



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I577696 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：101138704

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K16/44 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

(30)優先權：2011/10/20 美國

61/549,482

(71)申請人：E S B A 科技 諾華有限責任公司 (瑞士) ESBATECH- A NOVARTIS COMPANY
LLC (CH)

瑞士

(72)發明人：雷格勒 艾斯翠德 C RIEGLER, ASTRID C. (AT)；波雷斯 里歐納度 J BORRAS,
LEONARDO JOSE (CR)；索瑪維拉 羅伯托 SOMMAVILLA, ROBERTO (IT)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

WO 2009/000099A2

WO 2009/155723A2

Miller BR et al., "Stability engineering of scFvs for the
development of bispecific and multivalent antibodies", Protein
Engineering, Design & Selection, vol.23, no.7, p.549-557, 2010/07

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：0 共 66 頁

(54)名稱

穩定的多重抗原結合抗體

STABLE MULTIPLE ANTIGEN-BINDING ANTIBODY

(57)摘要

本發明提供了結合至多重抗原的抗體，該等抗體具有至少 2 個抗體輕鏈可變異領域與 2 個抗體重鏈可變異領域，其中各輕鏈可變異領域連接至一重鏈可變異領域以形成一種 VH/VL 建構物，以及其中該 VH 領域之至少一者包含一特定的胺基酸在 AHo 位置 12、103 及/或 144 處，以及該 VL 領域之至少一者包含一特定的胺基酸在 AHo 位置 47 及/或 50 處。也揭示了核酸分子、用於表現本發明之重組型抗體的載體和宿主細胞，用於單離其等之方法，以及該等抗體於醫學之用途。

The invention provides antibodies that bind to multiple antigens, said antibodies having at least two antibody light chain variable domains and two antibody heavy chain variable domains, wherein each light chain variable domain is linked to a heavy chain variable domain to form a VH/VL construct, and wherein at least one of the VH domains comprises a particular amino acid at AHo position 12, 103 and/or 144, and at least one of the VL domains comprises a particular amino acid at AHo position 47 and/or 50. Nucleic acid molecules, vectors and host cells for expression of the recombinant antibodies of the invention, methods for isolating them, and the use of said antibodies in medicine are also disclosed.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101/38 704

※申請日：101. 10. 19

※IPC 分類：C07K16/44 (2006.01)
C07K16/46 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

穩定的多重抗原結合抗體

STABLE MULTIPLE ANTIGEN-BINDING ANTIBODY

二、中文發明摘要：

本發明提供了結合至多重抗原的抗體，該等抗體具有至少2個抗體輕鏈可變異領域與2個抗體重鏈可變異領域，其中各輕鏈可變異領域連接至一重鏈可變異領域以形成一種VH/VL建構物，以及其中該VH領域之至少一者包含一特定的胺基酸在AHo位置12、103及/或144處，以及該VL領域之至少一者包含一特定的胺基酸在AHo位置47及/或50處。也揭示了核酸分子、用於表現本發明之重組型抗體的載體和宿主細胞，用於單離其等之方法，以及該等抗體於醫學之用途。

三、英文發明摘要：

The invention provides antibodies that bind to multiple antigens, said antibodies having at least two antibody light chain variable domains and two antibody heavy chain variable domains, wherein each light chain variable domain is linked to a heavy chain variable domain to form a VH/VL construct, and wherein at least one of the VH domains comprises a particular amino acid at AHo position 12, 103 and/or 144, and at least one of the VL domains comprises a particular amino acid at AHo position 47 and/or 50. Nucleic acid molecules, vectors and host cells for expression of the recombinant antibodies of the invention, methods for isolating them, and the use of said antibodies in medicine are also disclosed.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。 (無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

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】

相關申請案的交叉引述

本申請案主張於2011年10月20日提申之美國臨時專利申請案第61/549,482號的優先權，其之全部內容被併入本文中以為參考資料。

發明領域

本發明係有關於一種穩定的多重抗原結合抗體，其具有至少2個抗體輕鏈可變異領域、2個抗體重鏈可變異領域，以及缺少守恆領域，其中各輕鏈可變異領域連接至一重鏈可變異領域以形成一種VH/VL建構物，以及該VH領域之至少一者包含在A_HO位置12、103及/或144處之特定的胺基酸，以及該VL領域之至少一者包含在A_HO位置47及/或50處之特定的胺基酸。本發明進一步有關於生產此等抗體的方法，以及包含此等抗體的藥學組成物。

【先前技術】

發明背景

能夠結合至超過一個抗原之抗體分子作為治療涉及多重蛋白的疾病之可能的療劑為令人嚮往的。舉例而言，通常希望可以對準相同的信息傳導路徑內之二種蛋白質或是藉由對準各路徑內之一蛋白質來調變二個不同的路徑之活動。此等抗體之實例包括多重專一性抗體(例如，結合二個不同的標靶分子之雙專一性(bispecific)抗體)與多價抗體(例如，結合一個標靶分子之二個不同的結合位址之二價抗

體)。治療性抗體的領域已經發展數個方法來組合二種治療性抗體成為一種單一的分子以利用加成的或是協同的作用同時維持穩定性和其他希望的性質。此等方法包括重組型格式，譬如串聯單鏈可變異片段(TdscFv) (Hagemeyer等人，2009, *Thromb Haemost* 101:1012-1019；Robinson等人，2008, *Br J Cancer* 99:1415-1425)、雙價抗體(diabodies) (Hudson等人，1999, *J Immunol Methods* 231:177-189)、串聯雙價抗體 (Kipriyanov, 2009, *Methods Mol Biol* 562:177-193)、二合一抗體 (Bostrom等人，2009, *Science* 323:1610-1614)，以及雙重的可變異領域之抗體(Wu等人，2007, *Nat Biotechnol* 25:1290-1297)。

二個組分治療性方法為有吸引力的一疾病之實例為脈絡膜新生血管。脈絡膜新生血管的血管組分包含血管內皮細胞、內皮細胞前驅物，以及外皮細胞。經由組織病理學似乎為血管形成刺激的來源且通常為體積的最大組分之血管外組分包含發炎細胞、膠細胞和視網膜色素細胞，以及纖維母細胞。組織損傷可以由任一的組分引起。各組分可以分別透過各種各樣的單一療法(monotherapies)來對準。然而，一種對抗血管內皮生長因子(VEGF)和腫瘤壞死因子(TNF)之雙專一性抗體代表同時地攻擊兩個組分的機會。

與多重專一性與多價抗體有關聯的共同問題為低劣的穩定性，以及有生產的產率、純度，和親和性之問題。已經發展出處理此等問題之各種各樣的方法，包括合理的設計以及定向的進化(Mabry and Snavelly, 2010, *IDrugs*

13:543-549)。然而，此等方法耗費時間以及尚未提供普遍可適用的結果。

因此，本技藝中對於一種多重專一性與多價抗體格式有一需求，該抗體格式為穩定且可溶的，以及缺少傳統的多重專一性與多價抗體格式之缺點。

【發明內容】

發明概要

本發明提供了結合至多重抗原的抗體，例如雙專一性(bispecific)及二價抗體，其包含於可變異重鏈及/或可變異輕鏈內之特定位置處的某些胺基酸殘基，其等為高度穩定的分子。

於一個態樣中，本發明提供了多重抗原結合抗體分子，其包含：

a) 2個重鏈可變異領域，一者帶有對抗原A之專一性(VH-A)且一者帶有對抗原B之專一性(VH-B)，以及

b) 2個輕鏈可變異領域，一者帶有對抗原A之專一性(VL-A)且一者帶有對抗原B之專一性(VL-B)，

其中該2個重鏈可變異領域之至少一者包含下列的至少一者：在A_HO位置12處之絲胺酸、在A_HO位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在A_HO位置144處之絲胺酸或蘇胺酸；及/或其中該2個輕鏈可變異領域之至少一者包含在A_HO位置50處之精胺酸。

於某些態樣中，該VH-A係聯結至VL-A以形成一個帶有關於抗原A之專一性的單鏈抗體(scFv A)以及VH-B係聯

結至VL-B以形成一個帶有關於抗原B之專一性的單鏈抗體(scFv B)。

於一個態樣中，本發明提供了一種多重抗原結合抗體分子，其包含：一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子1而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成一種VH-A/VL-B建構物；一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子2而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成一個VH-B/VL-A建構物；其中該多重抗原結合抗體之缺少守恆領域，VL-A與VL-B之至少一者包含在AHo位置50處的精胺酸，以及VH-A與VH-B之至少一者包含下列的至少一者：在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

於某些態樣中，一種VH-A/VL-B建構物係處於VH-A-(連接子1)-VL-B的方位或是VH-B-(連接子1)-VL-A的方位。於其他的態樣中，一種VH-B/VL-A建構物係處於VH-B-(連接子2)-VL-A的方位或是VH-A-(連接子2)-VL-B的方位。

於另一個態樣中，VL-A或VL-B的至少一者包含一框架序列，其與序列辨識編號：6的序列有至少65%的同一性。

於另一個態樣中，VH-A或VH-B的至少一者包含一框架序列，其與序列辨識編號：7的序列有至少80%的同一性。

於另一個態樣中，VL-A/VH-B與VH-B/VL-A建構物的

至少一者包含一種人類Vk1家族輕鏈可變異區域、一種人類Vλ1家族輕鏈可變異區域，或是一種人類Vk3家族輕鏈可變異區域。

於另一個態樣中，VL-A/VH-B與VH-B/VL-A建構物的至少一者包含一種人類VH3家族重鏈可變異區域、一種人類VH1a家族重鏈可變異區域，或是一種人類VH1b家族重鏈可變異區域。

於另一個態樣中，VH領域和VL領域包含來自一種兔類動物(lagomorphs)的CDRs。

於另一個態樣中，本發明進一步提供一種多重抗原結合抗體，其包含：

a) 一單鏈抗體，其包含一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子3而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成scFv-A；

b) 一單鏈抗體，其包含一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子3而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成scFv-B；

其中scFv-A係藉由胜肽連接子1而聯結至scFv-B，以及VL-A與VL-B之至少一者包含在A_{Ho}位置50處的精胺酸，以及VH-A與VH-B之至少一者包含下列的至少一者：在A_{Ho}位置12處之絲胺酸、在A_{Ho}位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在A_{Ho}位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

於一個態樣中，本發明的多重抗原結合抗體包含為下列格式之一種帶有關於抗原A之專一性的單鏈抗體以及一種帶有關於抗原B之專一性的單鏈抗體：VH-A/VL-A-連接子-VH-B/VL-B。於一個較佳的態樣中，連接子具有20個胺基酸。於另一個較佳的態樣中，該連接子具有序列辨識編號：4的序列。

於再另一個態樣中，本發明提供了一種多重抗原結合抗體分子，其包含：來自一兔類動物的CDRs；一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子1而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成一個VH-A/VL-B建構物；一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子2而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成一個VH-B/VL-A建構物；其中該重鏈可變異領域之至少一者包含下列的至少三者：在AHo位置24處之蘇胺酸(T)、在AHo位置25處之纈胺酸(V)、在AHo位置56處之丙胺酸(A)或甘胺酸(G)、在AHo位置82處之離胺酸(K)、在AHo位置84處之蘇胺酸(T)、在AHo位置89處之纈胺酸(V)以及在AHo位置108處之精胺酸(R)。於某些態樣中，此等抗體於可變異輕鏈領域之至少一者內進一步包含在AHo位置1處之麩胺酸(E)、在AHo位置3處之纈胺酸(V)、在AHo位置4處之白胺酸(L)、在AHo位置10處之絲胺酸(S)；在AHo位置47處之精胺酸(R)、在AHo位置57處之絲胺酸(S)、在AHo位置91處之苯丙胺酸(F)及/或在AHo位置103處之纈胺酸

(V)。

本發明之特定的較佳具體例從下列某些較佳具體例以及申請專利範圍之更詳細的說明會變得明顯。

【實施方式】

詳細說明

本文中所顯示的詳細情況係作為實例且僅僅為了本發明的較佳具體例之作例證的討論之目的，以及為了提供相信何者為最有用的實例且容易了解本發明之各種各樣的具體例之原理和概念的態樣之說明的原因而提出。在此方面，並不試圖顯示比本發明之基本了解所必需的更詳細之本發明之結構上的細節，說明以及圖示及/或實施例會使得本技藝中具有技術者對於可以如何實際地實施本發明之數個形式為顯而易見的。

為了更容易了解本發明，某些術語係定義如下且如同於詳細說明中各處提出的。定義和解釋係意指且打算支配任何未來的解釋，除非於下列之實施例中明確且清楚地修飾或是在該意義之應用會使任何的解釋成為無意義的或實質無意義之時。在術語之解釋會使其成為無意義的或實質無意義的事例中，應該由Webster's Dictionary，第3版或是熟悉此藝者已知的字典，譬如Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)取得定義。

本發明之總的目的是要提供能夠結合多重抗原的抗體，其等合適於治療性的用途。當本文中首次描述，當某

些胺基酸係存在於輕鏈可變異領域與重鏈可變異領域內之特定位置處時可以改善此等抗體的性質。此等改善的性質包括，舉例而言增加的穩定性、生產的產率，以及純度。

因而，本發明提供了結合至多重抗原的抗體，該等抗體包含：

a) 一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子1而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成一個VH-A/VL-B建構物；

b) 一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子2而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成一個VH-B/VL-A建構物；

其中VL-A與VL-B之至少一者包含在AHo位置47及/或50處的精胺酸，以及VH-A與VH-B的至少一者包含在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及/或在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。於一具體例中，一種VL包含在AHo位置50處之精胺酸，以及VH包含在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，及在AHo位置144處之蘇胺酸。

於一較佳的具體例中，本發明的一種抗體為一種缺少守恆領域之多重抗原結合抗體，譬如一種scFv抗體。

術語“scFv”係提及一種分子，其包含由一連接子所連接的一抗體重鏈可變異領域(或區域；VH)及一抗體輕鏈可

變異領域(或區域；VL)，以及缺少守恆領域。此等scFv分子可具有一般結構：NH₂-VL-連接子-VH-COOH或NH₂-VH-連接子-VL-COOH。本文內所說明之適合的連接子為熟悉此藝者已知的，包括舉例而言，國際專利申請案 WO 2010/006454之內所說明的。

當使用於本文中，一種“多重抗原結合抗體”為一種抗體，其具有至少四個可變異領域且能結合不同的標靶分子之二個或更多個抗原(例如，一種雙專一性抗體)或是同一個標靶分子之二個或更多個抗原(例如，一種二價抗體)。本發明的多重抗原結合抗體之形式包括，但不限於，一個雙價抗體、一個單鏈雙價抗體，以及一個串聯抗體，如同熟悉此藝者已知的。

一種“雙專一性抗體”當使用於本文中為一種能結合至二個不同的標靶分子之抗體。

一種“二價抗體”當使用於本文中為一種能結合至一個標靶分子之二個不同的位址之抗體。

於某些具體例中，本發明的多重抗原結合抗體之VL包含本文已經顯示之至少一個特定位置處之至少一個特定的胺基酸來改善一種多重抗原結合抗體的格式之穩定性，以及本發明的多重抗原結合抗體之VH包含本文已經顯示的三個特定的位置處之至少一者處之三個特定的胺基酸之至少一者來改善一種多重抗原結合抗體的格式之穩定性。於一特定的具體例中，VL內之位置為AHo位置50及/或AHo位置47處，以及於該位置處之胺基酸為精胺酸。於另一特定

的具體例中，VH內之位置為AHo位置12、103，及144處，以及於該位置處之較佳的胺基酸為：在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，以及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。於一較佳的具體例中，VH內之胺基酸為在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，以及在AHo位置144處之蘇胺酸。於某些具體例中，此等較佳的胺基酸可以藉由取代已識別的位置處之天然存在的胺基酸而導入至VL及/或VH內。

AHo 編號系統係進一步說明於 Honegger, A. and Plückthun, A. (2001) *J Mol. Biol.* 309:657-670)之內。任擇地，可以使用如進一步說明於Kabat等人(Kabat, E. A., 等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)之內的Kabat編號系統。使用來識別抗體的重鏈和輕鏈可變異區域之內的胺基酸殘基位置之2種不同的編號系統的換算表係提供於A. Honegger, *J.Mol.Biol.* 309:657-670之內。VL之AHo位置47處之對應的Kabat號碼為39。VL之AHo位置50處之對應的Kabat號碼為42。VH之AHo位置12處之對應的Kabat號碼為11。VH之AHo位置103處之對應的Kabat號碼為89。VH之AHo位置144處之對應的Kabat號碼為108。

於另一具體例中，本發明進一步提供多重抗原結合抗體，其包含本文中揭示之較佳位置處之較佳的胺基酸之一或更多者，以及包含至少二種抗體的結合專一性，或是其

之抗體片段，其包括，例如，一種Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv，或是一單鏈Fv。此等抗體亦可以為一種輕鏈或重鏈二聚體，或其之任何的最小片段，譬如一種Fv或一種單鏈建構物，如同Ladner等人U.S.專利號碼4,946,778之中所說明的，其等之內容係明確併入以作為參考資料。於某些具體例中，此等多重抗原結合抗體包含至少一個VL，該VL具有在A_HO位置50處之精胺酸，以及至少一個VH，該VH具有在A_HO位置12處之絲胺酸、在A_HO位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在A_HO位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

連接子及VH/VL建構物

當使用於本文中，“胜肽連接子1”及“胜肽連接子2”係提及連結一VH/VL建構物內的可變異領域之彼此連接子胜肽互相，或是一或更多個scFv建構物在一起。一種“VH/VL建構物”可以為：一種VH-A/VL-B或VH-B/VL-A建構物，其包含一VH領域，該VH領域帶有結合至一特定的抗原之CDRs，以及一VL領域，該VL領域帶有結合至不同的抗原之CDRs；或是一種VH-A/VL-A或VH-B/VL-B建構物，其包含一VH領域，該VH領域帶有結合至一特定的抗原之CDRs，以及一VL領域，該VL領域帶有結合至相同的抗原之CDRs。此等建構物的形式可以為VH-L-VL或VL-L-VH，該處L為胜肽連接子1或2。此等胜肽連接子較佳為少於或等於大約20個胺基酸長。尤其，此等胜肽連接子為1、2、3、4、5、6、7、8、9，或10個胺基酸長。於某些具體例中，該等胜肽連接子為3-7個胺基酸長。胜肽連接子1及/或胜肽

連接子2之較佳的連接子序列為GGGGS(序列辨識編號：1)。於本發明的多重抗原結合抗體之內的胜肽連接子1及/或胜肽連接子2之其他有用的連接子序列包括：GGS和GGGGGGS(序列辨識編號：2)。於某些具體例中，一VH/VL建構物可以為一種單鏈抗體。單鏈抗體內的連接子為本技藝中已知的。較佳地，一種單鏈抗體連接一VH及VL領域的連接子，該領域係結合至本發明的抗體內之一個較佳的抗原，可以為高達20個胺基酸，舉例而言具有以下顯示的序列辨識編號：4的序列。

於某些具體例中，一種VH/VL建構物係藉由胜肽連接子3而連接至另一種VH/VL建構物。於其他的具體例中，一種VH/VL建構物內之可變異領域係藉由胜肽連接子3而彼此連接。胜肽連接子3較佳為超過大約10個胺基酸且低於大約30個胺基酸長。尤其，胜肽連接子3為10、11、12、13、14、15、16、17、18、19，或20個胺基酸長。於某些具體例中，胜肽連接子3為10-15個胺基酸長。胜肽連接子3之較佳的連接子序列為GSDSNAGRASAGNTS(序列辨識編號：3)。胜肽連接子3之另一種較佳的連接子序列為(GGGGS)4(序列辨識編號：4)。熟悉此藝者會認定可以進行連接子序列之守恆性變化(例如，取代)而不影響本發明的多重抗原結合抗體之活性和較佳的性質。

於某些具體例中，一VH/VL建構物可以為下列格式中之一者：VH-A-(連接子1或2)-VL-B；VH-B-(連接子1或2)-VL-A；VH-A-(連接子1或2)-VL-A；VH-B-(連接子1或

2)-VL-B；VL-A-(連接子1或2)-VH-A；VL-B-(連接子1或2)-VH-B。熟悉此藝者可以預期一VH/VL建構物內的VH及VL領域之其他的方位。舉例而言，VL-A-(連接子1或2)-VH-B、VL-B-(連接子1或2)-VH-A、VL-A-(連接子1或2)-VH-A、VL-B-(連接子1或2)-VH-B。於特定的具體例中，VH/VL建構物係藉由胜肽連接子3而連接的情況下，可以創造下列格式中之一者：VH-A-(連接子-1)-VL-A-(連接子3)-VH-B-(連接子2)-VL-B；VH-A-(連接子-1)-VL-B-(連接子3)-VH-B-(連接子2)-VL-A；VL-A-(連接子-1)-VH-B-(連接子3)-VL-B-(連接子2)-VH-A，VL-A-(連接子-1)-VH-A-(連接子3)-VL-B-(連接子2)-VH-B。本文中已識別的格式為非限制性的實例，以及應該容易了解到熟悉此藝者可以以各種各樣其他的方位來排列VH及VL領域，只要當建構物生產且恰當地摺疊時可完成標靶抗原之結合。

於一具體例中，本發明的多重抗原結合抗體包含為下列格式之一種帶有關於抗原A之專一性的單鏈抗體以及一種帶有關於抗原B之專一性的單鏈抗體：VH-A/VL-A-連接子3 - VH-B/VL-B，其中該連接子3具有序列辨識編號：4的序列。於一具體例中，本發明的多重抗原結合抗體之較佳格式為：VH-A-序列辨識編號：1-VL-B-序列辨識編號：4-VH-B-序列辨識編號：1-VL-A。

任擇地，本發明的VH/VL建構物可以彼此功能連接(例如，藉由化學耦合、基因融合、非共價締合或其他方式)以形成一種多重抗原結合抗體。

本發明提供了結合至多重抗原的抗體。當描述於本文中，此等抗體可以結合不同的標靶分子(例如，一種具有對至少二個不同的蛋白之專一性的雙專一性抗體)或是結合至同一個標靶分子上之不同的抗原決定區(例如，一種二價抗體，其具有對同一個蛋白之專一性但是結合該蛋白上二個或更多個不同的結合位址)。特定的標靶分子可以由熟悉此藝者取決於需要而選擇。

作為實例，以及非限制，本發明提供一種具有對VEGF和TNF α 之專一性的雙專一性抗體作為本文的實例中說明的。此一抗體對於治療希望抑制VEGF和TNF α 之疾病為有用的。

於某些具體例中，一種抗-VEGF/TNF α 抗體可以使用於治療老年性黃斑變性、脈絡膜新生血管、新生血管性青光眼、糖尿病視網膜病變、早產兒視網膜病變、晶狀體後纖維組織增生、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巢癌、昏迷(comas)、含睪丸細胞之卵巢腺瘤(arrhenoblastomas)、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮內膜增生、子宮內膜異位、纖維肉瘤、絨毛膜癌、頭頸癌、鼻咽癌、喉癌、肝母細胞瘤(hepatoblastoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑色素瘤、皮膚癌、血管瘤、海綿狀血管瘤、血管母細胞瘤、胰臟癌、視網膜母細胞瘤、星狀細胞瘤、神經膠母細胞瘤、神經鞘瘤、寡樹突神經膠細胞瘤、神經管胚細胞瘤、神經胚細胞瘤、橫紋肌肉瘤、骨原性肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、甲狀腺癌、威姆氏腫瘤

(Wilm's tumor)、腎細胞癌、攝護腺癌、與母班症 (phakomatoses)有關連的異常血管增殖、水腫(譬如與腦腫瘤有關連的)、梅格症候群(Meigs' syndrome)、類風濕性關節炎、牛皮癬、動脈粥狀硬化症、一般性發炎之慢性及/或自體免疫狀態、免疫媒介之一般性發炎性障礙、發炎性CNS疾病、侵襲眼睛、關節、皮膚、黏膜、中樞神經系統、胃腸道、泌尿道或肺臟之發炎性疾病、一般性眼色素層炎狀態、視網膜炎、HLA-B27+眼色素層炎、貝西氏病(Behcet's disease)、乾眼症、青光眼、修格連氏症候群(Sjögren syndrome)、糖尿病(incl. 糖尿病神經病變)、胰島素抗性、一般性關節炎狀態、類風濕性關節炎、骨關節炎、反應性關節炎及萊特氏病(Reiter's disease)、幼年型關節炎、僵直性脊椎炎、多發性硬化症、格巴二氏症候群(Guillain-Barre syndrome)、重症肌無力症、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、類肉瘤病、腎絲球腎炎、慢性腎病、膀胱炎、牛皮癬(包括乾癬性關節炎)、化膿性的汗腺炎(hidradenitis suppurativa)、脂層炎、壞疽性膿皮病、SAPHO症候群(滑膜炎、痤瘡、膿疱症(pustulosis)、骨肥厚與骨炎)、痤瘡、斯威特症候群(Sweet's syndrome)、天泡瘡(pemphigus)、克隆氏症(Crohn's disease) (incl. 腸外表現)、潰瘍性大腸炎、細支氣管氣喘、過敏性肺炎、一般過敏、過敏性鼻炎、過敏性鼻竇炎、慢性阻塞性肺臟疾病(COPD)、肺纖維化、韋格納肉芽腫(Wegener's granulomatosis)、川崎氏症候群(Kawasaki syndrome)、巨細胞動脈炎、變應性肉芽腫血管

炎(Churg-Strauss vasculitis)、結節性多動脈炎、燒傷、移植物對抗宿主反應、器官或骨髓移植後的排斥發作、一般性血管炎之全身性(sytemic)與局部狀態、全身性與盤狀紅斑狼瘡、多發性肌炎與皮膚炎、硬皮症、先兆子癇(pre-eclampsia)、急性與慢性胰臟炎、病毒性肝炎、酒精性肝炎、手術後發炎如眼睛手術後(如白內障(晶狀體置換)或青光眼手術)、關節手術(incl.關節內視鏡手術)、關節相關結構的手術(如韌帶)、口腔及/或牙齒的手術、最小侵入式心血管程序(如PTCA、動脈粥樣硬化切除術(atherectomy)、支架放置術(stent placement))、腹腔鏡及/或內視鏡腹膜內及婦科程序、內視鏡泌尿科程序(如攝護腺手術、輸尿管鏡、膀胱鏡、間質膀胱炎)，或是一般性術後發炎(預防)、阿茲海默症(Alzheimer disease)、帕金森氏病症、杭丁頓氏症、貝爾氏麻痺(Bell' palsy)、庫賈氏症(Creutzfeld-Jakob disease)。癌症相關的骨質溶解、癌症相關的發炎、癌症相關的疼痛、癌症相關的惡病質、骨轉移、急性與慢性形式的疼痛、不管此等疼痛是否由TNF α 之主要的或次要的作用引起以及其等是否歸類為發炎的、疼痛感受性(nociceptive)或神經病變性形式的疼痛、坐骨神經痛、下背痛、腕隧道症候群、複雜性區域疼痛症候群(CRPS)、痛風、帶狀疱疹後神經痛(postherpetic neuralgia)、纖維肌痛症候群(fibromyalgia)、局部疼痛狀態、轉移性腫瘤造成的慢性疼痛症候群、月經困難(dysmenorrhea)。細菌、病毒或真菌感染、結核病、AIDS、動脈粥樣硬化、冠狀動脈疾病、高血

壓、異常血脂症、心臟機能不全以及慢性心臟衰竭。

本發明之抗體的結合至其等之專一性標靶抗原可以藉由，舉例而言，酵素免疫分析法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、FACS分析、生物分析(例如，生長抑制)，或是藉由免疫墨點分析予以確認。此等分析的各者一般係藉由使用一種對有興趣的複合物專一之標記試劑(例如，一種抗體)而偵測出有特定興趣的蛋白-抗體複合物之出現。任擇地，複合物可以使用各種各樣的其他免疫分析法之任一者來偵測。舉例而言，該抗體可以予以放射性標記以及使用於放射免疫分析法(RIA)中(見，舉例而言，Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986，其係併入本文以作為參考資料)。放射性同位素可以藉由此等手段如使用一種 γ 計數器或一種閃爍計數器或是藉由自動放射照相術予以偵測。

本發明的抗體對於一些目的，包括治療及診斷的目的為有用的。

VL及VH領域的特徵

於某些具體例中，本發明的多重抗原結合抗體之VL和VH包含來自於一人類抗體、一非人類抗體(譬如一種大鼠、非人類靈長類動物、兔類動物，或任何其他合適的動物體內生產的一種抗體)、一種嵌合的抗體、一種擬人化的抗體，與類似物的CDRs。於一特定的具體例中，CDRs係來自於一種兔類動物。

術語“兔類動物(lagomorphs)”係提及分類兔形目(order Lagomorpha)的成員，其包含兔科鼠兔科(Leporidae) (例如，野兔與兔)，以及鼠兔科(Ochotonidae)(鼠兔)。於一最佳的具體例中，兔類動物為一種兔。術語“兔”當使用於本文中係提及一種屬於兔科的動物。

術語“CDR”係提及一抗體的可變異領域內之六個高度可變異或互補決定區的一個，其主要促成抗原結合。六個CDRs最常使用的一個定義為Kabat E.A. 等人(1991, Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242)提供的。於一些情況中，Kabat之CDRs的定義僅能適用於輕鏈可變異領域之CDR1、CDR2與CDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3，或是L1、L2、L3)，以及重鏈可變異領域之CDR2與CDR3(CDR H2、CDR H3，或是H2、H3)，而重鏈可變異領域之CDR1(CDR H1或H1)係由下列殘基來定義(Kabat編號)：重鏈的CDR1開始於位置26以及終止於位置36之前。此定義基本上為不同地由Kabat和Chothia所定義的聯合。

於一具體例中，本發明的一種多重抗原結合scFv抗體內之VL包含一序列，其與下列序列(序列辨識編號：5)有至少65%的同一性，更佳為至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳為99%的同一性：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGR APKLLIY(X)_{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFA TYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

於另一具體例中，本發明的一種多重抗原結合scFv抗

體內之VH包含一序列，其與下列序列(序列辨識編號：6)有至少80%的同一性，更佳為至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，更佳為99%的同一性：
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50} WVRQA PGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
 RFTISRDTSKNTVYLMNSLRAED TAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

當使用於本文中，X殘基為CDR插入位置。X可以為任何天然存在的胺基酸；可以存在至少3個以及高至50個胺基酸。了解到序列辨識編號：5與序列辨識編號：6的框架序列為沒有X殘基的序列。

有用於本發明的多重抗原結合抗體之內的合適抗體框架包括，但不限於：一種人類V κ 1家族輕鏈可變異區域、一種人類V λ 1家族輕鏈可變異區域、一種人類V κ 3家族輕鏈可變異區域、一種人類VH3家族重鏈可變異區域、一種人類VH1a家族重鏈可變異區域，以及一種人類VH1b家族重鏈可變異區域，其中該輕鏈可變異區域有或已經設計成具有(舉例而言經由天然存在的胺基酸之取代)在AHo位置47及/或50處之精胺酸，以及該重鏈可變異區域有或已經設計成具有(舉例而言經由天然存在的胺基酸之取代)在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

可以使用來產生本發明的多重抗原結合抗體之框架之非限制性的實例包括國際專利申請案WO 2008/004834、國際專利申請案WO 2009/155726，以及國際專利申請案WO 03/097697之內所揭示的該等框架，其等之整體內容係明確

併入以作為參考資料。於此等實例內，輕鏈可變異區域可以修飾成包括在AHo位置47及/或50處之精胺酸，以及重鏈可變異區域可以修飾成包括在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及/或在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

當使用於本文中，術語“抗體框架”、或“框架”係提及可變異領域之部分，不是VL就是VH，其等供用作為此可變異領域之抗原結合環(CDRs)的支架。在本質上其為沒有CDRs的可變異領域。

當使用於本文中，“同一性”係提及介於2個多肽、分子之間或介於2種核酸之間的序列配對。當2個比較的序列的二者內之一個位置被相同的鹼基或胺基酸單體次單元佔據(舉例而言，設若2個DNA分子的各者內之一個位置被腺嘌呤佔據，或是2個多肽的各者內之一個位置被離胺酸佔據)時，那麼在該位置之各自的分子為完全相同的。二序列之間的“百分比同一性”為2個序列所共有的配對位置之數目除以比較的位置之數目 $\times 100$ 之函數。舉例而言，設若2個序列內的位置之10個中的6個係配對的，那麼2個序列具有60%的同一性。作為實例，DNA序列的CTGACT與CAGGTT共有50%的同一性(6個總位置的3個係配對的)。一般而言，比較係在將2個序列排列成提供最大的同一性時進行。此排列可以使用，舉例而言，Needleman等人(1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453，便利地藉由電腦程式，譬如Align程式(DNAstar, Inc.)來實施，的方法來提供。介於2個胺基酸序列之間的百

分比同一性也能利用E. Meyers和W. Miller演算法(*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)予以決定，其已經併入ALIGN程式(版本2.0)，使用PAM120權重殘基表，12的間隔長度處罰以及4的間隔處罰。此外，介於2個胺基酸序列之間的百分比同一性可以利用Needleman與Wunsch(*J. Mol. Biol.* 48:444-453(1970))演算法予以決定，其已經併入GCG軟體包中之GAP程式(於www.gcg.com可取得)，使用一種Blossum 62矩陣或一種PAM250矩陣，以及16、14、12、10、8、6，或4的間隔權重(gap weight)和1、2、3、4、5，或6的長度權重(length weight)。

於一具體例中，本發明的多重抗原結合抗體包含兔類動物的CDRs以及包含下列的三、四、五、六，或是七者之一或更多個重鏈可變異領域：在A_Ho位置24處之蘇胺酸(T)、在A_Ho位置25處之纈胺酸(V)、在A_Ho位置56處之丙胺酸(A)或甘胺酸(G)、在A_Ho位置82處之離胺酸(K)、在A_Ho位置84處之蘇胺酸(T)、在A_Ho位置89處之纈胺酸(V)以及在A_Ho位置108處之精胺酸(R)。

於另一具體例中，本發明的多重抗原結合抗體包含兔類動物的CDRs以及在A_Ho位置1處之麩胺酸(E)、在A_Ho位置3處之纈胺酸(V)、在A_Ho位置4處之白胺酸(L)、在A_Ho位置10處之絲胺酸(S)；在A_Ho位置47處之精胺酸(R)、在A_Ho位置57處之絲胺酸(S)、在A_Ho位置91處之苯丙胺酸(F)及/或在A_Ho位置103處之纈胺酸(V)於可變異輕鏈領域之至少一者內。

核酸分子與載體

於一具體例中，本發明包括供用於生產本發明的一種多重抗原結合scFv抗體內之核酸分子。

術語“核酸分子”係提及DNA分子與RNA分子。一種核酸分子可以為單股或雙股，但是較佳為雙股DNA。一種核酸係“可操作地連結”，當其被放置至與另一個核酸序列的功能關係之內時。舉例而言，設若一啟動子或增強子影響一編碼序列的轉錄，則其係可操作地連結至該序列。於某些具體例中，本發明提供了經單離的核酸分子，其等編碼本發明的一抗體、本發明的一可變異輕鏈，及/或本發明之可變異重鏈。

於一具體例中，本發明的一種核酸分子編碼如本文中描述的一或更多個VH/VL建構物。舉例而言，本發明的一種核酸分子編碼一種為下列格式中之一者的VH/VL建構物：VH-A-(連接子1或2)-VL-B；VH-B-(連接子1或2)-VL-A；VH-A-(連接子-1)-VL-B-(連接子3)-VH-B-(連接子2)-VL-A；VH-A-(連接子1或2)-VL-A；VH-B-(連接子1或2)-VL-B；VH-A-(連接子-1)-VL-A-(連接子3)-VH-B-(連接子2)-VL-B；VL-A-(連接子1或2)-VH-B、VL-B-(連接子1或2)-VH-A；VL-A-(連接子-1)-VH-B-(連接子3)-VL-B-(連接子2)-VH-A；VL-A-(連接子1或2)-VH-A、VL-B-(連接子1或2)-VH-B；VL-A-(連接子-1)-VH-A-(連接子3)-VL-B-(連接子2)-VH-B；或是熟悉此藝者會預期的任何其他方位。

於另一具體例中，本發明包括一種載體，其包含如本

發明的一種核酸分子。

術語“載體”係提及一種核酸分子，其能夠運送已經連接其之另一種核酸。一種類型的載體是一種“質體”，其係提及一種環形雙股的DNA環，額外的DNA段可以被連接至該其內。另一種類型的載體是一種病毒載體，其中額外的DNA段可以被連接進入病毒的基因組。某些載體能夠於一種導入其等的宿主細胞中(例如，具有一種細菌複製來源之細菌載體以及附加體(episomal)哺乳動物的載體)自主的複製。其他的載體(例如，非附加體哺乳動物的載體)能在導入至宿主細胞時被整合至宿主細胞的基因組，以及藉此與宿主的基因組一起被複製。此等表現載體以及單離表現的產物之方法一般而言為熟悉此藝者已知的且說明於，舉例而言，Sambrook J. 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Handbook 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989之內。

術語“宿主細胞”係提及一種細胞，表現載體已經導入至其之內。宿主細胞可以包括細菌細胞、微生物細胞，植物細胞或動物細胞。容易轉形的細菌包括腸桿菌科的成員，譬如大腸桿菌或沙門桿菌屬菌株；有芽胞桿菌科，譬如枯草桿菌；肺炎球菌屬；鏈球菌屬，以及流行性感胃嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)。適合的微生物包括啤酒酵母菌與畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)。適合的動物宿主細胞株包括CHO(中國倉鼠卵巢株)與NS0細胞。

用於製備結合多重抗原的抗體之某些方法係描述於，

舉例而言，U.S.專利號碼7,838,637和U.S.專利號碼7,129,330之內，其等之整體內容係明確併入以作為參考資料。

本發明的抗體可以使用重組遺傳學的領域之例行的技術來產生。了解到多肽的序列，編碼其等之cDNAs可以藉由本技藝中所熟知的方法透過基因合成來產生。此等cDNAs可以選殖至適合的載體質體之內。

要了解本發明的抗體包含所揭示的序列而不是本發明的抗體由所揭示的序列所組成。舉例而言，選殖的策略可能需要一種建構物存在，該建構物係由一種在N-端末端帶有一個或一些額外的殘基之抗體所構成。特別地，在其尚未被轉譯後切割的情況中，由起始密碼所衍生的甲硫胺酸可以存在於最終的蛋白內。scFv抗體之多數的建構物於N-端末端產生一額外的丙胺酸。

藥學組成物

關於眼的遞送，本發明的抗體可以組合以眼科學上可接受的防腐劑、共溶劑、界面活性劑、黏性增進劑、滲透增進劑、緩衝劑、氯化鈉，或是水以形成一種含水的、無菌的眼懸浮液或溶液。局部的眼部產品可以舉例而言，以多劑量形式予以包裝。防腐劑因而可能必須要在使用的整個期間防止微生物的污染。適合的防腐劑包括：氯丁醇、對羥苄酸甲酯、對羥苄酸丙酯、苯乙醇、乙二胺四乙基二鈉 (Edetate disodium)、山梨酸、聚季銨鹽-1 (polyquaternium-1)，或是熟悉此藝者已知的其他製劑。此等防腐劑典型地以由0.001至1.0% w/v的位準來使用。本發

明的單元劑量組成物會是無菌的，但是典型為未防腐的。因而，此等組成物一般不會含有防腐劑。

於某些具體例中，打算局部地投藥至眼睛的組成物係予以配方為眼的滴劑或是眼的軟膏，其中抗體的總量會是大約0.001至1.0%(w/w)，較佳為大約0.01至大約1.0%(w/w)。

於某些狀況中本發明的組成物會予以投藥為用於局部的投藥之溶液。基於容易配方，以及一病人藉由徐徐滴入1至2滴溶液於罹病的眼睛中而容易投藥此等組成物之能力，水溶液一般為較佳的。然而，該等組成物亦可以為懸浮液、黏性的或半黏性的凝膠，或是其他類型的固態或半固態的組成物。

打算用於口腔用途之組成物可以依據本技藝所知道之製造藥學組成物之任何的方法予以製備以及可以含有一或更多個製劑，譬如甜味劑、調味劑、著色劑，以及防腐劑俾以提供有吸引力且美味的製劑。錠劑含有該活性成分攪合以生理上可接受的賦形劑，其等係適合用於製造錠劑。此等賦形劑包括，舉例而言，惰性的稀釋劑(例如，碳酸鈣、碳酸鈉、乳糖、磷酸鈣或磷酸鈉)、製粒劑和破碎劑(例如，玉米澱粉或藻酸)、黏合劑(例如，澱粉、明膠或阿拉伯膠)以及潤滑劑(例如，硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石粉)。錠劑可以為未塗覆的或其等可以藉由已知的技術予以塗覆來延遲胃腸道中的破碎和吸收以及藉此於更久的期間內提供持續的作用。舉例而言，可以使用一種時間延遲的材料，譬如甘油單硬脂酸酯(glyceryl monostearate)或甘油二硬脂酸酯。

含油的懸浮液可以藉由懸浮活性成分於一植物油內(例如，花生油、橄欖油、芝麻油，或是椰子油)或於一礦物油內，譬如液態石蠟，來配方。含油的懸浮液可以含有一增稠劑，譬如蜜蠟、硬石蠟，或是鯨蠟醇。可以添加增甜劑，譬如以上提出的該等，及/或調味劑來提供美味的口服製劑。此等懸浮液可以藉由添加一抗氧化劑，譬如抗壞血酸，來保藏。

適合用於藉由添加水來製備含水的懸浮液之可分散的粉末與顆粒提供該活性成分攪合以一分散劑或濕潤劑、懸浮劑和一或更多個防腐劑。適合的分散劑或濕潤劑以及懸浮劑係藉由以上已經提及的該等來舉例說明。亦可以存在額外的賦形劑，舉例而言增甜劑、調味劑以及著色劑。

藥學組成物亦可以成為水中油型乳劑的形式。含油相可以為一植物油(例如，橄欖油或花生油)、一礦物油(例如，液態石蠟)，或是其之混合物。適合的乳化劑包括天然存在的膠(例如，阿拉伯膠或黃蓍膠)、天然存在的磷脂質(例如，黃豆、卵磷脂，和由脂肪酸與己糖醇所衍生的酯或偏酯)、酐(例如，山梨醇酐單油酸酯(sorbitan monoleate))，以及由脂肪酸與己糖醇所衍生的偏酯與環氧乙烷之縮合產物(例如，聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯)。一種乳劑亦可以包含一或更多個增甜劑、及/或調味劑。

該藥學組成物可以製備為一種滅菌的可注射含水的或油質的懸浮液，其中調節劑，取決於所使用的媒介物和濃度，不是懸浮就是溶解於該媒介物內。此一組成物可以

根據已知技藝、使用例如以上提及的該等合適的分散劑、潤濕劑和/或懸浮劑來配方。在可以使用之可接受的載體與溶劑之中為水、1,3-丁二醇、林格氏溶液以及等張的氯化鈉溶液。此外，滅菌的、不揮發油可以使用作為溶劑或懸浮介質。為此目的，可以使用包括合成的單或二甘油酯之任何的溫和不揮發油。此外，脂肪酸，例如油酸可以使用於可注射的組成物之製備，以及佐劑，譬如局部的麻醉劑、防腐劑及/或緩衝劑可以溶解於媒介物內。

藥學組成物可以配方為持續釋放的配方(亦即，一種配方，譬如一膠囊，其影響投藥以後調節劑之緩慢釋放)。此等配方一般可以使用熟知技術予以製備以及藉由，舉例而言，口腔的、直腸的，或是皮下的植入予以投藥，或是藉由植入在所欲的標靶位址予以投藥。供使用於此等配方之內的載劑為生物可相容的，以及亦可以為生物可降解的；較佳為該配方提供一種相對不變的位準之調節劑釋放。一種持續釋放的配方內含有之抗體的量取決於，舉例而言，植入的位址、釋放的速率和預期的持續時間以及待治療或預防的疾病/障礙之本質。

本文中所提供的藥學組成物可以以一量予以投藥，該量於一體液(例如，血液、血漿、血清、CSF、滑液、淋巴液、細胞的間隙液、淚液或尿液)內達到足以可偵測地結合至標靶分子且預防或抑制與標靶分子相關聯的疾病/障礙之濃度。設若一劑量導致有益於一可識別的病人，則會認為該劑量是有效的。

本發明的抗體之適當的劑量("治療有效量")會取決於，舉例而言，待治療的病況，病況的嚴重性與過程，是否該抗體係為了預防性或治療性目的而投藥，先前的療法，病人對該抗體之臨床病史及反應，所使用的抗體類型，以及主治醫師的判斷。該抗體係適當地以一次或是持續一系列的治療方式予以投藥至病人以及可以於診斷向前之任何的時間投藥至該病人。該抗體可以予以投藥作為單獨的治療或是結合有用於治療正在談論的病況之其他的藥物或治療法。

當作一普遍的提議，所投藥之抗體的治療有效量會是於大約0.1至大約100mg/kg的病人體重的範圍內，不管是藉由一或是更多個的投藥，且所使用之抗體之典型的範圍，舉例而言係大約0.3至大約20mg/kg，更佳為大約0.3至大約15mg/kg，之每日投藥。然而，其他的劑量攝生法可以為有用的。此治療法之進展可容易地藉由慣用的技術予以監控。

於本發明之另一具體例中，提供了一種物件之製造，該物件包含一種容器，其容納本發明之藥學組成物的含水藥學配方，以及選擇性地提供了關於其之用途之指南。適合的容器包括，舉例而言，瓶子、小瓶和注射器。容器可以由各種各樣的材料所形成，譬如玻璃或塑膠。一種示範的容器為一種3-20cc單一使用的玻璃小瓶。任擇地，在一種多劑量配方方面，容器可以為3-100cc玻璃小瓶。容器容納配方以及於該容器上的標記，或是與該容器有關連的標記，容器可以指示出使用的指示。物件之製造可以進一步

包括從商業的立場和使用者的立場所欲的其他材料，包括其他的緩衝劑、稀釋液、濾器、針、注射器，以及有使用指南之包裝插入物。

於某些具體例中，本發明提供：

2. 一種多重抗原結合抗體分子，其包含：

a) 一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子1而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成一個VH-A/VL-B建構物；

b) 一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子2而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成一個VH-B/VL-A建構物；

其中該多重抗原結合抗體缺少守恆領域，VL-A與VL-B之至少一者包含在AHo位置50處的精胺酸，及/或VH-A與VH-B之至少一者包含下列的至少一者：在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

3. 1之多重抗原結合抗體(The multiple antigen-binding antibody of 1)，其中VL-A與VL-B的至少一者包含一框架序列，該框架序列與序列辨識編號：5的序列有至少65%的同一性。

4. 1之多重抗原結合抗體，其中VH-A與VH-B的至少一者包含一框架序列，該框架序列與序列辨識編號：6的序列

有至少80%的同一性。

5.1之多重抗原結合抗體，其中VL-A/VH-B與VH-B/VL-A建構物的至少一者包含一種人類V κ 1家族輕鏈可變異區域、一種人類V λ 1家族輕鏈可變異區域，或是一種人類V κ 3家族輕鏈可變異區域。

6.1之多重抗原結合抗體，其中VL-A/VH-B與VH-B/VL-A建構物的至少一者包含一種人類VH3家族重鏈可變異區域、一種人類VH1a家族重鏈可變異區域，或是一種人類VH1b家族重鏈可變異區域。

7.1之多重抗原結合抗體，其中VH領域和VL領域包含來自一種兔類動物的CDRs。

8.1之多重抗原結合抗體，其中VH-A及/或VH-B包含在A_{Ho}位置12處之絲胺酸、在A_{Ho}位置103處之蘇胺酸，以及在A_{Ho}位置144處之蘇胺酸。

9.1之多重抗原結合抗體，其中VL-A及/或VL-B之A_{Ho}位置50處的精胺酸係藉由取代來導入。

10.1之多重抗原結合抗體，其中VH-A及/或VH-B之A_{Ho}位置12處之絲胺酸、在A_{Ho}位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，以及在A_{Ho}位置144處之絲胺酸或蘇胺酸之至少一者係藉由取代來導入。

11.1之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1和胜肽連接子2各自具有1-10個胺基酸。

12.1之多重抗原結合抗體，其進一步包含聯結VH-A/VL-B建構物至VH-B/VL-A建構物之胜肽連接子3，該

胜肽連接子3具有10-30個胺基酸。

13. 11之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1和胜肽連接子2各自具有3-7個胺基酸，以及胜肽連接子3具有15-20個胺基酸。

14. 12之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1和胜肽連接子2各自具有5個胺基酸，以及胜肽連接子3具有20個胺基酸。

15. 13之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1包含GGGGS(序列辨識編號：1)的序列、胜肽連接子2包含GGGGS(序列辨識編號：1)的序列，以及胜肽連接子3包含(GGGGS)₄(序列辨識編號：4)的序列。

16. 14之多重抗原結合抗體，其具有VH-A-序列辨識編號：1-VL-B-序列辨識編號：4-VH-B-序列辨識編號：1-VL-A的格式。

17. 1之多重抗原結合抗體，其中抗體為二價的。

18. 1之多重抗原結合抗體，其中抗體為雙專一性的。

19. 一種藥學組成物，其包含1之多重抗原結合抗體。

20. 一種1之多重抗原結合抗體供用於診斷及/或治療疾病的用途。

21. 一種核酸分子，其編碼1之VH-A/VL-B建構物及/或VH-B/VL-A建構物。

22. 一種載體，其包含20的核酸分子。

23. 一種經單離的宿主細胞，其包含21之載體。

24. 一種核酸分子，其編碼11之抗體。

25. 一種載體，其包含23的核酸分子。

26. 一種經單離的宿主細胞，其包含24之載體。

27. 一種多重抗原結合抗體分子，其包含：

a) 一單鏈抗體，其包含一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子3而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成scFv-A；

b) 一單鏈抗體，其包含一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子3而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成scFv-B；

其中scFv-A係藉由胜肽連接子1而聯結至scFv-B，以及VL-A與VL-B之至少一者包含在AHo位置50處的精胺酸，以及VH-A與VH-B之至少一者包含下列的至少一者：在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

28. 26之多重抗原結合抗體，其中VH-A及/或VH-B包含在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，以及在AHo位置144處之蘇胺酸。

29. 26之多重抗原結合抗體，其中VL-A及/或VL-B之AHo位置50處的精胺酸係藉由取代來導入。

30. 26之多重抗原結合抗體，其中VH-A及/或VH-B之在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，以及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸之至少一者係

藉由取代來導入。

31. 26之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1具有1-10個胺基酸。

32. 26之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子3具有10-30個胺基酸。

33. 26之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1具有3-7個胺基酸，以及胜肽連接子3具有15-20個胺基酸。

34. 26之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1具有5個胺基酸，以及胜肽連接子3具有15個胺基酸。

35. 26之多重抗原結合抗體，其中VL-A或VL-B的至少一者包含一框架序列，該框架序列與序列辨識編號：6的序列有至少65%的同一性。

36. 26之多重抗原結合抗體，其中VH-A或VH-B的至少一者包含一框架序列，該框架序列與序列辨識編號：7的序列有至少80%的同一性。

37. 26之多重抗原結合抗體，其中scFv-A與scFv-B的至少一者包含一種人類V κ 1家族輕鏈可變異區域、一種人類V λ 1家族輕鏈可變異區域，或是一種人類V κ 3家族輕鏈可變異區域。

38. 26之多重抗原結合抗體，其中scFv-A與scFv-B的至少一者包含一種人類VH3家族重鏈可變異區域、一種人類VH1a家族重鏈可變異區域，或是一種人類VH1b家族重鏈可變異區域。

39. 26之多重抗原結合抗體，其中VH領域和VL領域包

含來自一種兔類動物(lagomorphs)的CDRs。

40. 一種多重抗原結合抗體分子，其包含：

a) 來自一種兔類動物的CDRs；

b) 一個帶有關於抗原A之專一性的重鏈可變異領域(VH-A)藉由胜肽連接子1而聯結至一個帶有關於抗原B之專一性的輕鏈可變異領域(VL-B)來形成一個VH-A/VL-B建構物；

c) 一個帶有關於抗原B之專一性的重鏈可變異領域(VH-B)藉由胜肽連接子2而聯結至一個帶有關於抗原A之專一性的輕鏈可變異領域(VL-A)來形成一個VH-B/VL-A建構物；以及

d) 一個具有10-30個胺基酸之胜肽連接子3，其係聯結VH-A/VL-B建構物至VH-B/VL-A建構物；

其中該重鏈可變異領域之至少一者包含下列的至少三者：在AHo位置24處之蘇胺酸(T)、在AHo位置25處之纈胺酸(V)、在AHo位置56處之丙胺酸(A)或甘胺酸(G)、在AHo位置82處之離胺酸(K)、在AHo位置84處之蘇胺酸(T)、在AHo位置89處之纈胺酸(V)以及在AHo位置108處之精胺酸(R)，以及胜肽連接子1和胜肽連接子2各自具有1-10個胺基酸。

41. 39之多重抗原結合抗體，其中VL-A與VL-B的至少一者包含一框架序列，該框架序列與序列辨識編號：5的序列有至少85%的同一性。

42. 39之多重抗原結合抗體，其中VH-A與VH-B的至少

一者包含一框架序列，該框架序列與序列辨識編號：6的序列有至少90%的同一性。

43. 39之多重抗原結合抗體，其進一步包含在AHo位置1處之麩胺酸(E)、在AHo位置3處之纈胺酸(V)、在AHo位置4處之白胺酸(L)、在AHo位置10處之絲胺酸(S)；在AHo位置47處之精胺酸(R)、在AHo位置57處之絲胺酸(S)、在AHo位置91處之苯丙胺酸(F)及/或在AHo位置103處之纈胺酸(V)於該可變異輕鏈領域之至少一者內。

44. 39之多重抗原結合抗體，其中該重鏈可變異領域之至少一者包含下列的至少一者：在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸。

45. 43之多重抗原結合抗體，其中VH-A及/或VH-B之在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHo位置144處之絲胺酸或蘇胺酸之至少一者係藉由取代來導入。

46. 39之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1和胜肽連接子2各自具有5個胺基酸。

47. 45之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子3具有15-20個胺基酸。

48. 46之多重抗原結合抗體，其中胜肽連接子1包含GGGGS(序列辨識編號：1)的序列、胜肽連接子2包含GGGGS(序列辨識編號：1)的序列，以及胜肽連接子3包含(GGGGS)₄(序列辨識編號：4)的序列。

49. 47之多重抗原結合抗體，其具有VH-A-序列辨識編號：1-VL-B-序列辨識編號：4-VH-B-序列辨識編號：1-VL-A的格式。

50. 39之多重抗原結合抗體，其中抗體為二價的。

51. 39之多重抗原結合抗體，其中抗體為雙專一性的。

52. 一種藥學組成物，其包含39之多重抗原結合抗體。

53. 一種39之多重抗原結合抗體供用於診斷及/或治療疾病的用途。

54. 一種核酸分子，其編碼39之VH-A/VL-B建構物及/或VH-B/VL-A建構物。

55. 一種載體，其包含53的核酸分子。

56. 一種經單離的宿主細胞，其包含54之載體。

遍及此說明書所引述之任何的專利、專利申請案，以及參考文獻的內容係藉此以其等之整體內容併入以作為參考資料。

除非其他的文字要求，本文中使用的單數的術語應該包括複數以及複數術語應該包括單數。

實施例

本揭示進一步藉由下列的實施例來闡明，其等不應該解釋為進一步的限制。遍及此申請案所引述之全部的圖示以及全部的參考文獻、專利和公開的專利申請書的內容係明確地以其等之整體內容併入至本文中作為參考資料。

實施例1

衍生自兔抗體之雙專一性及二價抗體之分子設計、選殖和表現。

編碼雙專一性及二價抗體之DNA的序列係藉由從數位基因序列的寡核苷酸合成以及生成片段使用重疊延伸技術之隨後的黏合(annealing)而產生。所有的序列係予以最佳化大腸桿菌的密碼子使用(codon usage)、GC含量、mRNA二級結構、密碼子和要素重複(motif repeats)，以及限制位址(restriction sites)。使用不同的胺基酸連接子，見表1，來連結來自帶有不同的專一性之兔抗體的擬人化VL及VH領域。

表1

連接子1和2	
3aa	GGG
5aa	GGGGS (序列辨識編號：1)
7aa	GGGGGGS (序列辨識編號：2)
連接子3	
15aa	GSDSNAGRASAGNTS (序列辨識編號：3)
20aa	(GGGGS) ₄ (序列辨識編號：4)

多重抗原結合-抗體分子係製備為雙專一性及二價結合至標靶分子。將所有的分子選殖至用於不可溶的大腸桿菌的表現之表現載體內，其含有一個T7lac啟動子、一個細菌的核酸體結合位址接著抗體分子。轉形以各自的包涵體(inclusion body)表現質體之大腸桿菌BL21(DE3)生長於37℃下在含有適當的抗生素之dYT培養基內。蛋白質的表現係藉由添加1 mM 異丙基 1-硫代-D-半乳糖吡糖苷(isopropyl 1-thio-D-galactopyranoside) (最終濃度)於大約2.0的吸光度(A600)而起始。在誘導之後3小時，收穫大腸桿菌的細胞且藉由音波處理來破裂，以及包涵體係藉由重複

的清洗和離心的步驟來單離。

包涵體係於6 M Gdn-HCl的存在下以10 mg/ml的濃度來溶解以及藉由添加20 mM二硫蘇糖醇來還原。執行基本的再摺疊篩選以由測試條件範圍選擇最好的pH、氧化還原系統(胱胺酸/半胱胺酸)，以及鹽的濃度。各個個別抗體之最好的條件使用於實驗室規模的再摺疊方法。雙專一性或二價抗體蛋白係藉由快速的稀釋至50倍體積的再摺疊緩衝劑之內而予以復性。在向上濃縮(up-concentration)以及對PBS緩衝劑，pH 6.0透析之後，蛋白質係經由分子篩選層析術來純化。

實施例2

二價抗體的產生

結合至介白素23(IL-23)的二價抗體係以rFW1.4框架的可變異領域，人類的支架，為基礎來產生用於兔抗體之屬的移植(generic grafting) (如同國際申請案號WO 2009/155726之內所揭示的)，以及其實質上與所有的兔抗體相容。生產3種格式，包括雙價抗體、單鏈雙價抗體，及串聯單鏈抗體。CDRs係取自一種顯示為結合人類的IL-23的抗體。雙價抗體(Db)係藉由表現格式VHA-連接子1-VLB和VHB-連接子2-VLA之二個片段於相同的細胞內導致形成異二聚體而獲得，編碼序列的各者之前有核酸體結合位址(RBS)。於此等分子內，連接子1和2為5個胺基酸(GGGGS，序列辨識編號：1)。於另一種格式內，二種多肽鏈係藉由一個額外的中間連接子(連接子3)來融合，產生一種編碼一

單鏈雙價抗體(scDb)的單一基因：VHA-連接子1-VLB-連接子3-VHB-連接子2-VLA，該處連接子3由15個胺基酸(GSDSNAGRASAGNTS，序列辨識編號：3)組成(Völkel等人，2001, *Protein Eng* 14:815-823)。第三種格式，串聯scFv(TdscFv)係藉由透過一個短的中間連接子(GGGGS，序列辨識編號：1)和一個長的連接子3((GGGGS)₄)來連結二個scFvs而生產。序列辨識編號：4，導致VL-A-連接子3-VH-A-連接子1-VL-B-連接子3-VH-B的領域順序，以產生一種VH-A和VH-B，以及VL-A和VL-B為完全相同的二價分子。

評估scDb格式內不同的特徵對於框架區域的可生產性、穩定性以及形成寡聚物的傾向之作用。表2內說明該等格式。簡言之，分子#1由rFW1.4之可變異領域組成以不帶有額外的取代之scDb。分子#2為#1的變異體，分子#2的二個VL領域(VL-A/-B)上都導入在AHo位置50處的精胺酸。分子#3也是以#1為基礎，但是具有導入至二個VH領域(VH-A/-B)之上的三個取代，特別為在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，以及在AHo位置144處之蘇胺酸。分子#14由帶有於二個VL領域(VL-A/-B)上的AHo位置50處的精胺酸之取代，以及於二個VH領域(VH-A/-B)上的AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，和在AHo位置144處之蘇胺酸的取代之分子#1組成。為了比較的目的，使用人類的生殖抗體清單(repertoire)的一致序列來生產一種額外的scDb(#5)(Knappik等人，2000, *J. Mol. Biol.* 296:57-86)。框架區域相應於VH3和VL κ 1亞型的一致

序列，定名為HuCal。此擬人化的scDb係用本文中描述之其他的二價scDbs所使用之相同的CDRs來產生，因而差異僅僅位於框架區域。

表 2

#1	rFW1.4
#2	rFW1.4，VL-A/-B：在AHo位置50處的精胺酸
#3	rFW1.4,VH-A/-B： 在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，在AHo位置144處之蘇胺酸
#4	rFW1.4，VL-A/-B：在AHo位置50處的精胺酸，在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，以及在AHo位置144處之蘇胺酸
#5	CDRs之HuCal FW移植

實施例3

雙專一性抗體的產生

設計雙專一性的單鏈雙價抗體以參與一種單一的分子二個不同的專一性。使用來自最初係透過對VEGF₁₆₅和TNF α 的擬人化兔抗體而產生的二個不同的scFv抗體之VH及VL領域作為可變異區域基因的來源以建構格式VHA-連接子1-VLB-連接子3-VHB-連接子2-VLA之單一的片段，該處標示A的可變異領域結合VEGF₁₆₅以及標示B的可變異領域結合TNF α 。結合VEGF₁₆₅之抗體具有下列的VL序列：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGA

EF TLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG，序列辨識編號：7；

以及具有下列序列的VH：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTIDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFT

IS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS，序列辨識編

號：8。

具有在AHo位置12處之絲胺酸、在AHo位置103處之蘇胺酸，以及在AHo位置144處之蘇胺酸的VH領域之序列為：

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDIPDDDPYYATWAKGRFT

IS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTTVTVSS，序列辨識編

號：9。

結合TNF α 之抗體具有下列的VL序列：

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQSSQSVYGNIMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGS

GA EFTLTISLQPDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLG，序列辨識編號：10；

以及具有下列序列的VH：

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLY

ANW AKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS，序列辨識

編號：11。

雙專一性的抗體係使用實施例1內所說明之標準的DNA操縱技術來設計與建構。就不同的雙專一性的scDb來評估導入框架區域之不同的框架特徵以及不同的連接子組合之作用，說明於表3內。

表 3

#6	FW1.4，連接子(5aa-15aa-5aa)
#7	rFW1.4，連接子(5aa-15aa-5aa)
#8	rFW1.4，連接子(5aa-15aa-5aa)，VL-A：在AHo位置50處的精胺酸
#9	rFW1.4，連接子(5aa-15aa-5aa)，VL-A：在AHo位置50處的精胺酸，VH-B：在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，在AHo位置144處之蘇胺酸
#10	rFW1.4，連接子(5aa-15aa-5aa)，VL-A：在AHo位置50處的精胺酸，VH-A/-B：在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，在AHo位置144處之蘇胺酸
#11	rFW1.4，連接子(5aa-20aa-5aa)，VL-A：在AHo位置50處的精胺酸，VH-A/-B：在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，在AHo位置144處之蘇胺酸
#12	rFW1.4，連接子(7aa-20aa-7aa)，VL-A：在AHo位置50處的精胺酸，VH-A/-B：在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，在AHo位置144處之蘇胺酸
#13	rFW1.4，連接子(3aa-20aa-3aa)，VL-A：在AHo位置50處的精胺酸，VH-A/-B：在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，在AHo位置144處之蘇胺酸

具有 5-20-5 連接子組合以及在 AHo 位置 12 處之絲胺酸，在 AHo 位置 103 處之蘇胺酸，和在 AHo 位置 144 處之蘇胺酸之表現的建構物的序列為：

MEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDPDDDPYATWAKGRF
TI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTITVTVSSGGGGSEIVMTQSPSTLSAS
VG
DRVIITCQSSQSVYGNIMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFF
AT
YYCQGNFNTGDRYAFGQGTCLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTA
SG
FTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAT
YY
CARLGYADYAYDLWGQGTITVTVSSGGGGSEIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIIHSWLAWYQQKP
GK APKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTCLTVLG

(序列辨識編號：12)。

實施例4

雙專一性及二價抗體之特徵化

可生產性

令不可溶的表現的蛋白再摺疊以及經由製備的分子篩選高效液相層析術(SE-HPLC)來純化。產生的蛋白質係依據其之以每公升培養基毫克之經純化的蛋白質產率來特徵化。此值提供各別分子的可生產性之特徵量度。純度定義為純化再摺疊的蛋白質之後、樣本排除可溶的聚集體之單體含量。純度係經由製備的分子篩選層析術來判定。單體和可溶的聚集體之峰係於TSKgel Super SW2000管柱(TOSOH Bioscience)上由非單體種類來解析。單體蛋白之百分比係計算為單體峰的面積除以全部產物峰的總面積。

熱穩定性量度(FT-IR, DSC)

使分子濃縮高至3mg/ml以及收集緩衝劑順流(buffer flow through)作為空白。執行FT-IR(傅氏轉換紅外線光譜)讀數及DSC(毛細管微差掃描熱量法)來測量熱穩定性。FT-IR光譜係使用FT-IR Bio-ATR(衰減全反射)細胞於Tensor Bruker機器內獲得。顯示二級結構之變化的變性剖面圖係藉由用以5°C步進之溫度梯度(25°C至95°C)予以熱挑戰(thermo challenging)該等分子而獲得。全部的光譜操控係使用OPUS軟體予以執行。正規化係對暫時的大氣(CO₂和H₂O)背景與空白樣本來執行。產生的蛋白光譜接而予以基線校正以及蛋白醯胺I光譜係由預期的區域內之最寬的可分辨峰之寬度予以決定。第二衍生物光譜係使用一種3次多項式

函數及一種平滑函數而獲得醯胺I帶譜。蛋白結構的變化係藉由醯胺I第二衍生物分析來估計、使用一種線性校正曲線用於起始的曲線配適(curve-fit)計算，假定3個低溫的測量為0%變性的蛋白以及3個高溫的測量為100%變性的蛋白。變性剖面圖係使用來大致估計應用波茲曼S形模型之每一個變異之熱展開轉變(thermal unfolding transitions) (TM)的中點。DSC量度亦熱展開樣本。微差掃描量熱計(MicroCal capillary VP-DSC)使用200°C/h的溫度梯度。資料分析係藉由進行緩衝劑信號的參考縮減(reference reduction)和對按 μM 計之各自的蛋白質濃度正規化、伴隨隨後的基線校正來執行，所有的操縱係於DSC之MicroCal S軟體上執行。T_m為等於發生最多能量吸取時之處的溫度，其代表展開的溫度。

短期穩定性測試

蛋白係於40°C下的2週孵育之前及之後檢查可溶的聚集體及降解的產物。將蛋白濃縮至下列希望的濃度：10mg/ml、20mg/ml、40mg/ml，及60mg/ml。於蛋白不夠可溶至下列希望濃度的情況中，便分析最高可能的濃度。當進一步濃縮只會導致沉澱而不會增高濃度時，便達到最高的濃度。此等樣本係在第0天和第14天予以分析。以及可溶的聚集體係以SEC-HPLC予以評估。純度的分析和可能出現的降解帶係藉由12.5%十二基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)在2個時間點實行。在孵育期間之前和在孵育期間之後的聚集體和可溶的寡聚合(oligomerations)係藉由

分子篩選高效液相層析術(SE)-HPLC來評定。單體係於一TSKgel Super SW2000管柱(TOSOH Bioscience)上由非單體種類來解析以及單體蛋白之百分比係計算為單體峰的面積除以全部產物峰的總面積。總濃度係藉由使用奈米液滴(nanodrop)裝置於波長280nm之UV吸收量度來判定。以此方式，此短期穩定性測試評估像是溶解度、穩定性、聚集作用以及寡聚合的性質。

結果

結合IL23的二價分子：

測試二價結合IL-23之不同的scFv類的格式。此等分子包含如實施例2內所說明之結合IL-23的VH及VL領域。所有的分子係如方法內所說明之依據其等的生產性質、熱穩定性及短期穩定性測試予以特徵化。

測試的格式尤其包括：

分子#14：雙價抗體(Db)：VHA-連接子1-VLB和VHB-連接子2-VLA；(連接子1和2=序列辨識編號：1)；

分子#15：單鏈雙價抗體(scDb)：VHA-連接子1-VLB-連接子3-VHB-連接子2-VLA；(連接子1和2=序列辨識編號：1；連接子3=序列辨識編號：4)；

分子#16：串聯scFv(TdscFv)：VLA-連接子3-VHA-連接子1-VLB-連接子3-VHB；(連接子3=序列辨識編號：4；連接子1=序列辨識編號：1)。

於所有此等格式內VL-A和-B為完全相同的，以及VH-A和-B為完全相同的，因而生產一種結合至IL-23的二價

抗體。

scDb和TdscFv抗體於細菌系統內的可生產性通常受限於其等相對低的產率和其等形成聚集體的傾向。然而，所有經評估的格式藉由經純化的包涵體來再摺疊而有效地生產。再摺疊的蛋白質在隨後經由製備的分子篩選層析術來純化之後主要為單體的，見表4。TdscFv #16，顯示出最高的產率但是89%之最低的純度。Db #15和scDb #14有相似的產率，以及scDb顯示出經由SE-HPLC測量之如單體含量之最高純度。

表4

#	產率 [mg/L]	SE-HPLC 純度[%]
#14	83.5	98
#15	88	92
#16	158	89

當用微差掃描熱量法(DSC)測量所有的3種格式時，顯示出相似的T_m，大概73°C。結果顯示於表5內。

表5

#	T _m app. [°C]
#14	73.8
#15	73.1
#16	73.2

經由FT-IR測量的T_m觀察到些微的差異，見表6。與DSC量度一致，此等結果確認所有的3種格式為熱穩定的。

表6

#	T _m [°C]
#14	70.3
#15	68.9
#16	67.1

當樣本於40°C 孵育歷時14天的期間時，於短期穩定性測試中測試溶解度和穩定性，見表7。Db #15和scDb #14僅僅可溶至高達大概20mg/ml的濃度，但是其等於第14天仍舊保持大概95%的高單體含量。此反映此短的時間週期內高的穩定性。TdscFv #16為可溶高達40mg/ml，但是在14天的期間之內喪失單體含量，導致66.6%的單體含量。因此，此實驗展現出scDb #14和Db #15於此等條件下相較於TdscFv #16具有減少的聚集作用傾向。

表 7

#	SE-HPLC 純度[%]	Conc. [mg/ml]
#14	95.6	23
#15	93.3	26
#16	66.1	40

結合IL23的二價分子，帶有框架特徵之scDb格式：

接而測試表2內說明之二價結合IL-23之不同的scDb變異體。所有的分子係如方法內所說明之依據其等的生產性質、熱穩定性及短期穩定性測試予以特徵化。

所有的二價scDb分子係以此領域的順序來生產：VHA - 連接子1-VLB-連接子3-VHB-連接子2-VLA(連接子1和2 = 序列辨識編號：1；以及連接子3 = 序列辨識編號：4)，而

VL-A和-B為完全相同的，且VH-A和-B為完全相同的，帶有特定的取代總結於實施例2，表2。

所有以rFW1.4框架為基礎之二價分子為可成功生產的，以及樣本在經由製備的分子篩選層析術來純化之後主要為單體的，見表8。以生殖性一致框架 (consensus framework) 為基礎之scDb #5顯示出最低的生產產率以及經純化的樣本之單體含量。

表8

#	產率 [mg/L]	SE-HPLC 純度[%]
#5	19	61.6
#1	65	98
#3	65	99
#2	101	98
#4	40	98

所有以rFW1.4框架為基礎之二價分子按微差掃描熱量法(DSC)顯示出大概73°C之高的T_m。以生殖性一致框架為基礎的scDb顯示出66°C之最低的T_m，見表9。

表9

#	T _m app. [°C]
#5	66
#1	74.5
#3	73.6
#2	73.2
#4	73.4

於不同版本的二價IL-23結合分子之間於穩定性和最

大達到的濃度方面觀察到明顯的差異，見表10。scDb #5以生殖性一致(consensus)為基礎的於40°C下2週孵育後顯示出44%之減少的單體含量。以rFW1.4框架為基礎的分子於40°C下2週孵育後主要餘留下單體，以及顯示出由87-95%之單體含量。

精胺酸導入二個VL領域上的AHo殘基位置50之處的變異體#2相較於二個VL領域內於殘基位置50之處有離胺酸的#1，顯示出40°C下2週孵育後最高的單體含量。並且，含有於二個VH領域上在AHo位置12處之絲胺酸，在AHo位置103處之蘇胺酸，以及在AHo位置144處之蘇胺酸的變異體#3於40°C下2週孵育後、相較於#1顯示出更高的單體含量。並且，此等取代之組合，scDb #4，導致增高的濃縮蛋白質能力，其意謂著進一步增加的溶解度，見表10。

表 10

#	SE-HPLC 純度[%]	Conc. [mg/ml]
#5	44.4	2
#1	87.5	2.1
#3	95.7	1.9
#2	90.1	35
#4	94.9	41

結合VEGF和TNF α 之雙專一性的分子：

測試雙專一性結合VEGF和TNF α 之不同的scDb變異體。見實施例3，表3關於分子之間的差異。所有的分子係依據其等的生產性質、熱穩定性及短期穩定性測試予以特

徵化。

所有的二價scDb分子係以此順序：VHA-連接子1-VLB-連接子3-VHB-連接子2-VL-A。領域VL-A和VH-A總成TNF α 結合抗體片段。領域VL-B和VH-B總成VEGF結合抗體片段。連接子序列內導入的取代和變化係特別總結於實施例3，表3內。

所有雙專一性的分子均為可生產的，但是達到不同的產率和單體含量，見表11。比較含有由20 aa(序列辨識編號：4)組成的連接子之#11 scDb版本與版本#9，版本#9含有相同的取代但是僅僅不同在於連接子3(為序列辨識編號：3)。ScDb版本#11顯示出61mg/ml及75%之增加的產率和純度，反之，scDb #9僅有7mg/ml的產率及34%的純度。#10上額外的取代當相較於沒有任何的取代之scDb版本#6時，顯著地增加純度。

表 11

#	產率 [mg/L]	SE-HPLC 純度[%]
#6	13	19
#7	6	72
#8	25	71
#9	7	34
#10	4	96
#11	62	75
#12	34	74
#13	11	69

所有帶有取代的雙專一性的scDb分子在熱穩定性方面

顯示出高於72°C之高的T_m，以DSC量度。尤其，當相較於#6時，#6版本沒有任何的取代，只達到57.2°C的T_m，見表12。連接子結構的交換不會改變熱穩定性。此等scDb變異，#11，#12，以及#13也仍舊有74°C的T_m。

表 12

#	T _m app. [°C]
#6	57.2
#7	72.1
#8	72.5
#9	74.2
#10	74.8
#11	74.8
#12	74.6
#13	75.4

具有由20aa(序列辨識編號：4)組成的連接子3之雙專一性的scDb變異體，#11，#12，以及#13當藉由FT-IR測量時，顯示出大概69°C的T_m。此等值與#9之66.2°C的T_m比較，#9含有15aa連接子3(序列辨識編號：3)。此等熱穩定性結果顯示出將連接子3由15aa交換至20aa會增加scDb分子的T_m，如同表13內顯示的。

表 13

#	T _m app. [°C]
#9	66.2
#11	69.8
#12	68.9
#13	69.5

在濃縮方法的期間以及40°C下14天孵育後在雙專一性的scDb版本方面觀察到溶解度和穩定性上明顯的差異。導入至FW區域上的取代將增加scDb蛋白質的溶解度和穩定性，見表14。VH-B上有額外的取代之版本#10於第14天有88%的單體含量。此等值係與第14天具有53%的單體含量之#9以及具有19%的單體含量之#6比較。此等結果顯示出穩定性係經由取代而提高。當純度於第14天比於第0天更高時，將該分子排除在此比較之外。

將連接子3由15aa的序列(序列辨識編號：3)交換成為20aa(序列辨識編號：4)會導致scDb分子增加的溶解度和穩定性，見表14。分子#9與#11，#12，以及#13比較之溶解度和穩定性之差異支持此結論。scDb的變異體，#9和#11，#12，以及#13含有相同的取代，但是不同的連接子3的序列，見實施例3，表3。具有連接子3，20aa(序列辨識編號：4)，以及連接子1和2，5aa(序列辨識編號：1)之#11版本的scDb，於40mg/ml的濃度顯示出81%的單體含量，反之，#9只達到10mg/ml及53%的單體含量，見表14。

表 14

#	SE-HPLC 純度 [%]	Conc. [mg/ml]
#6	19.3	5.5
#7	99.1	1.5
#8	92.5	8.7
#9	53.2	10
#10	88.8	1.5
#11	81.2	40
#12	83.7	40
#13	43.0	40

*
*
*
+

應該了解到前述揭示強調本發明某些特定的具體例和其所有的修飾或替代的均等物均落在如同附隨的申請專利範圍內提出之本發明的精神和範疇內。

【圖式簡單說明】

(無)

【主要元件符號說明】

(無)

序 列 表

<110> ESBA科技 - 諾華有限責任公司(ESBATEch - A Novartis Company GmbH)

<120> 穩定的多重抗原結合抗體

<130> 5045

<160> 12

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的胜肽連接子

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的胜肽連接子

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的胜肽連接子

<400> 3

Gly Ser Asp Ser Asn Ala Gly Arg Ala Ser Ala Gly Asn Thr Ser
1 5 10 15

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的胜肽連接子

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 5

<211> 231

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的抗體框架序列

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24)..(73)
<223> 1至50個胺基酸的CDR插入位置；當X存在可以為任何胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89)..(138)
<223> 1至50個胺基酸的CDR插入位置；當X存在可以為任何胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171)..(220)
<223> 1至50個胺基酸的CDR插入位置；當X存在可以為任何胺基酸

<400> 5

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 6
<211> 232
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的抗體框架序列

<220>
<221> 其他特徵
<222> (26)..(75)
<223> 1至50個胺基酸的CDR插入位置；當X存在可以為任何胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (90)..(139)
<223> 1至50個胺基酸的CDR插入位置；當X存在可以為任何胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (172)..(221)
<223> 1至50個胺基酸的CDR插入位置；當X存在可以為任何胺基酸

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
130 135 140

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的輕鏈
<400> 7

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的重鏈
<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的重鏈

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 112

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的輕鏈

<400> 10

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
20 25 30

Ile Trp Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
85 90 95

Gly Asp Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 11
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的重鏈

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr Ala Asn
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 合成的抗體建構物

<400> 12

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile
 115 120 125

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 130 135 140

Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn Ile Trp
 145 150 155 160

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 165 170 175

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 180 185 190

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 195 200 205

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr Gly Asp
 210 215 220

Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser
275 280 285

Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
290 295 300

Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr
305 310 315 320

Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
340 345 350

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
385 390 395 400

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
405 410 415

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
420 425 430

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
435 440 445

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
450 455 460

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
465 470 475 480

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
485 490 495

105年11月9日修(更)正本

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種多重抗原結合抗體分子，其包含：

a) 2個重鏈可變異領域，一者帶有對抗原A(VH-A)之專一性且一者帶有對抗原B(VH-B)之專一性，以及

b) 2個輕鏈可變異領域，一者帶有對抗原A(VL-A)之專一性且一者帶有對抗原B(VL-B)之專一性，

其中該多重抗原結合抗體缺少守恆領域，該2個重鏈可變異領域包含：在AHO位置12處之絲胺酸、在AHO位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，及在AHO位置144處之絲胺酸或蘇胺酸；及

其中該2個輕鏈可變異領域包含在AHO位置50處的精胺酸，其中VH-A係藉由胜肽連接子1而聯結至VL-B來形成一個VH-A/VL-B建構物以及VH-B係藉由胜肽連接子2而聯結至VL-A來形成一個VH-B/VL-A建構物。

2. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該VH-A/VL-B建構物係處於VH-A-(連接子1)-VL-B的方位。
3. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該VH-B/VL-A建構物係處於VH-B-(連接子2)-VL-A的方位。
4. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該胜肽連接子1和該胜肽連接子2各自具有1-10個胺基酸。
5. 如申請專利範圍第4項之多重抗原結合抗體，其中該胜肽連接子1具有GGGGS(序列辨識編號：1)的序列以及該

- 胜肽連接子2具有GGGGS(序列辨識編號：1)的序列。
6. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該VH-A/VL-B建構物係進一步藉由胜肽連接子3而聯結至該VH-B/VL-A建構物。
 7. 如申請專利範圍第6項之多重抗原結合抗體，其中該胜肽連接子3具有10-30個胺基酸。
 8. 如申請專利範圍第7項之多重抗原結合抗體，其中該胜肽連接子3具有(GGGGS)₄(序列辨識編號：4)的序列。
 9. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其具有格式VH-A-序列辨識編號：1-VL-B-序列辨識編號：4-VH-B-序列辨識編號：1-VL-A。
 10. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該2個輕鏈可變異領域之至少一者為人類Vκ1家族輕鏈可變異區域。
 11. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該2個重鏈可變異領域之至少一者為人類VH3家族重鏈可變異區域。
 12. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該VH領域和該VL領域包含來自一兔類動物(lagomorphs)的CDRs。
 13. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該VL-A及/或該VL-B之A_Ho位置50處的精胺酸係藉由取代來導入。
 14. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該

- VH-A及/或該VH-B之在AHO位置12處之絲胺酸、在AHO位置103處之絲胺酸或蘇胺酸，以及在AHO位置144處之絲胺酸或蘇胺酸之至少一者係藉由取代來導入。
15. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該抗體為二價或雙專一性的。
16. 如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體，其中該重鏈可變異領域之至少一者包含下列的至少三者：在AHO位置24處之蘇胺酸(T)、在AHO位置25處之纈胺酸(V)、在AHO位置56處之丙胺酸(A)或甘胺酸(G)、在AHO位置82處之離胺酸(K)、在AHO位置84處之蘇胺酸(T)、在AHO位置89處之纈胺酸(V)以及在AHO位置108處之精胺酸(R)。
17. 一種藥學組成物，其包含如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體。
18. 一種如申請專利範圍第1項之多重抗原結合抗體於製造藥物之用途，該藥物係供用於診斷及/或治療疾病。