短(圖2)。中和程度與各抗體製劑中蛋白質之濃度相關。濃度最高之抗體溶液(D)接著連續稀釋且在一組單獨實驗中測試其中和200 nM達比加群抗凝血劑活性之能力。在圖3中可見，隨著抗體濃度增加，存在對達比加群誘導之抗凝血劑活性的濃度依賴性抑制。此外，當添加非特異性兔多株抗體(藍色方塊)至含有達比加群之血漿中時，其不具有中和抗凝血劑活性之能力。濃度依賴性及非特異性抗體缺乏中和作用指示由抗體逆轉抗凝血作用具有達比加群特異性。

然而，達比加群之此等濃度具有臨床相關性，且出血或劑量過高將可能隨濃度升高而發生。因此，亦測試抗體抑制圖1標準曲線中最高濃度之達比加群(500 nM)之抗凝血劑活性的能力。圖4說明抗體D亦可抑制高濃度之達比加

群。

III. 單株抗達比加群抗體之產生及表徵

1. 產生單株抗達比加群抗體及 Fab

用結合於載體蛋白(諸如血氰蛋白(hemocyanin)及免疫球蛋白)之半抗原1(參見實例1.1)免疫小鼠且根據標準程序產生融合瘤。自培養物上清液純化之單株抗體結合達比加群-蛋白質結合物且此結合與溶液中之達比加群競爭的半數最大抑制濃度可在1至10 nM之範圍內。藉由木瓜蛋白酶裂解單株抗體且隨後經由蛋白質A消除FC域來產生Fab。

使用標準方法對來自小鼠抗體之重鏈及輕鏈之可變區進行選殖及定序。藉由利用質譜進行蛋白質分析並對抗體之N端定序來確認序列。產生編碼包含特定小鼠可變區及人類IGG恆定區之嵌合抗體之DNA構築體且在HEK 293T細胞中表現蛋白質並進行純化。

為降低潛在免疫原性，藉由上述標準方法使小鼠單株抗體純系35E6及27A9之序列人類化。藉由於哺乳動物細胞(例如HEK293；CHO細胞)中短暫轉染來產生人類化Fab且依次藉由用苯甲脒瓊脂糖進行親和層析及尺寸排阻層析進行純化。

2. 表徵單株抗達比加群抗體及 Fab

9個單株抗體純系DBG22(純系22)、35E6、45B9、48E1、49F8、6A7F1、2F1E5、3B4E7、1F6G8、2D2E3及27A9之可變域之序列描述於表1中。SEQ ID NO 67、68、69、92、93、94、99、100及101表示最佳化及/或人類化

之序列。Fab化合物 VH5C/VK18 包含 HCVH5C (SEQ ID NO: 99)作為重鏈及 LCVK18 (SEQ ID NO: 100)作為輕鏈。Fab化合物 VH5C/VK21 包含 HCVH5C (SEQ ID NO: 99)作為重鏈及 LCVK21 (SEQ ID NO: 101)作為輕鏈。因此，VH5C/VK18與 VH5C/VK21兩者均包含具有 SEQ ID NO: 67之 CDR1、SEQ ID NO: 68之 CDR2及 SEQ ID NO: 9之 CDR3的重鏈可變域、以及 SEQ ID NO: 64之 CDR1、SEQ ID NO: 65之 CDR2及 SEQ ID NO: 69之 CDR3的輕鏈可變域。兩種 Fab 共有 SEQ ID NO: 92 之重鏈可變區 (VH5C)。VH5C/VK18 包含 SEQ ID NO: 93 之輕鏈可變區 (VK18)，且 VH5C/VK21 包含 SEQ ID NO: 94 之輕鏈可變區 (VK21)。

在表 1 中，字母「CDR」表示互補決定區，「VH」表示重鏈可變區，「VK」表示κ輕鏈可變區，「CL」表示輕鏈恆定區，且「CH」表示重鏈恆定區，「LC」表示抗體分子之輕鏈，且「HC」表示抗體分子之重鏈。舉例而言，「VHCDR1 DBG22」表示純系 DBG22 之重鏈可變域之第一 CDR (CDR1)，且「DBG22VH」表示純系 DBG22 之重鏈可變區。

表 1

SEQ ID NO	名稱	序列
1	VHCDR1 DBG22	GFSLTYSYIVD
2	VHCDR2 DBG22	VIWAGGSTNYNSALRS

3	VHCDR3 DBG22	AAYSYNYDGFAY
4	VKCDR1 DBG22	KSSQSLLYTNGKTYLY
5	VKCDR2 DBG22	LVSKLDS
6	VKCDR3 DBG22	LQSTHFPHT
7	VHCDR1 35E6	GYTFTNYWMH
8	VHCDR2 35E6	ETNPRNGGTNYNEKFKR
9	VHCDR3 35E6	GTSGYDYFDY
10	VKCDR1 35E6	RSSQTIVHSNGNTYLE
11	VKCDR2 35E6	KVSNRFS
12	VKCDR3 35E6	FQASHFPYT
13	VHCDR1 45B9	GVSLFTYDVD
14	VHCDR2 45B9	VMWSGGTTNYNSALKS
15	VHCDR3 45B9	DRWSPGGFAY
16	VKCDR1 45B9	QSSQSLLYTNGKTYLH
17	VKCDR2 45B9	LVSKLDS
18	VKCDR3 45B9	LQSTHFPHT
19	VHCDR1 48E1	GFSLTSYDVD

20	VHCDR2 48E1	VIWAGGSTNYNSALKS
21	VHCDR3 48E1	DRWSPGGFAY
22	VKCDR1 48E1	KSSQSLLYTNGKTYLI
23	VKCDR2 48E1	LVSKLDS
24	VKCDR3 48E1	LQTTHFPHT
25	VHCDR1 49F8	GFSLSTYGVD
26	VHCDR2 49F8	LIWAGGSTTYNSAFKS
27	VHCDR3 49F8	ERSGDSPFGY
28	VKCDR1 49F8	KSSQSLLYTNGKTYLN
29	VKCDR2 49F8	LVSKLDS
30	VKCDR3 49F8	LQNSHFPHT
31	VHCDR1 6A7F1	GFTFSTYGMS
32	VHCDR2 6A7F1	SVTRGGNTYYPDMS
33	VHCDR3 6A7F1	DYSGWYFDV
34	VKCDR1 6A7F1	RSSQSIVHSNGDTFLE
35	VKCDR2 6A7F1	KVSNRFS
36	VKCDR3 6A7F1	FQGSRIPYT

37	VHCDR1 2F1E5	GFTLTNYGMN
38	VHCDR2 2F1E5	WINTYTGEPTYADDFKG
39	VHCDR3 2F1E5	SAGTDYFDY
40	VKCDR1 2F1E5	RASESVDSYGNSFMH
41	VKCDR2 2F1E5	LASNLES
42	VKCDR3 2F1E5	QQNNEDPWT
43	VHCDR1 3B4E7	GYTFTYYTIH
44	VHCDR2 3B4E7	YINPASSYTNYIQKFKD
45	VHCDR3 3B4E7	GANWDYFDY
46	VKCDR1 3B4E7	RSSQNI IQSNGNTYLE
47	VKCDR2 3B4E7	KVSNRFS
48	VKCDR3 3B4E7	FQGSHVPYT
49	VHCDR1 1F6G8	GYTFTSYTIH
50	VHCDR2 1F6G8	YINPSSGYTTYIQNFKD
51	VHCDR3 1F6G8	GANWDYFDY
52	VKCDR1 1F6G8	RSSQNIVQTNGNTYLE

53	VKCDR2 1F6G8	KVSSRFS
54	VKCDR3 1F6G8	FQGSHVPFT
55	VHCDR1 2D2E3	GYTFTHSGMN
56	VHCDR2 2D2E3	WINTNTGEPTYAEFNGR
57	VHCDR3 2D2E3	SWWTDYFDY
58	VKCDR1 2D2F8	RSSQSIVHSNGNTYLE
59	VKCDR2 2D2E3	KVSNRFS
60	VKCDR3 2D2E3	FQGSHFPYT
61	VHCDR1 27A9	GYFTNCYMH
62	VHCDR2 27A9	ETNPRNGGTNYNEKFKR
63	VHCDR3 27A9	GTSGYEYFDY
64	VKCDR1 27A9	RSSQSIVHSDGNIYLE
65	VKCDR2 27A9	KVSYRFS
66	VKCDR3 27A9	FQGSHVPYT
67	VHCDR1 5C	GYFTDYMH
68	VHCDR2 5C	ETNPRNGGTTYNEKFKG
69	VKCDR3 18	FQASHVPYT



70	DBG22VH	QVQLEQSGPG LVAPSQRLSI TCTVSGFSLT SYIVDWVRQS PGKGLEWLGW IWAGGSTNYN SALRSRLSIT KSNKSQVFL QMNSLQTDDT AIYYCASAAY YSYNYDGFA YWGQGLTVTV SA
71	DBG22VK	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLYW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGI YYCLQSTHFP HTFGGGTKLE IK
72	35E6VH	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKTSGYTFT NYWMHWVRQR PGQGLEWIGE TNPRNGGTNY NEKFKRKATL TVDKSSNTAY MQLSSLTFGD SAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTTTLTVSS
73	35E6VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQTIV HSNNGTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDLGV YFCFQASHFP YTFGGGTKLE IK
74	45B9VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGVSLF TYDVDWVRQS PGKDLEWLGW MWSGGTTNYN SALKSRLNIM KDSSKSQVFL KMSGLQTDDT GIYYCATDRW SPGGFAYWGQ GTLTVTSA
75	45B9VK	DVVMQTPLT LSVLIGQPAS ISCQSSQSLL YTNGKTYLHW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCLQSTHFP HTFGGGTKLE IR
76	48E1VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYDVDWVRQS PGKGLEWLGW IWAGGSTNYN SALKSRLIIS KDNSKNQVFL RMNSLQTDDT AMYYCASDRW SPGGFAYWGQ GTLTVTSA
77	48E1VK	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLIW LLQRPGQSPK RLIHLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FYCLQTHFP HTFGGGTKLE IR
78	49F8VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT TYGVDWVRQS PKKGLEWLGL IWAGGSTTYN SAFKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT AMYYCASERS GDSPFGYWGQ GTLTVTSA
79	49F8VK	DVVMQTSPLI LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLNW LLQRPGQSPE RLIHLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCLQNSHFP HTFGSGTKLE IK
80	6A7F1VH	EVKLVESGGD LVRPGGSLKL SCAASGFTFS TYGMSWVRQS PEKRLEWVAS VTRGGNTYYP DSMRGRFTIS RDNVGNILYL HLRSLRSEDY AIYFCARDYS GWYFDVWGAG TTVTVSS

81	6A7F1VK	DVLMTQIPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNQDTFLEW YLQKSGQSPK LLIYKVSNR F SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGS RIP YTFGGG TKLE IK
82	3B4E7VH	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT YYTIHWVKQR PGQGLEWIGY INPASSYTN Y IQKFKDRATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVFYCARGA NWDYFDYWGQ GTTLTVSS
83	3B4E7VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNII QSNQNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNR F SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP YTFGGG TNLE IK
84	2F1E5VH	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKSSGFTLT NYGMNWVKQV PGKGLRWMGW INTYTGEPTY ADDFKGRFAF SLETSARTAY LQINN LKNED AATYFCARSA GTDYFDYWGQ GTTLTVSS
85	2F1E5VK	NFVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGNSFMHWC QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPW TFGGGG TKLEI K
86	1F6G8VH	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKSSGFTLT NYGMNWVKQV PGKGLRWMGW INTYTGEPTY ADDFKGRFAF SLETSARTAY LQINN LKNED AATYFCARSA GTDYFDYWGQ GTTLTVSS
87	1F6G8VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV QTNGNTYLEW YLQKPGQSPN LLIYKVSSRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP FTFGGG TKLE IK
88	2D2E3VH	QAQIHLVQSG PELKKPGETV KISCKASGYT FTHSGMNWMK QTPGKDLKWM GWINTNTGEP TYAE EFNGRF AFSLEASANT AYLQINN LKN EDTATYFCAR SWWTDYFDYW GQGTTLTVSS
89	2D2E3VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQTS ISCRSSQSIV HSNQNTYLEW YLQKPGQSPE LLIYKVSNR F SGVPDRISGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP YTFGGG TKLE IT
90	27A9VH	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT NCYMHWVKQR PGQGLEWIGE TNPRNGGTNY NEKFKRKATL TVNKYSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCTIGT SGYEYFDYWG QGTTLTVSS
91	27A9VK	NILMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK VLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTYFTLKI SRVEAEDLGV YFCFQGSHP YTFGGG TKLE IK

92	VH5C	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMHWVRQA PGQGLEWMGE TNPRNGGTTY NEKFKGKATM TRDTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTLVTVSS
93	VK18	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGQGGTKLE IK
94	VK21	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGGGTKLE IK
95	純系22 嵌合HC	QVQLEQSGPG LVAPSQRSLI TCTVSGFSLT SYIVDWVRQS PGKGLEWLGV IWAGGSTNYN SALRSRLSIT KSNSKSQVFL QMNSLQTDIT AIYYCASAAY YSYNYDGFA YWQGGTLTV SAASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
96	純系22 嵌合LC	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSL YTNCKTYLYW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGI YYCLQSTHFP HTFGGGGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSL SSSLTSLKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
97	hCL域	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
98	hCH域	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

99	HCVH5C	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMHWVRQA PGQGLEWMGE TNPRNGGTTY NEKFKGKATM TRDTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SC
100	LCVK18	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVS YRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCFQASHVP YTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
101	LCVK21	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVS YRF SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDGVV YYCFQASHVP YTFGGGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

在實例II中概述之凝血酶凝結時間分析中測試小鼠單株抗體純系22中和人類血漿中之達比加群抗凝血劑活性之能力。抗體以劑量依賴性方式完全逆轉人類血漿中由達比加群介導之凝血酶依賴性凝結之延長(圖5)。抗體亦有效抑制人類全血中之達比加群功能。自此抗體產生之Fab阻斷人類血漿中之達比加群活性，從而證明單價抗原結合域可中和化合物抗凝血劑活性。(圖6)。

達比加群在人類中之主要代謝路徑係經由羧酸酯部分之葡萄糖醛酸苷化。達比加群醯基葡萄糖苷酸已顯示具有藥理學活性(Ebner等人, Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75)。為測試小鼠單株抗體純系22是否可中和此等代謝物，自用達比加群處理之恆河猴(rhesus

monkeys)之尿液純化達比加群醯基葡萄糖苷酸且在凝血酶凝結時間分析中進行評估。抗體以劑量依賴性方式逆轉人類血漿中由達比加群醯基葡萄糖苷酸介導之凝血酶依賴性凝結延長，效能類似於用達比加群所見之效能(圖7)。因此，抗體有效阻斷人類中所見之達比加群代謝物之抗凝血劑活性。

使用Kinexa技術測定包含純系22之可變域之Fab及小鼠-人類嵌合抗體的親和力。將恆定濃度之Fab或嵌合抗體與各種濃度之達比加群一起培育直至達到平衡。在此培育之後，藉由將抗體捕捉於與生物素結合之達比加群類似物偶合之中性鏈親和素(Neutravadin)珠粒上來測定游離抗體之濃度。用經FITC標記之抗小鼠IgG (Fab特異性) F(ab')₂片段偵測所捕捉之Fab。用與Cy5結合之抗人類IgG偵測所捕捉之嵌合抗體。使用1:1結合模型計算解離常數。此等實驗之結果概述於下表中。

抗達比加群抗體之親和力

抗體	表觀K _d
純系22 Fab	48 pM
純系22嵌合Ab	34 pM

FAB與嵌合抗體兩者均以高親和力結合達比加群。

凝血酶凝結時間分析

簡言之，藉由將全血置入3.13%檸檬酸鈉中來獲得人類血漿。接著對其進行離心以獲得無血小板血漿且轉移至單獨管中並冷凍直至在分析當天被需要。在分析當天在37°C

下解凍血漿。

如下進行凝血酶凝結時間分析。首先，於所提供(Dade Behring測試套組)且預升溫至37°C之緩衝液中將凝血酶稀釋至製造商之規格(3 IU/mL凝血酶)。其在製備後2小時內使用。所有分析皆在市售CL4凝結機(Behnk Electronics, Norderstadt, Germany)上進行。50 μ L血漿吸移至所提供之具有磁性攪拌器之比色管中且在CL4機器中於預加熱至37°C之孔中攪拌2分鐘。此時，添加100 μ L凝血酶溶液且由CL4自動記錄血漿樣品凝結所需之時間。達比加群於血漿中在所提供之比色管中預培育5分鐘，隨後添加凝血酶並開始量測。若亦測試抗體(加50 μ L儲備溶液)，則在37°C下再培育5分鐘，隨後開始凝結(亦即與達比加群一起培育總計10分鐘，與抗體一起培育總計5分鐘且接著用凝血酶起始凝結)。

嵌合抗體及人類化Fab在凝血酶時間分析中之活性分別展示於圖8及9中。

親和力測定(Kinexa方法)

使用KinExA®技術測定Fab及小鼠-人類嵌合抗體之親和力。將恆定濃度之Fab或嵌合抗體與各種濃度之達比加群一起培育直至達到平衡。在此培育之後，藉由將抗體捕捉於與生物素結合之達比加群類似物偶合之中性鏈親和素珠粒上來測定游離抗體之濃度。用經FITC標記之抗人類IgG (Fab特異性) F(ab')₂片段偵測所捕捉之Fab。用與Cy5結合之抗人類IgG偵測所捕捉之嵌合抗體。使用1:1結合模型計

算解離常數(K_D)。

為用 KinExA® 儀器量測速率常數(k_{on} 及 k_{off})，使用動力學直接法(Kinetics Direct method)。在此方法中，將結合搭配物混合於溶液中，且隨時間探測游離活性結合位點之濃度，因為活性結合位點因形成複合物而消耗。在指定時間間隔下收集資料點且分析信號。以此方式，直接量測 k_{on} 且解離速率 k_{off} 計算為 $k_{off}=K_D \times k_{on}$ 。

表：使用 KinExA® 技術測定之嵌合抗體之 K_D 值。

嵌合Ab	K_D (pM)
45B6	545
48E1	281
35E6	52
49F8	40
27A9	120

表：人類化 Fab VH5C/VK18 及 VH5C/VK21 之 K_D 值、 k_{on} 及 k_{off}

Fab	K_D	k_{on}	k_{off} (計算值)
VH5C/VK18	133 pM	9.38e+005/Ms	1.25e-004/s
VH5C/VK21	147 pM	1.377e+006/Ms	2.02e-004/s

Fab-達比加群複合物形成及結晶

將 Fab 濃縮至 10 mg/ml，與 2 倍莫耳濃度過量之達比加群混合且在 4°C 下培育 1 小時。按 1:1 混合複合物與結晶溶液。複合物在 25% PEG 1500、0.1 M SPG 緩衝液(pH 7)中結晶。

資料收集及結構測定

所有晶體之資料集皆在 Paul Scherrer Institut之 Swiss light Source beamline PXI-X06SA上收集。所有資料集皆用 autoPROC套件處理(Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T.及 Bricogne, G. (2011). Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Cryst.* D67, 293-302.)。

Fab VH5C/VK21:達比加群晶體以單位晶胞尺寸 $a=59.97$ Å, $b=78.39$ Å, $c=87.67$ Å之空間群P212121生長且繞射解析度為2.2 Å。複合物結構藉由使用同源Fab結構(PDB-ID 1C1E)作為起始搜尋模型，用程式 phaser (Collaborative Computational Project, 第4號. 1994. 「The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography」. *Acta Cryst.* D50, 760-763 ; Phaser crystallographic software. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. *J. Appl. Cryst.* (2007). 40, 658-674.)進行分子置換加以解析。對電子密度圖之分析顯示達比加群之清晰電子密度。用 Coot進行多輪模型構建並用 autoBUSTER進行改進來改良完整結構(「Coot: model-building tools for molecular graphics」Emsley P, Cowtan K *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60: 2126-2132第12部分特刊第1期 2004年12月 ; Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vonrhein C., Womack T.O. (2011). BUSTER 第2.11.2版. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing

Ltd)。

Fab VH5C/VK18: 達比加群晶體分別以空間群P21及P212121生長。具有空間群P21之晶體顯示單位晶胞尺寸 $a=51.81 \text{ \AA}$ ， $b=128.92 \text{ \AA}$ ， $c=60.26 \text{ \AA}$ 且繞射解析度為 $1.9 \text{ \AA}$ 。具有空間群P212121之晶體顯示單位晶胞尺寸 $a=48.20 \text{ \AA}$ ， $b=59.74 \text{ \AA}$ ， $c=127.69 \text{ \AA}$ 且繞射解析度為 $2.2 \text{ \AA}$ 。兩種複合物結構均藉由使用Fab VH5C/VK21之結構作為起始搜尋模型，用程式phaser進行分子置換加以解析。對電子密度圖之分析顯示達比加群之清晰電子密度。用Coot進行多輪模型構建並用autoBUSTER進行改進來改良完整結構。

空間聚集傾向(SAP)之計算機分析

如(1)中所述計算各原子及各殘基之空間聚集傾向(SAP)，例外之處為殘基疏水性參數取自(2)。Fv SAP計算為抗體可變域中所有正性殘基SAP值之總和。CDR SAP計算為抗體互補決定區中所有正性殘基SAP值之總和。已計算來自蛋白質資料庫(protein data bank, PDB)之850種不同抗體結構之Fv SAP及CDR SAP，從而產生該兩種性質之平均(μ_{Fv} 及 μ_{CDR})及標準偏差值(σ_{Fv} 及 σ_{CDR})。

接著根據以下各式計算抗體之Fv SAP及CDR SAP之Z評分

$$Z \text{ 評分 (Fv SAP)} = (Fv \text{ SAP} - \mu_{Fv}) / \sigma_{Fv} \text{ 及}$$

$$Z \text{ 評分 (CDR SAP)} = (CDR \text{ SAP} - \mu_{CDR}) / \sigma_{CDR}。$$

結果(圖11)：

人類化Fab 18/15：

$$Z \text{ 評分 (Fv SAP)} = 1.06$$

Z 評 分 (CDR SAP)=1.00

人 類 化 Fab VH5C/VK18 :

Z 評 分 (Fv SAP)=-0.61

Z 評 分 (CDR SAP)=-0.84

人 類 化 Fab VH5C/VK21 :

Z 評 分 (Fv SAP)=-0.61

Z 評 分 (CDR SAP)=-0.78

Fab 18/15 (參見 WO2011089183)所具有之溶劑暴露疏水性表面大於蛋白質資料庫中已知抗體之平均值。

意外的是，VH5C/VK18 (SEQ ID NO: 99/SEQ ID NO: 100)與 VH5C/VK21 (包含 SEQ ID NO: 99/SEQ ID NO: 101)兩者所具有之溶劑暴露疏水性表面均小於蛋白質資料庫中已知抗體之平均值(負性 Z 評分)。此意謂此等化合物在水性介質中之溶解度增加且聚集趨勢較低，從而使其更適用於抗體濃度較高之穩定藥物調配物。

(1) Chennamsetty 等人，Proc Natl Acad Sci; 2009, 106(29)，第 11937-11942 頁。

(2) Cowan及 Whittaker, Pept Res; 1990, 3(2)，第 75-80 頁。

【圖式簡單說明】

圖 1：使用凝血酶凝結時間分析，增加達比加群之濃度可見凝結時間增加。200 nM濃度導致凝結時間超過基線升高約 5 倍且用於第一組及第二組實驗中。500 nM濃度(超治療性)用於最後一組實驗中。

圖 2：針對達比加群之 4 種不同抗體 (A-D) 皆使人類血漿中由達比加群所致之凝結時間延長得到中和。人類血漿中之基線凝結為 10.9 秒，當將 200 nM 達比加群與血漿一起預培育時，凝結延長至 51 秒。添加各抗體至與 200 nM 達比加群一起預培育之血漿中且再培育 5 分鐘。接著藉由添加凝血酶來起始凝血酶凝結時間。各抗體可在不同程度上逆轉達比加群所致之凝結時間。濃度最高之溶液導致抗凝血活性最大程度地逆轉。

圖 3：量測增加添加至已與 200 nM 達比加群一起預培育之人類血漿中之多株抗體 (抗體 D) 之濃度的效應。基線凝結時間為 11 秒，添加達比加群使凝結延長至 63.7 秒。接著測試增加抗體之稀釋度對逆轉達比加群所致之凝血酶凝結時間延長的影響。最低濃度使凝血酶凝結時間降至 43.9 秒。較高濃度使凝血酶凝結時間完全降至基線程度且導致達比加群之抗凝血效應完全中和。添加非特異性兔多株抗體 (方塊) 不具有逆轉達比加群之抗凝血效應的作用。

圖 4：量測增加添加至已與 500 nM 達比加群一起預培育之人類血漿中之多株抗體 (抗體 D) 之濃度的效應。基線凝結時間為 10.9 秒，添加此較高濃度之達比加群使凝結延長至 111.7 秒 (約 10 倍增加)。1:2 稀釋之抗體或儲備溶液之效應以濃度依賴性方式逆轉達比加群所致之凝血酶凝結時間延長。最高濃度亦使凝血酶凝結時間完全逆轉至基線程度且導致甚至超治療性濃度之達比加群的抗凝血效應完全中和。

圖 5：小鼠單株抗體(純系 22)逆轉人類血漿及人類全血中達比加群之抗凝血效應。添加遞增濃度之小鼠抗體至已與 30 nM 達比加群一起預培育之人類血漿或全血中。分析藉由添加 1.5-2 U/mL 凝血酶起始且量測凝結時間。100% 達比加群活性定義為在存在及不存在化合物下之凝結時間之差異。抗體以劑量依賴性方式抑制達比加群介導之凝結時間延長。

圖 6：自純系 22 抗體產生之小鼠 Fab 逆轉人類血漿中達比加群之抗凝血效應。添加遞增濃度之小鼠 Fab 至已與 7 nM 達比加群一起預培育之人類血漿中。完整抗體亦作為陽性對照進行測試。分析藉由添加 0.4 U/mL 凝血酶起始且量測凝結時間。100% 抑制定義為完全阻斷達比加群介導之凝結時間增加。Fab 以劑量依賴性方式抑制人類血漿中由達比加群誘導之凝結時間延長。

圖 7：小鼠單株抗體(純系 22)逆轉人類血漿中達比加群醯基葡萄糖苷酸之抗凝血效應。添加遞增濃度之小鼠抗體至已與 7 nM 達比加群醯基葡萄糖苷酸或達比加群一起預培育之人類血漿中。分析藉由添加 0.4 U/mL 凝血酶起始且量測凝結時間。100% 抑制定義為完全阻斷化合物介導之凝結時間增加。抗體以劑量依賴性方式抑制人類血漿中由達比加群醯基葡萄糖苷酸誘導之凝結時間延長。

圖 8：所選嵌合抗體在凝血酶凝結時間分析中抑制達比加群活性。添加遞增濃度之抗體至已與 7 nM 達比加群一起預培育之人類血漿中。完整抗體亦作為陽性對照進行測

試。分析藉由添加0.4 U/mL凝血酶起始且量測凝結時間。100%抑制定義為完全阻斷達比加群介導之凝結時間增加。抗體以劑量依賴性方式抑制人類血漿中由達比加群誘導之凝結時間延長。

圖9：Fab VH5c/Vk18 (SEQ ID NO: 99及SEQ ID NO: 100)及VH5c/Vk21 (SEQ ID NO: 99及SEQ ID NO: 101)在凝血酶凝結時間分析中抑制達比加群活性。如上所述進行分析。

圖10：Fab-達比加群複合物之晶體結構。A：Fab 18/15 (WO2011089183)與達比加群之複合物之晶體結構。B：Fab VH5c/Vk18 (SEQ ID NO: 99及SEQ ID NO: 100)與達比加群之複合物之晶體結構。C：在具有Fab 18/15之晶體結構中所見之達比加群的構形。D：在具有VH5c/Vk18之晶體結構中所見之達比加群的伸長構形。

圖11：所計算之包含CDR (左版面)或完整Fv區(右版面)之 (A) Fab 18/15、(B) Fab VH5c/Vk18 及 (C) Fab VH5c/Vk18的空間聚集傾向(SAP)。

序列表

<110> 抗凝血劑解毒劑

<120> 德商百靈佳殷格翰國際股份有限公司

<140> 101111195

<141> 2012/03/29

<150> 61/469,207

<151> 2011/03/30

<160> 101

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 DBG22」
/生物體=「小家鼠」

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Ile Val Asp

1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 DBG22」
/生物體=「小家鼠」

<400> 2

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..14

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 DBG22」
/生物體=「小家鼠」

<400> 3

Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 DBG22」
/生物體=「小家鼠」

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 DBG22」
/生物體=「小家鼠」

<400> 5

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 DBG22」
/生物體=「小家鼠」



<400> 6
Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 35E6」
/生物體=「小家鼠」

<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..17
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 35E6」
/生物體=「小家鼠」

<400> 8
Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Arg

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 35E6」
/生物體=「小家鼠」

<400> 9

Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 35E6」
/生物體=「小家鼠」

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 35E6」
/生物體=「小家鼠」

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 35E6」
/生物體=「小家鼠」

<400> 12
Phe Gln Ala Ser His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 45B9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 13
Gly Val Ser Leu Phe Thr Tyr Asp Val Asp
1 5 10

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 45B9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 14
Val Met Trp Ser Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 45B9」
/生物體=「小家鼠」

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

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 45B9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 16
Gln Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..7
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 45B9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 17
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 45B9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 18
Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr



1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 48E1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 19
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Val Asp
1 5 10

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 48E1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 20
Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 48E1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 21
Asp Arg Trp Ser Pro Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 48E1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 22
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ile
1 5 10 15

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..7
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 48E1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 23
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 48E1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 24
Leu Gln Thr Thr His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 25
<211> 10

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 49F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 25

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Val Asp
1 5 10

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 49F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 26

Leu Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 49F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 27

Glu Arg Ser Gly Asp Ser Pro Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 49F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 49F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 29

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 49F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 30

Leu Gln Asn Ser His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 6A7F1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 31
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..14
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 6A7F1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 32
Ser Val Thr Arg Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 6A7F1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 33
Asp Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 6A7F1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 34

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 6A7F1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 35

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 6A7F1」
/生物體=「小家鼠」

<400> 36

Phe Gln Gly Ser Arg Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 2F1E5」
/生物體=「小家鼠」

<400> 37

Gly Phe Thr Leu Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..17

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 2F1E5」
/生物體=「小家鼠」

<400> 38

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 2F1E5」
/生物體=「小家鼠」

<400> 39

Ser Ala Gly Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..15

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 2F1E5」
/生物體=「小家鼠」

<400> 40

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 2F1E5」
/生物體=「小家鼠」

<400> 41

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 2F1E5」
/生物體=「小家鼠」

<400> 42

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 3B4E7」
/生物體=「小家鼠」

<400> 43

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Thr Ile His
1 5 10

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..17

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 3B4E7」
/生物體=「小家鼠」

<400> 44

Tyr Ile Asn Pro Ala Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 3B4E7」
/生物體=「小家鼠」

<400> 45

Gly Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 3B4E7」
/生物體=「小家鼠」

<400> 46

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 3B4E7」
/生物體=「小家鼠」

<400> 47

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 3B4E7」
/生物體=「小家鼠」

<400> 48

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 1F6G8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 49
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Ile His
1 5 10

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..17
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 1F6G8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 50
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ile Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 1F6G8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 51
Gly Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 52
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 1F6G8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 52

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Gln Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 1F6G8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 53

Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 1F6G8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 54

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 2D2E3」
/生物體=「小家鼠」

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Thr His Ser Gly Met Asn
1 5 10

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..18

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 2D2E3」
/生物體=「小家鼠」

<400> 56

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Asn
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 2D2E3」
/生物體=「小家鼠」

<400> 57

Ser Trp Trp Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 2D2F8」
/生物體=「小家鼠」

<400> 58
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..7
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 2D2E3」
/生物體=「小家鼠」

<400> 59
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 2D2E3」
/生物體=「小家鼠」

<400> 60
Phe Gln Gly Ser His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 27A9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 61
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Cys Tyr Met His

1

5

10

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..17

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 27A9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 62

Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Arg

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR3 27A9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 63

Gly Thr Ser Gly Tyr Glu Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR1 27A9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 64

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR2 27A9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 65

Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 27A9」
/生物體=「小家鼠」

<400> 66

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR1 5C」
/生物體=「小家鼠」

<400> 67

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..17
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VHCDR2 5C」
/生物體=「小家鼠」

<400> 68
Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VKCDR3 18」
/生物體=「小家鼠」

<400> 69
Phe Gln Ala Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 70
<211> 122
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..122
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「DBG22VH」
/生物體=「小家鼠」

<400> 70
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

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

<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「DBG22VK」
/生物體=「小家鼠」

<400> 71
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..119

<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「35E6VH」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 72

```

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

```

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..112

<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「35E6VK」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 73

```

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

```

100

105

110

<210> 74
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..118
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「45B9VH」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 74
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Phe Thr Tyr
 20 25 30
 Asp Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Asp Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Met Trp Ser Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Ile Met Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Ser Gly Leu Gln Thr Asp Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Thr Asp Arg Trp Ser Pro Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 75
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..112
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「45B9VK」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 75
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Leu Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Leu Gln Ser
85 90 95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 76
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..118
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「48E1VH」
/生物體=「小家鼠」

<400> 76
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Asp Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ile Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Ser Asp Arg Trp Ser Pro Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 77
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「48E1VK」
/生物體=「小家鼠」

<400> 77
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ile Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Phe Tyr Cys Leu Gln Thr
85 90 95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 78
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..118
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「49F8VH」
/生物體=「小家鼠」

<400> 78
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Leu Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Phe Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Ser Glu Arg Ser Gly Asp Ser Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 79
<211> 112

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「49F8VK」
/生物體=「小家鼠」

<400> 79
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ile Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Glu Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Leu Gln Asn
85 90 95
Ser His Phe Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 80
<211> 117
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..117
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「6A7F1VH」
/生物體=「小家鼠」

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


```

      85              90              95
Arg Asp Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
      100              105              110
Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 81
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..112
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「6A7F1VK」
 /生物體=「小家鼠」

```

<400> 81
Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
      20              25              30
Asn Gly Asp Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
      35              40              45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val 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 Arg Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100              105              110

```

<210> 82
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..118
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「3B4E7VH」
 /生物體=「小家鼠」

```

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr

```

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

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「3B4E7VK」
/生物體=「小家鼠」

<400> 83
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 Asn Ile Ile Gln Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val 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 Asn Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 84
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..118

<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「2F1E5VH」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 84

```

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

```

<210> 85

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..111

<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「2F1E5VK」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 85

```

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

```

<210> 86
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..118
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「1F6G8VH」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 86
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Thr Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Arg Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ala Gly Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 87
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..112
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「1F6G8VK」
 /生物體=「小家鼠」

<400> 87
 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 Asn Ile Val Gln Thr
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser 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 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..120
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「2D2E3VH」
/生物體=「小家鼠」

<400> 88
Gln Ala Gln Ile His Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro
1 5 10 15
Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
His Ser Gly Met Asn Trp Met Lys Gln Thr Pro Gly Lys Asp Leu Lys
35 40 45
Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu
50 55 60
Glu Phe Asn Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95
Phe Cys Ala Arg Ser Trp Trp Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 89
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「2D2E3VK」
/生物體=「小家鼠」



<400> 89

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Gln Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Ile 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 Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
           100           105           110

```

<210> 90

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..119

<223> /分子類型=「蛋白質」

/註釋=「27A9VH」

/生物體=「小家鼠」

<400> 90

```

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

```

<210> 91

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「27A9VK」
/生物體=「小家鼠」

<400> 91
Asn Ile 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 Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe 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

<210> 92
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..119
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VH5C」
/生物體=「人工序列」

<400> 92
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 93
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VK18」
/生物體=「人工序列」

<400> 93
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 94
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「VK21」
/生物體=「人工序列」

<400> 94
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser


```

      35              40              45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
  50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Lys Ile
  65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
      85              90              95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100              105              110

```

<210> 95

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..452

<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「純系22嵌合HC」
 /生物體=「人工序列」

<400> 95

```

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

```

210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro Gly Lys
450

<210> 96
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..219
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「純系22嵌合LC」
/生物體=「人工序列」

<400> 96
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

```

      35              40              45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
      85              90              95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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 Lys 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> 97
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..107
 <223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「hCL域」
 /生物體=「智人」

```

<400> 97
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1              5              10              15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      20              25              30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
      35              40              45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      50              55              60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      65              70              75              80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      85              90              95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

```

<210> 98
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..330
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「hCH域」
/生物體=「智人」

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

275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 99
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..222
<223> /分子類型=「蛋白質」
/註釋=「HCVH5C」
/生物體=「人工序列」

<400> 99
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

<210> 100
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..219
<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「LCVK18」
 /生物體=「人工序列」

<400> 100
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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 Lys 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> 101
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..219

<223> /分子類型=「蛋白質」
 /註釋=「LCVK21」
 /生物體=「人工序列」

<400> 101

```

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

```

七、申請專利範圍：

1. 一種達比加群(dabigatran)抗體分子，其包含具有選自由SEQ ID NO: 1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61及67組成之群之CDR1、選自由SEQ ID NO: 2、8、14、20、26、32、38、44、50、56、62及68組成之群之CDR2及選自由SEQ ID NO: 3、9、15、21、27、33、39、45、51、57及63組成之群之CDR3的重鏈可變域、以及具有選自由SEQ ID NO: 4、10、16、22、28、34、40、46、52、58及64組成之群之CDR1、選自由SEQ ID NO: 5、11、17、23、29、35、41、47、53、59及65組成之群之CDR2及選自由SEQ ID NO: 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66及69組成之群之CDR3的輕鏈可變域。
2. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 1之CDR1、SEQ ID NO: 2之CDR2及SEQ ID NO: 3之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 4之CDR1、SEQ ID NO: 5之CDR2及SEQ ID NO: 6之CDR3的輕鏈可變域。
3. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 7之CDR1、SEQ ID NO: 8之CDR2及SEQ ID NO: 9之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 10之CDR1、SEQ ID NO: 11之CDR2及SEQ ID NO: 12之CDR3的輕鏈可變域。
4. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 13之CDR1、SEQ ID NO: 14之CDR2及SEQ ID NO: 15之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 16之CDR1、SEQ

ID NO: 17之CDR2及SEQ ID NO: 18之CDR3的輕鏈可變域。

5. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 19之CDR1、SEQ ID NO: 20之CDR2及SEQ ID NO: 21之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 22之CDR1、SEQ ID NO: 23之CDR2及SEQ ID NO: 24之CDR3的輕鏈可變域。
6. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 25之CDR1、SEQ ID NO: 26之CDR2及SEQ ID NO: 27之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 28之CDR1、SEQ ID NO: 29之CDR2及SEQ ID NO: 30之CDR3的輕鏈可變域。
7. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 31之CDR1、SEQ ID NO: 32之CDR2及SEQ ID NO: 33之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 34之CDR1、SEQ ID NO: 35之CDR2及SEQ ID NO: 36之CDR3的輕鏈可變域。
8. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 37之CDR1、SEQ ID NO: 38之CDR2及SEQ ID NO: 39之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 40之CDR1、SEQ ID NO: 41之CDR2及SEQ ID NO: 42之CDR3的輕鏈可變域。
9. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 43之CDR1、SEQ ID NO: 44之CDR2及SEQ ID NO: 45之CDR3

的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 46之CDR1、SEQ ID NO: 47之CDR2及SEQ ID NO: 48之CDR3的輕鏈可變域。

10. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 49之CDR1、SEQ ID NO: 50之CDR2及SEQ ID NO: 51之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 52之CDR1、SEQ ID NO: 53之CDR2及SEQ ID NO: 54之CDR3的輕鏈可變域。
11. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 55之CDR1、SEQ ID NO: 56之CDR2及SEQ ID NO: 57之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 58之CDR1、SEQ ID NO: 59之CDR2及SEQ ID NO: 60之CDR3的輕鏈可變域。
12. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 61之CDR1、SEQ ID NO: 62之CDR2及SEQ ID NO: 63之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 64之CDR1、SEQ ID NO: 65之CDR2及SEQ ID NO: 66之CDR3的輕鏈可變域。
13. 如請求項1之抗體分子，其包含具有SEQ ID NO: 67之CDR1、SEQ ID NO: 68之CDR2及SEQ ID NO: 9之CDR3的重鏈可變域，以及具有SEQ ID NO: 64之CDR1、SEQ ID NO: 65之CDR2及SEQ ID NO: 69之CDR3的輕鏈可變域。
14. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 70之重鏈可

變域及SEQ ID No: 71之輕鏈可變域。

15. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 72之重鏈可變域及SEQ ID No: 73之輕鏈可變域。

16. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 74之重鏈可變域及SEQ ID No: 75之輕鏈可變域。

17. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 76之重鏈可變域及SEQ ID No: 77之輕鏈可變域。

18. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 78之重鏈可變域及SEQ ID No: 79之輕鏈可變域。

19. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 80之重鏈可變域及SEQ ID No: 81之輕鏈可變域。

20. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 82之重鏈可變域及SEQ ID No: 83之輕鏈可變域。

21. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 84之重鏈可變域及SEQ ID No: 85之輕鏈可變域。

22. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 86之重鏈可變域及SEQ ID No: 87之輕鏈可變域。

23. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 88之重鏈可變域及SEQ ID No: 89之輕鏈可變域。

24. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 90之重鏈可變域及SEQ ID No: 91之輕鏈可變域。

25. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 92之重鏈可變域及SEQ ID NO: 93之輕鏈可變域。

26. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 92之重鏈可

變域及SEQ ID NO: 94之輕鏈可變域。

27. 如請求項1至26中任一項之抗體分子，其中該輕鏈可變域融合於SEQ ID NO: 97之恆定域。
28. 如請求項1至25中任一項之抗體分子，其中該重鏈可變域融合於SEQ ID NO: 98之恆定域。
29. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 95之重鏈及SEQ ID No: 96之輕鏈。
30. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 99之重鏈及SEQ ID No: 100之輕鏈。
31. 如請求項1之抗體分子，其包含SEQ ID NO: 99之重鏈及SEQ ID No: 101之輕鏈。
32. 如請求項1至26及29至31中任一項之抗體分子，其為多株抗體；單株抗體；人類抗體；人類化抗體；嵌合抗體；抗體之片段，特定言之Fab、Fab'或F(ab')₂片段；單鏈抗體，特定言之單鏈可變片段(scFv)；小模組免疫醫藥(Small Modular Immunopharmaceutical；SMIP)；域抗體；奈米抗體；雙功能抗體；或經設計之錨蛋白重複蛋白(Designed Ankyrin Repeat Protein；DARPin)。
33. 如請求項1至26及29至31中任一項之抗體分子，其係用於醫藥中。
34. 如請求項1至26及29至31中任一項之抗體分子，其係用於療法中或預防抗凝血劑療法之副作用及/或逆轉抗凝血劑之過度給藥。
35. 如請求項34之抗體分子，其中該副作用為出血事件。

36. 一種如請求項1至35中任一項之抗體分子之用途，其係用於製造用於治療或預防抗凝血劑療法之副作用或抗凝血劑療法中之過度給藥事件的藥劑。
37. 一種製造如請求項1至35中任一項之抗體分子之方法，其包含
- (a) 提供包含與表現控制序列功能性締合之一或多個編碼該抗體分子之核酸的宿主細胞，
 - (b) 培養該宿主細胞，及
 - (c) 自該細胞培養物回收該抗體分子。
38. 一種套組，其包含如請求項1至32中任一項之抗體或其醫藥組合物。
39. 一種套組，其包含：
- (a) 如請求項1至32中任一項之抗體或其醫藥組合物；
 - (b) 容器；及
 - (c) 標籤。
40. 一種套組，其包含如請求項1至32中任一項之抗體，及達比加群、達比加群酯(dabigatran etexilate)、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽。
41. 一種如請求項1至35中任一項之抗體分子之用途，其係用於製造用於中和或部分中和正用達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽治療之患者中的達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸之藥劑。
42. 一種確定欲投於患者之達比加群或達比加群之1-O-醯基

葡萄糖苷酸之量的活體外方法，其包含：

- (a) 對取自正用達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽治療且服用如請求項7至20中任一項之抗體之患者的樣品進行凝結或凝血測試或分析，以測定不存在達比加群或達比加群之1-O-醯基葡萄糖苷酸的情況下，凝塊形成之程度；及
- (b) 調整向該患者投與之達比加群、達比加群酯、達比加群之前藥或其醫藥學上可接受之鹽的量以在患者中達成凝塊形成與降解之間的適當平衡。

八、圖式：

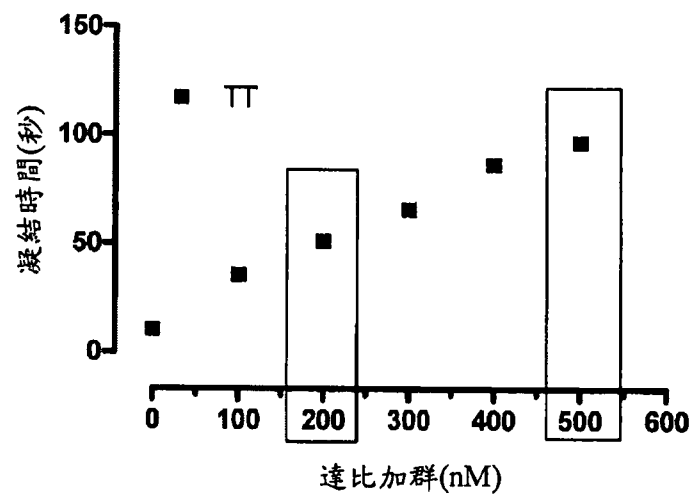


圖 1

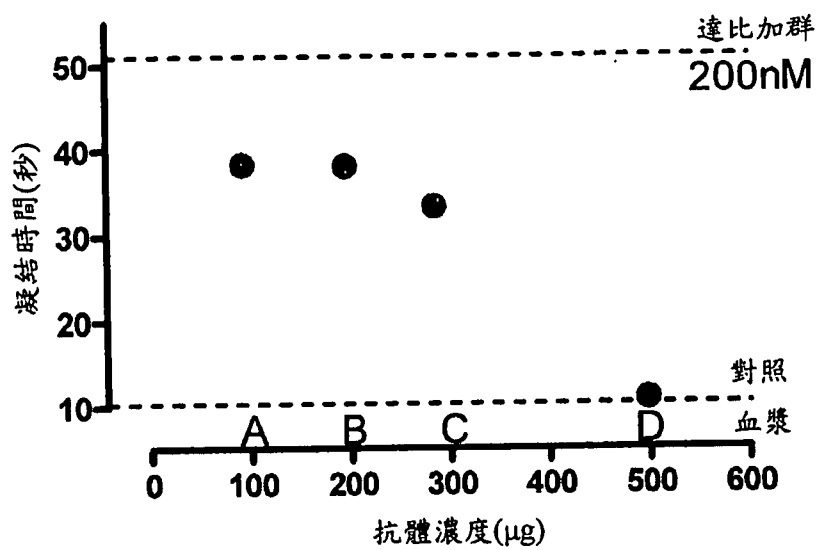
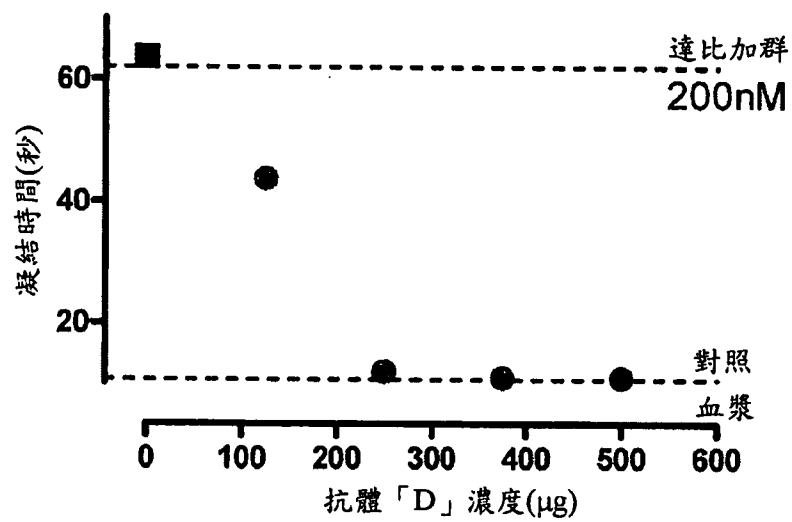


圖2



■ 非特異性多株Ab (167 μg)+ 200 nM達比加群

圖3

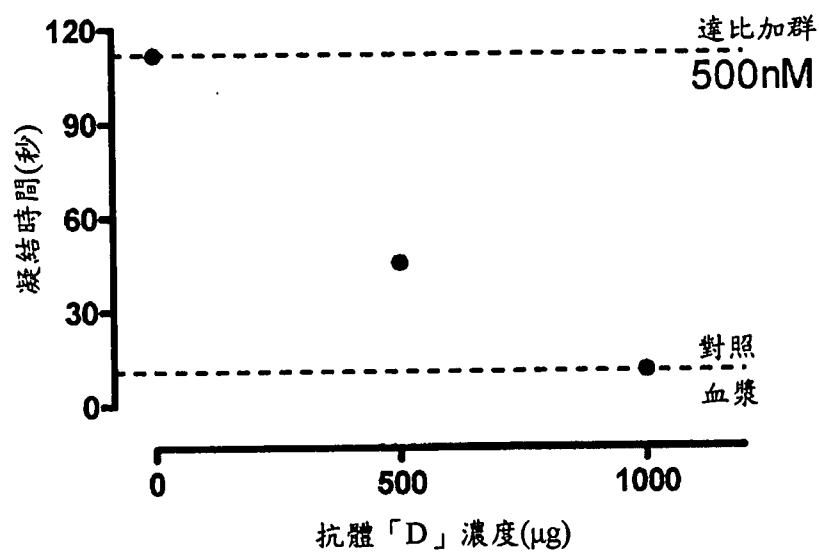


圖 4

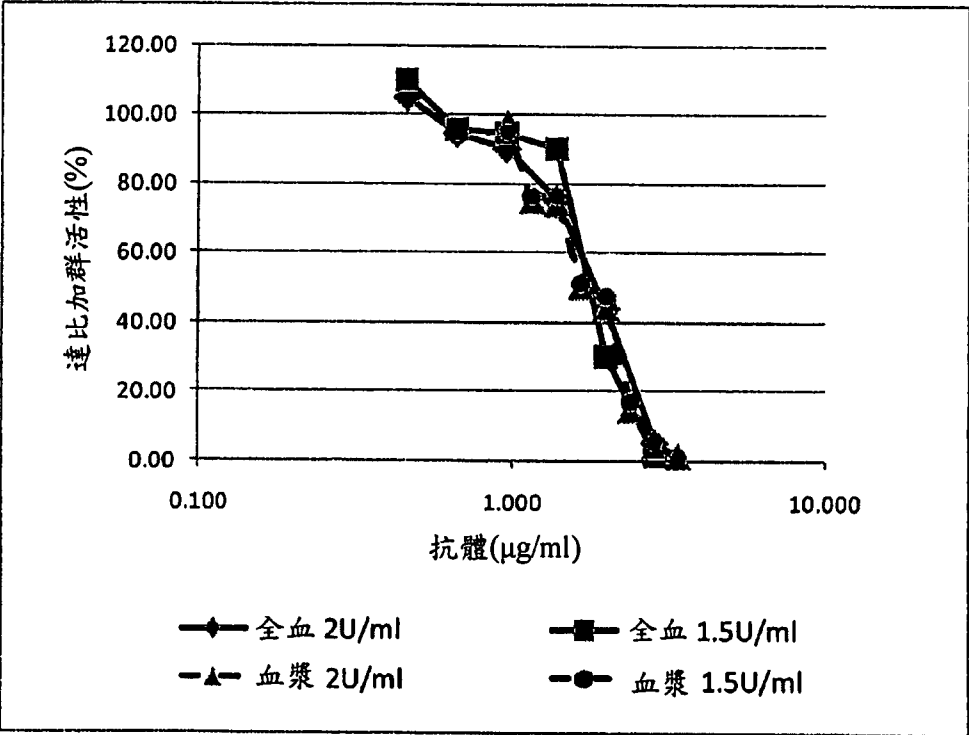


圖5

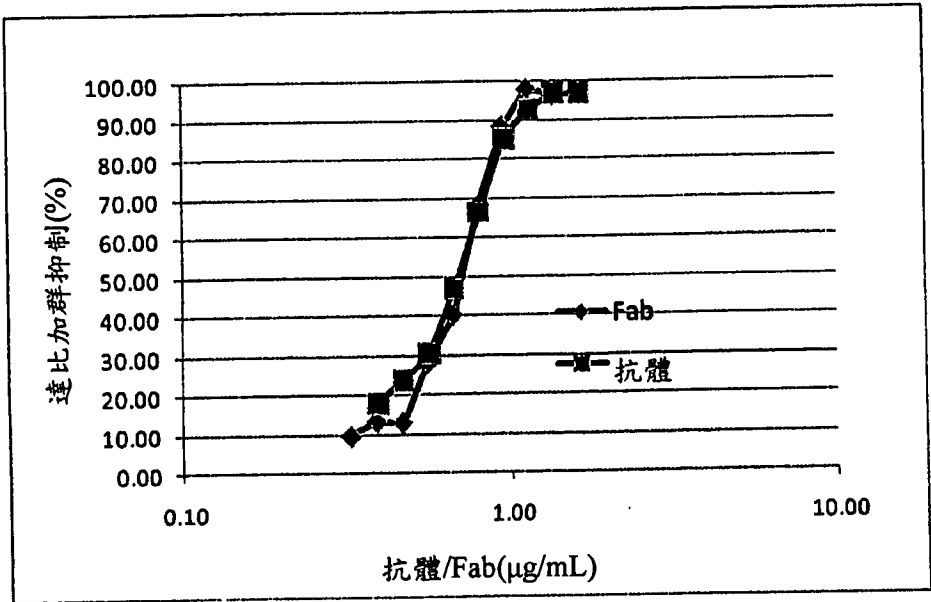


圖6

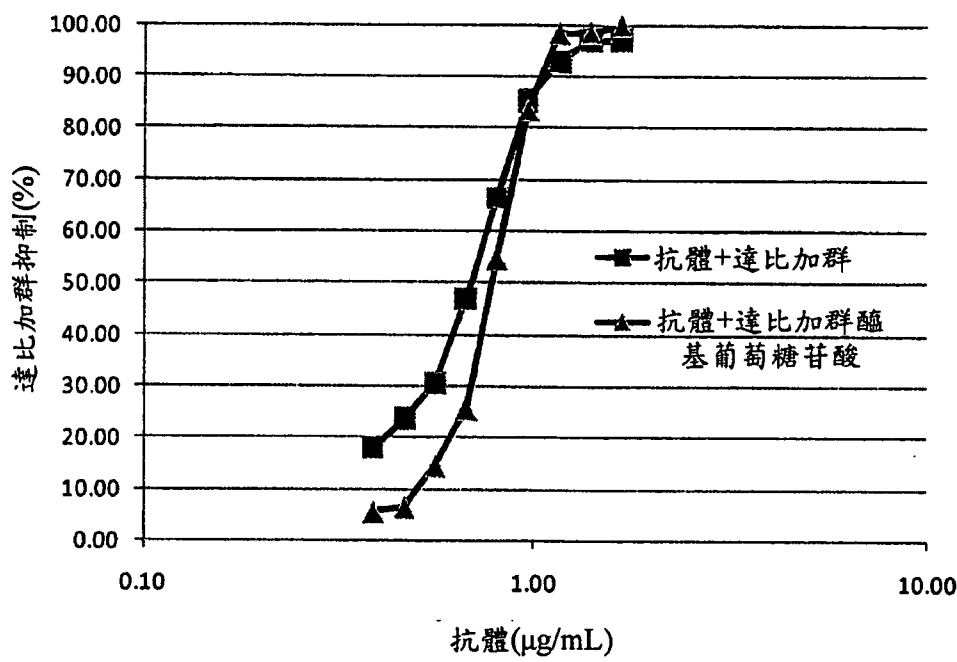


圖 7

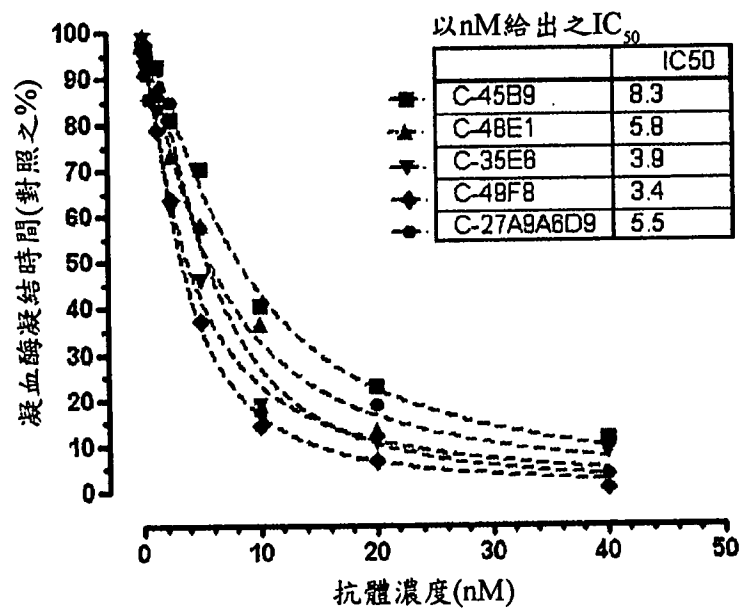


圖8

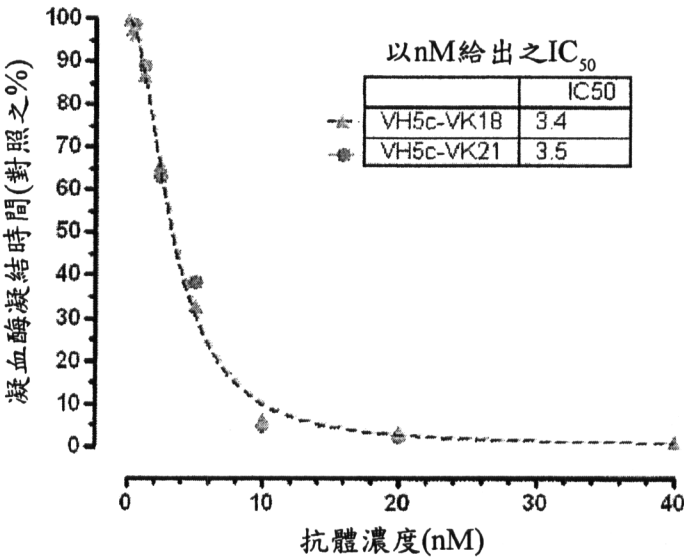


圖 9

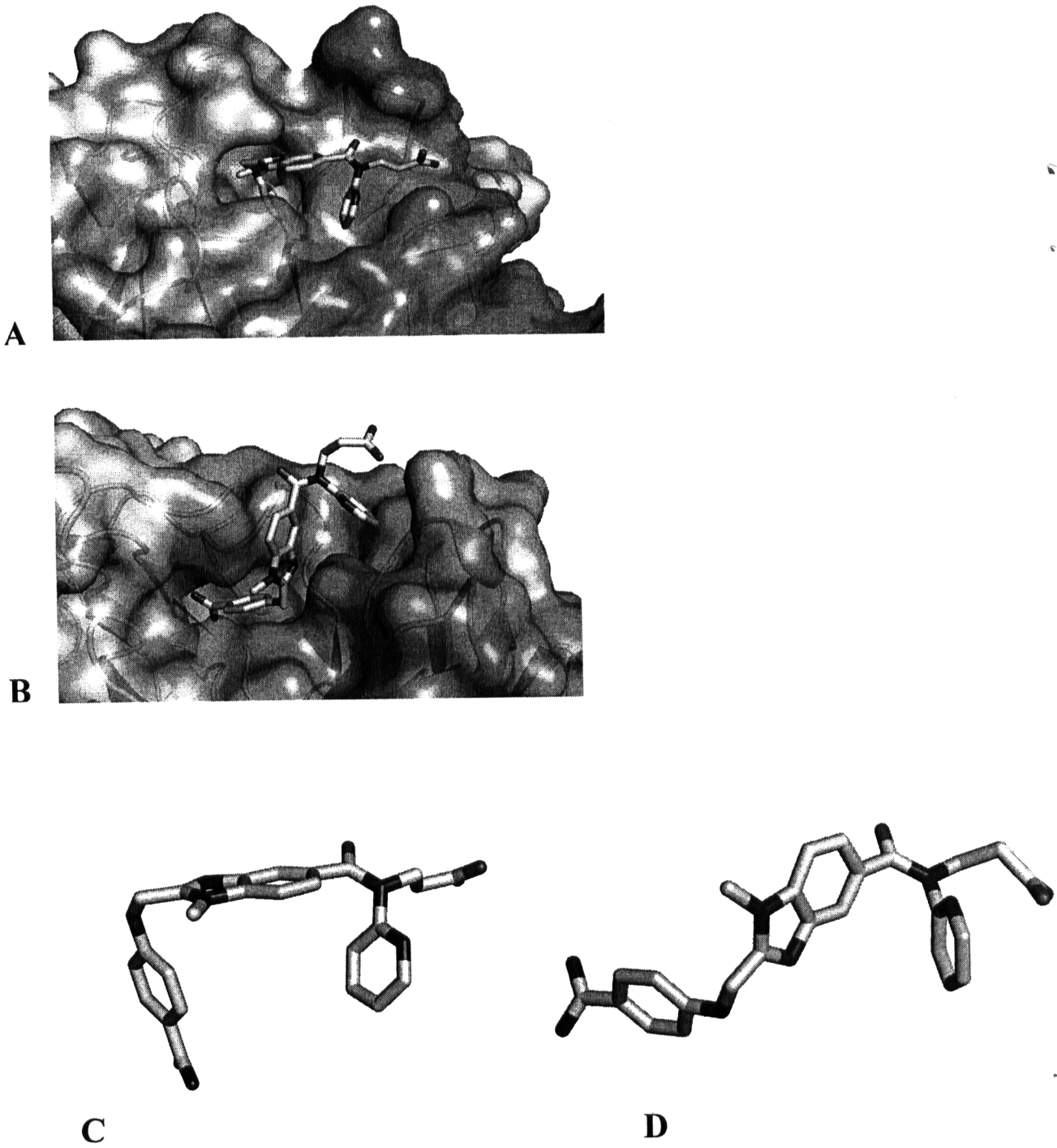
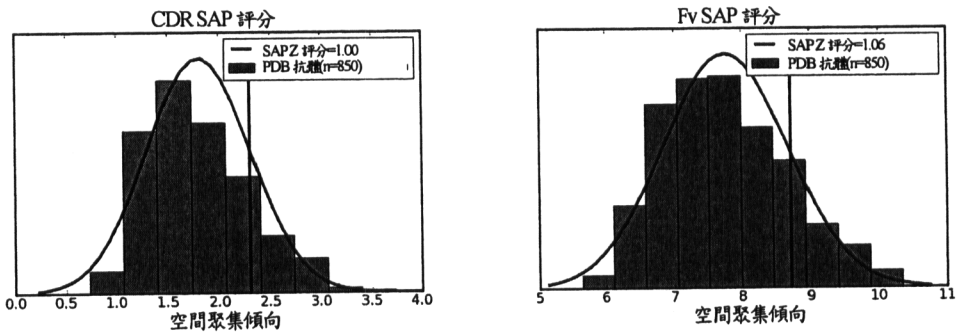
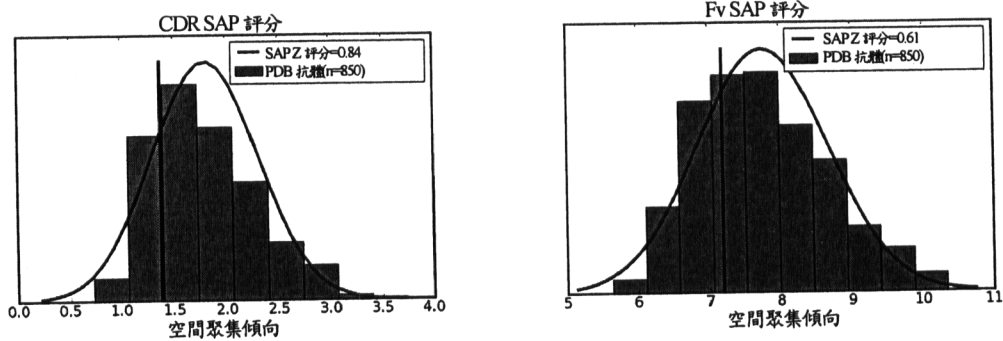


圖10

A) Fab 18/15



B) Fab VH5C/VK18



C) Fab VH5C/VK21

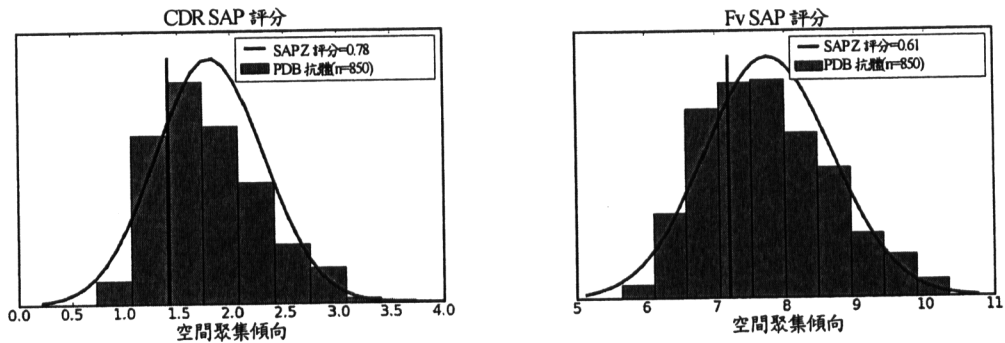


圖 11