(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 201326206 A1
(43)公開日： 中華民國 102 (2013) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：101132485 (22)申請日： 中華民國 101 (2012) 年 09 月 06 日
(51)Int. Cl.： *C07K16/22 (2006.01)* *C07K16/46 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P19/02 (2006.01)*
A61P29/00 (2006.01)
(30)優先權：2011/09/06 美國 61/531,439
(71)申請人：ＮＶＩＰ有限公司 (澳大利亞) NVIP PTY LTD (AU)
澳大利亞
(72)發明人：吉倫 大衛 GEARING, DAVID (GB)
(74)代理人：閻啟泰；林景郁
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：77 項 圖式數：18 共 158 頁

(54)名稱

經修飾抗體及生產其之方法

MODIFIED ANTIBODIES AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF SAME

(57)摘要

本發明提供一種生產用於投予目標物種之非免疫原性免疫球蛋白的方法，其中該方法包含以存在於至少一種源自目標物種之免疫球蛋白之構架區中相應位置之胺基酸殘基取代供體免疫球蛋白之構架區中之胺基酸殘基。亦提供藉由本發明之方法生產之抗體，包括新穎的人類化及犬類化抗 NGF 抗體。本發明擴展為編碼其之核酸及使用該等抗體及/或核酸來治療人類或狗之疼痛及關節炎之方法。

輕鏈

FR1

大鼠	aD11	DIQMTQSPASLSASLGETVTIEC (SEQ ID NO:28)
犬類	VK	DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITC (SEQ ID NO:29)
貓類	VK	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISC (SEQ ID NO:30)
馬類	VK	DIVMTQSPASLSASLGETVTIEC (SEQ ID NO:31)

FR2

大鼠	aD11	WYQQKPGKSPQLLIY (SEQ ID NO:32)
犬類	VK	WYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:33)
貓類	VK	WYLQKPGQSPRRLIY (SEQ ID NO:34)
馬類	VK	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:35)

FR3

大鼠	aD11	GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFC (SEQ ID NO:36)
犬類	VK	GVPSRFSGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYC (SEQ ID NO:37)
貓類	VK	GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFC (SEQ ID NO:38)
馬類	VK	GVPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFC (SEQ ID NO:39)

FR4

大鼠	aD11	FGGGTKLELK (SEQ ID NO:40)
犬類	VK	FGAGTKVELK (SEQ ID NO:41)
貓類	VK	FGPGTKLEIK (SEQ ID NO:42)
馬類	VK	FGQGTKLELK (SEQ ID NO:43)

(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 201326206 A1
(43)公開日： 中華民國 102 (2013) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：101132485 (22)申請日： 中華民國 101 (2012) 年 09 月 06 日
(51)Int. Cl.： *C07K16/22 (2006.01)* *C07K16/46 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P19/02 (2006.01)*
A61P29/00 (2006.01)
(30)優先權：2011/09/06 美國 61/531,439
(71)申請人：ＮＶＩＰ有限公司 (澳大利亞) NVIP PTY LTD (AU)
澳大利亞
(72)發明人：吉倫 大衛 GEARING, DAVID (GB)
(74)代理人：閻啟泰；林景郁
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：77 項 圖式數：18 共 158 頁

(54)名稱

經修飾抗體及生產其之方法

MODIFIED ANTIBODIES AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF SAME

(57)摘要

本發明提供一種生產用於投予目標物種之非免疫原性免疫球蛋白的方法，其中該方法包含以存在於至少一種源自目標物種之免疫球蛋白之構架區中相應位置之胺基酸殘基取代供體免疫球蛋白之構架區中之胺基酸殘基。亦提供藉由本發明之方法生產之抗體，包括新穎的人類化及犬類化抗 NGF 抗體。本發明擴展為編碼其之核酸及使用該等抗體及/或核酸來治療人類或狗之疼痛及關節炎之方法。

201326206

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：101137485

※申請日：101.9.6

※IPC 分類：C07K16/32 (2006.01)
C07K16/46 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61P19/02 (2006.01)
A61P29/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

經修飾抗體及生產其之方法

MODIFIED ANTIBODIES AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF SAME

二、中文發明摘要：

本發明提供一種生產用於投予目標物種之非免疫原性免疫球蛋白的方法，其中該方法包含以存在於至少一種源自目標物種之免疫球蛋白之構架區中相應位置之胺基酸殘基取代供體免疫球蛋白之構架區中之胺基酸殘基。亦提供藉由本發明之方法生產之抗體，包括新穎的人類化及犬類化抗 NGF 抗體。本發明擴展為編碼其之核酸及使用該等抗體及/或核酸來治療人類或狗之疼痛及關節炎之方法。

三、英文發明摘要：

A method of producing a non-immunogenic immunoglobulin for administration to a target species is provided wherein the method comprises substituting amino acid residues in framework regions of a donor immunoglobulin with amino acid residues present at a corresponding position in framework regions of at least one

immunoglobulin derived from the target species. Also provided are antibodies produced by the method of the invention, including novel humanised and caninised anti-NGF antibodies. The invention extends to nucleic acids encoding same and to methods of treating pain and arthritis in a human or dog using said antibodies and/or nucleic acids.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

無

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】

本發明係關於生產可用於治療方法之非免疫原性結合劑，特定言之免疫球蛋白及其片段之方法。特定言之，該等方法使供體免疫球蛋白得到修飾以使其可投予目標物種，同時於彼處針對其產生中和抗體的風險最小。本發明進一步擴展為藉由該等方法生產之免疫球蛋白及其在療法中之用途。

【先前技術】

重組DNA技術之進步已產生多種為醫藥應用而開發之蛋白質。此已產生許多基於蛋白質之藥物，其可更一般地被稱為生物劑，即臨床試驗或市場批准之主題。基於蛋白質之藥物由於固有性質及結構，因此比更傳統的基於有機小分子及無機小分子之分子顯著更大且更複雜。特定言之，蛋白質之摺疊三級結構對其生物功能必不可少。

抗體為在人類治療應用中廣泛開發及使用之一個蛋白質家族。抗體在治療應用中之普遍性歸因於其能特異性靶向實際上任何所需目標分子之多功能性。大部分基於蛋白質之治療產品為單株抗體。然而，與使用基於單株抗體之療法相關的一個顯著缺陷在於當投予個體時產生針對治療性單株抗體之中和抗體。此等中和抗體由個體之免疫系統產生，該免疫系統將所投予單株抗體中存在之胺基酸序列識別為外來胺基酸序列。因此，針對所投予之治療抗體發動免疫反應。個體產生中和抗體可顯著損害用治療性單株

抗體繼續治療個體之能力。典型地，一旦已在個體體內產生中和抗體，因為中和抗體有效減小或取消所投予之單株抗體的治療效果，所以即需要增加治療抗體之使用量。此可將治療抗體之使用僅限於初始治療，因而不會選擇重複或長期給予該治療抗體。簡言之，產生針對治療抗體之中和抗體可顯著限制該抗體之治療用途，且其又可顯著限制或完全阻止抗體在治療慢性疾病或復發性疾病中之用途。

為努力減小針對治療抗體產生中和抗體之可能性，已開發出許多方法，其經設計以藉由修飾抗體結構來減小抗體之免疫原性。一種此方法為生產嵌合抗體，從而使抗體重鏈及輕鏈恆定域源自由與經投予抗體之個體相同之物種所獲得的抗體。因為大多數治療抗體已開發用於人類，所以此等嵌合抗體典型地包含源自人類之重鏈及輕鏈恆定域結合源自非人類抗體（最典型地為小鼠或大鼠來源）之重鏈及輕鏈可變區。

減小治療抗體之免疫原性的其他方法採用稱作人類化之技術。術語人類化反映以下事實：正使經修飾抗體更像人類產生之抗體，以限制產生免疫反應之可能性。人類化技術擴展為許多製造更像人類之抗體的不同方法。

一種常用的人類化技術為CDR移植，從而使源自供體抗體（諸如源自鼠類之抗體）之互補決定區（CDR）與源自人類來源抗體之構架區組合形成重鏈及輕鏈可變域，接著使其與源自人類抗體重鏈及輕鏈恆定域組合。所得抗體因此僅含有有限數目的非人類來源胺基酸，其用以限制將被

人類免疫系統視作外來物的抗原決定基之存在。

一個與人類化相關之顯著缺陷在於其經常導致所得人類化抗體之結合親和力較之非人類化供體抗體所顯示之結合親和力要顯著減小。正如產生針對治療性單株抗體之中和抗體的情況，此可導致抗體之治療用途受到顯著損害。特定言之，結合親和力減小導致需要投予更大劑量之治療抗體且其可進一步需要亦增加給藥頻率。此等因素均導致療法成本增加及患者不便性增加。此外，投予個體更大量抗體引起針對治療抗體產生中和抗體的風險增大。

在人類化抗體以低於初始供體抗體之親和力結合於所需抗原決定基之情況下，此可歸因於構架區序列與抗原決定基結合 CDR 序列之不相容結構比對。經由用在供體抗體中相同位置之胺基酸使人類殘基回復突變的反覆過程，人類化抗體之親和力經常可得到恢復。儘管回復突變過程可引起其他非人類胺基酸殘基再引入人類化抗體中，但所得抗體仍稱為人類化，即使在最終序列中存在大量供體胺基酸。

藉由直接類比，適用於除人類外之物種的抗體物種化（speciesisation）類似地因以下要求而受損：產生維持經修飾抗體之結合特異性的構架變化，同時減小所得抗體在所選目標物種中之免疫原性。自商業觀點來看，因為尤其在高價值物種（諸如伴侶動物（貓及狗）及耐力動物（馬及駱駝））中可有效治療之常見疾病過程的範圍，或為了改良食物產生動物（諸如奶牛、綿羊、豬及雞）之肉質，所

以需要在除人類外之物種中使用抗體。因此，將非常需要可使適用於此等物種之抗體更簡單地轉化之方法。

因此需要修飾供體抗體以使其可投予目標個體，而所得抗體不顯示對目標抗原之結合親和力損失，同時將與接受者抗體序列之變化減到最小以減小於彼處產生針對其之中和抗體之可能性的改良方法。由此可見將非常需要將供體抗體序列轉化為具有最小數目之變化的目標物種序列以實現對 CDR 結構具有最小影響之目標物種構架結構之方法。

【發明內容】

本發明描述修飾適用於目標物種之供體抗體以使所得抗體在構架區內任何位置均不含有在該物種中該位置為外來物的任何胺基酸之方法。經修飾抗體因此將保持供體抗體之特異性及親和力，但同時將經修飾以便不會產生可能外來之抗原決定基。經修飾抗體因此將不會在目標物種中被視為外來物，因此將不會誘導免疫反應，該免疫反應可引起其功效中和，尤其是在長期投藥之後。可達成此之方法克服先前方法之所有固有缺點，但特徵在於顯著簡單性及簡潔性。

在廣泛努力之後，本發明之發明者已令人驚訝地開發出一種改變供體抗體或源於其之抗原結合片段以使其當投予目標物種時為完全或顯著非免疫原性的方法，該等目標物種為不同於供體抗體所來源之物種的物種。典型地，在投予個體之後針對所得抗體不會產生中和抗體。此外，改

變抗體以使其非免疫原性將不會引起對預定目標之結合特異性或親和力減小。

根據本發明之第一態樣，提供生產用於投予目標物種之非免疫原性免疫球蛋白之方法，該方法包含以下步驟：

-自除目標物種外之物種識別供體免疫球蛋白，其中該供體免疫球蛋白對目標物種中存在之目標抗原決定基具有結合特異性，

-確定供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區的胺基酸序列，

-比較供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列的各胺基酸殘基與存在於一或多種源自目標物種之免疫球蛋白之構架區之胺基酸序列中相應位置的胺基酸殘基，以識別供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區的胺基酸序列內一或多個在一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置所不存在之胺基酸殘基，及

-以存在於一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置的胺基酸殘基取代存在於供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中但不存在於一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置之該一或多個經識別胺基酸殘基。

該方法使得存在於供體免疫球蛋白中特異性構架(FW)區位置且亦存在於源自目標物種之免疫球蛋白中至少一個

相應構架區位置之任何胺基酸均不改變（亦即未經取代）。在某些具體實例中，目標物種之免疫球蛋白的構架區之胺基酸序列包含殘基池，可將其與存在於供體免疫球蛋白中相應位置之胺基酸殘基進行比較。典型地，此池包含源自複數種目標物種免疫球蛋白之位置特異性胺基酸殘基。典型地，該池包含源自目標物種之儘可能多的免疫球蛋白之構架區序列資料，且若可行，則包含公開資料庫中所存在之對於特定物種已知之所有免疫球蛋白之所有構架區序列。

源自不同物種之免疫球蛋白的構架區之胺基酸序列可源自許多為熟習此項技術者所熟知之公開可用資料庫。舉例而言，國家生物技術資訊中心（National Center for Biotechnology Information；NCBI）所持有之資料庫含有源自多種物種之抗體的免疫球蛋白序列資訊。其他資料庫可包括包含公開可得生殖系及經表現 cDNA 序列之任何資料庫且可包括雜誌出版物或資料庫，諸如（但不限於）免疫球蛋白序列之 Kabat 資料庫（URL：www.kabatdatabase.com）及 V BASE，人類抗體資料庫（http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/）。製備可能目標胺基酸之表的程序對於熟習此項技術者為常規的。

儘管比較可在供體序列與目標序列之單一成員之間進行，但明顯的是與目標序列池比較為較佳，因為此將擴大在目標物種中各 Kabat 位置之天然選擇的數目。此將不僅增大供體與目標之間「匹配」的機會，而且將當不存在匹配

5

時擴大置換選擇。

如本文所定義，非免疫原性免疫球蛋白為當投予目標物種時不具有於彼處針對其產生之免疫反應的免疫球蛋白。特定言之，體液（抗體介導）反應不會針對抗體，尤其針對包含源自構架（FW）區之胺基酸殘基的抗原決定基得到介導。

當供體胺基酸與目標胺基酸在 Kabat 數目方面不同時，胺基酸必須選自已知在目標中該位置為天然者。此將產生許多可能序列，任何序列均可產生本發明之較佳或至少適合序列。當需要取代供體免疫球蛋白構架區中存在之胺基酸殘基時，此典型地使用保守取代原理來進行。典型地，保守取代需要以同源胺基酸殘基（亦即共有類似特徵或性質之殘基）置換胺基酸。此置換可稱為同源取代。

在確定經取代胺基酸是否可經保守胺基酸置換時，典型地可對諸如（但不限於）以下之因素進行評估：(a)取代區域內多肽骨架之結構，例如薄片構形或螺旋構形；(b)目標位點之分子的電荷或疏水性及/或(c)側鏈體積。若殘基可經具有常見特徵（諸如類似側鏈或類似電荷或疏水性）之殘基取代，則此殘基作為取代基為較佳。

當考慮相應位置存在之目標物種免疫球蛋白殘基池中不存在之供體免疫球蛋白來源殘基是否可經保守取代時，較佳可基於根據側鏈性質相似性而集中在一起之胺基酸來評估同源胺基酸對於該特定位置是否在源自目標物種之相應殘基池中可得（A. L. Lehninger, Biochemistry, 第 2 版，

73-75, Worth Publishers, New York (1975))。舉例而言，可確定以下組：(1)非極性的：Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）、Pro（P）、Phe（F）、Trp（W）、Met（M）；(2)不帶電的極性的：Gly（G）、Ser（S）、Thr（T）、Cys（C）、Tyr（Y）、Asn（N）、Gln（Q）；(3)酸性的：Asp（D）、Glu（E）；及(4)鹼性的：Lys（K）、Arg（R）、His（H）。因此，以同一組中存在之另一胺基酸殘基取代一個胺基酸殘基為較佳。

或者，胺基酸可如下分組：(1)芳族：Phe（F）、Trp（W）、Tyr（Y）；(2)無極性的：Leu（L）、Val（V）、Ile（I）、Ala（A）、Met（M）；(3)脂族的：Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）；(4)酸性的：Asp（D）、Glu（E）；(5)鹼性的：His（H）、Lys（K）、Arg（R）；及(6)極性的：Gln（Q）、Asn（N）、Ser（S）、Thr（T）、Tyr（Y）。又，以同一組中存在之另一胺基酸殘基取代一個胺基酸殘基為較佳。

或者，胺基酸殘基可基於常見側鏈性質來分組：(1)疏水性：Met（M）、Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）；(2)中性親水性的：Cys（C）、Ser（S）、Thr（T）、Asn（N）、Gln（Q）；(3)酸性的：Asp（D）、Glu（E）；(4)鹼性的：His（H）、Lys（K）、Arg（R）；(5)影響鏈定向之殘基：Gly（G）、Pro（P）；及(6)芳族的：Trp（W）、Tyr（Y）、Phe（F）。又，以同一組中存在之另一胺基酸殘基取代一個胺基酸殘基將為較佳。

因此，保守取代將需要將此等種類之一的成員交換（取代）為該同一種類之另一成員。在某些具體實例中，引入供體免疫球蛋白構架區序列之胺基酸殘基為自源自目標物種之免疫球蛋白池的在該特定位置定義之共同胺基酸。共同胺基酸為在免疫球蛋白中該位置最常見之胺基酸，其包含貢獻於該池之目標物種免疫球蛋白之集合。

典型地，取代構架區殘基不會引起免疫球蛋白對其預定配位體之結合減小。特定言之，結合親和力或特異性不減小。

在某些具體實例中，該方法進一步包含以下步驟：以源自源於目標物種之免疫球蛋白的等效重鏈及/或輕鏈置換供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈之至少一個及較佳所有恆定域。在某些具體實例中，目標物種來源恆定域為抗體亞型免疫球蛋白G（IgG）的。

在某些具體實例中，用以評估構架區之胺基酸殘基的供體免疫球蛋白胺基酸序列池可限於源自目標物種之免疫球蛋白的亞型，例如來自κ輕鏈或λ輕鏈。

不希望受理論約束，該方法僅引起最小數目之對供體免疫球蛋白構架區序列進行之必需變化（胺基酸取代），同時確保所得構架區序列中之所有胺基酸均與目標物種之胺基酸比對。此因此將由將自供體免疫球蛋白之抗體修飾為當投予目標個體時將為完全或實質上非免疫原性之抗體引起的結構變化減到最小。由於方法涉及取代最少可能殘基，因此該方法可稱為簡約必需轉譯（Parsimonious

Essential Translation；PET）。藉由擴增，對供體免疫球蛋白所進行的使其當投予目標動物物種時為非免疫原性之變化可稱為 PET 化（PETisation）且所得抗體可稱為經 PET 化（PETized）。此方法可例如引起現存人類、小鼠或大鼠抗體之物種化，以使其可投予另一目標物種，特定言之動物物種，諸如人類、狗、貓或馬，而不會於彼處針對其產生中和抗體。

在某些具體實例中，目標物種為哺乳動物目標物種。在一個具體實例中，目標哺乳動物物種為動物，特定言之為伴侶動物，諸如（但不限於）狗、貓或馬或家畜動物。在其他具體實例中，哺乳動物目標物種為人類。

在某些具體實例中，目標抗原決定基為神經生長因子（NGF）或腫瘤壞死因子（TNF）。

在多個其他具體實例中，提供一種組成物，其含有藉由本發明之前述態樣之方法提供的免疫球蛋白，或其抗原結合片段。組成物可進一步包含至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。另一態樣提供藉由本發明之前述態樣之方法生產的免疫球蛋白或其抗原結合片段之用途，其用於製備供治療或預防疾病之醫藥品。在多個其他態樣中，本發明擴展為前述免疫球蛋白或其抗原結合片段之用途，其用治療方法及診斷方法中。本發明進一步擴展為適用於治療或預防疾病之根據技術方案第 1 至 15 項中任一項生產之免疫球蛋白，或其抗原結合片段。

本發明之另一態樣係關於投予個體（特定言之為哺乳

動物個體）根據任何本文定義之方法生產的免疫球蛋白或其抗原結合片段以便治療或預防疾病。

去除免疫化

在多個其他態樣中，本發明擴展為修飾治療性免疫球蛋白以使其當投予特異性物種時變得非免疫原性。該修飾可應用於嵌合抗體，藉由 CDR 移植技術生產之抗體，或人類化抗體。

在另一態樣中，本發明因此提供一種修飾治療性免疫球蛋白以使其非免疫原性之方法，該方法包含以下步驟：

-提供供體治療性免疫球蛋白，

-確定供體免疫球蛋白之輕鏈及/或重鏈可變域之至少一個構架區的胺基酸序列，

-獲得與源自待要投予免疫球蛋白之目標物種的免疫球蛋白之輕鏈及/或重鏈之可變域的至少一個構架區有關之胺基酸序列池，

-比較供體免疫球蛋白之輕鏈及/或重鏈之至少一個構架區之胺基酸序列的胺基酸殘基與在胺基酸序列池中具有相同 Kabat 編號之胺基酸殘基，及

-以在胺基酸序列池中具有相同 Kabat 編號之胺基酸殘基取代供體免疫球蛋白之輕鏈及/或重鏈之至少一個構架區之胺基酸序列的任何胺基酸殘基，其中供體免疫球蛋白之輕鏈及/或重鏈之至少一個構架區的胺基酸序列中存在之胺基酸殘基不同於在胺基酸序列池中具有相同 Kabat 編號之胺基酸殘基。

典型地，使用此方法將治療性免疫球蛋白再人類化產生免疫原性小於未改變之供體治療抗體之免疫球蛋白。此外，經修飾抗體保持其結合親和力及特異性。因此，所得經修飾抗體在治療上較適用。

在某些具體實例中，所得 PET 化抗體或其結合片段以 1×10^{-8} 或 1×10^{-8} 以下之 K_D 結合親和力結合於所需目標抗原決定基。

本發明之另一態樣擴展為提供至少一個適用於免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈可變域之構架區。本發明之此態樣的方法可在諸如抗體人類化之方法中或在用以在將抗體投予除人類外之物種前修飾抗體以將其去除免疫化之等效方法中具有特定效用。本發明之此態樣所提供的構架區可引入將要經受人類化或類似物種化方法之抗體中，或可回顧地引入先前已經受物種化之抗體中。特定言之，經修飾構架區可引入借助於諸如 CDR 移植之方法已經受或將要經受修飾之抗體中，或引入抗體之 Fab 區源自第一物種且抗體之 Fc 區源自第二物種之嵌合抗體中。

因此，此其他態樣提供一種修飾供體免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈可變域之至少一個構架區之胺基酸序列的方法，該方法包含以下步驟：

-確定供體免疫球蛋白之至少一個構架區序列之胺基酸序列；

-以逐個殘基之方式，比較供體免疫球蛋白之至少一個構架區之各位置的特異性胺基酸殘基與包含源自待要投予

經修飾來源免疫球蛋白之物種的抗體中所見之構架區序列中相應胺基酸位置所見之胺基酸殘基池的資料庫。

-以存在於相應胺基酸位置所見之胺基酸殘基池中的胺基酸殘基取代存在於供體免疫球蛋白之至少一個構架區中特定位置，但不存在於在相應胺基酸位置所見之胺基酸殘基池中的任何胺基酸殘基；及

-保持存在於供體免疫球蛋白之至少一個構架區中特定位置且亦存在於相應胺基酸位置所見之胺基酸殘基池中的任何胺基酸殘基均不改變。

典型地，任何置換之胺基酸殘基均經與所置換胺基酸殘基最同源之胺基酸殘基取代。如上文所定義，已知胺基酸殘基之同源基團。若同源胺基酸殘基不存在於該池中，則胺基酸可經最經常出現於該特定位置之胺基酸殘基（所謂共同胺基酸殘基）取代。

在某些具體實例中，方法擴展為一種生產經修飾抗體之方法，其包含表現經修飾構架區序列以及互補決定區（CDR）及重鏈及/或輕鏈恆定域以生產包含該等經修飾構架區序列之異源四聚抗體的步驟。

本發明之某些其他態樣擴展為提供表現經修飾構架區序列之胺基酸序列的寡核苷酸，及在宿主細胞中表現該寡核苷酸。

本發明之另一態樣係關於一種生產具有非免疫原性構架區序列之治療抗體的方法，該方法包含以下步驟：

-如下識別待要取代之構架區胺基酸殘基：比較構架區

之胺基酸序列與源自待要投予治療抗體之物種的複數種免疫球蛋白中相應胺基酸位置所存在的相應胺基酸殘基池以識別一或多個在特定位置不同之胺基酸殘基；及

-以相應胺基酸殘基池中存在之胺基酸殘基取代該一或多個經識別胺基酸殘基。

在某些具體實例中，藉由進行序列及池殘基比對來識別構架區胺基酸殘基是否存在於待要投予抗體之物種之相應胺基酸殘基位置池中。經取代之殘基基本上不會減小所得經修飾抗體之結合活性。亦即，經取代之胺基酸可取代不會顯著影響抗體結合特徵之不同胺基酸。此主要藉由以同源胺基酸取代胺基酸來達成，同源胺基酸為具有類似或相關特徵（諸如分子之尺寸、極性/電荷或在目標位點之疏水性，或側鏈體積）之胺基酸。或者，殘基可經出現於目標物種中相應位置之共同殘基取代。

經取代（或可取代）之胺基酸殘基存在於可稱為變異寬容位置（variant tolerant position）之位置。亦即，以該殘基取代另一殘基不會改變插入構架區之間的互補決定區之結合特異性。由於存在於一種物種之構架區之特定位置的殘基可能不存在於第二物種之構架區序列中的相應位置，因此認為此取代為必需的。因此，借助於形成被胺基酸殘基並非通常存在於構架區序列之該位置的物種之免疫系統視作外來物之抗原決定基，胺基酸可引起於彼處產生針對其之免疫原性反應。使用以目標物種中存在之同源殘基或共同殘基取代離群殘基（outlier residue）的方法，可

改變可能外來之抗原決定基以形成不會被識別為外來物的抗原決定基。自抗體之構架區移除所有此等抗原決定基因此可阻止當向與抗體最初來源之物種為不同物種的個體投藥時針對抗體之彼部分產生體液反應。

普遍存在的物種特異性構架區生產

發明者已進一步定義了一系列可與互補決定區（CDR）組合形成非免疫原性 PET 化重鏈及輕鏈可變域之構架區（FR）。重鏈及輕鏈域各自具有 4 個構架區，指定為 FR1、FR2、FR3 及 FR4。此方法可應用於使任何抗體（免疫球蛋白）去除免疫化以使其可投予所需物種。然而，僅為了達成例證之目的，暗示（undernoted）實例將說明在基於人類、犬類、貓類及馬類之抗體中生產及使用此等構架區。

抗體結構

抗體分子可包含含有 CDR1 區、CDR2 區及 CDR3 區及相關插入構架區之重鏈可變域。重鏈可變域（VH）CDR 係稱為 VHCDR，根據 Kabat 編號系統此等 CDR 可見於以下位置：VHCDR1 - Kabat 殘基 31-35、VHCDR2 - Kabat 殘基 50-65 及 VHCDR3 -Kabat 殘基 95-102（Kabat EA 等人, (1991) Sequences of proteins of immunological interest, 第 5 版. Bethesda: US Department of Health and Human Services）。

此外，抗體進一步包含含有 CDR1 區、CDR2 區及 CDR3 區及相關插入構架區之輕鏈可變域。輕鏈可變域（VL）CDR 係稱為 VLCDR，根據 Kabat 編號系統此等 CDR 可見於以下胺基酸殘基位置：VLCDR1 - Kabat 殘基 24-34、VLCDR2 -

Kabat 殘基 50-56 及 VLCDR3 - Kabat 殘基 89-97。

輕鏈或重鏈可變域包含四個構架區，即 FR1、FR2、FR3 及 FR4，在以下排列中插有 CDR：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

本發明之另一態樣提供用於投予目標物種之免疫球蛋白，其包含：

-源自目標物種之免疫球蛋白的輕鏈及重鏈恆定域，

-源自供體免疫球蛋白之互補決定區（CDR），其中供體免疫球蛋白特異性結合於目標物種中存在之配位體，及

-源自供體免疫球蛋白之構架區，其中亦未存在於目標物種之任何免疫球蛋白之相應位置的任何胺基酸殘基均經目標物種中相應位置所見之胺基酸取代。

典型地，不對抗體之 CDR 區進行胺基酸取代。此外，在某些具體實例中，構架區包含不超過 7 個連續胺基酸殘基經目標物種之殘基取代。此外，在某些具體實例中，構架區包含不超過 5 個連續胺基酸殘基經目標物種之殘基取代。此外，在某些具體實例中，構架區包含不超過 3 個連續胺基酸殘基經目標物種之殘基取代。

此外，在某些具體實例中，供體免疫球蛋白構架區（重鏈 FR1、FR2、FR3 及 FR4 及輕鏈 FR1、FR2、FR3 及 FR4）之不超過 10 個胺基酸殘基經目標物種之殘基取代。此外，在某些具體實例中，供體免疫球蛋白構架區（重鏈 FR1、FR2、FR3 及 FR4 及輕鏈 FR1、FR2、FR3 及 FR4）之不超過 7 個胺基酸殘基經目標物種之殘基取代。此外，在某些

具體實例中，供體免疫球蛋白構架區（重鏈 FR1、FR2、FR3 及 FR4 及輕鏈 FR1、FR2、FR3 及 FR4）之不超過 5 個胺基酸殘基經目標物種之殘基取代。

在某些具體實例中，目標物種為哺乳動物物種。特定言之，目標物種可為人類、犬類、貓類或馬類。

因此，在免疫球蛋白投予作為目標物種之犬類的具體實例中，免疫球蛋白包含源自犬類來源抗體之恆定域區域，且取代至供體免疫球蛋白構架區中之殘基源自相應犬類構架區胺基酸殘基。

因此，在免疫球蛋白投予作為目標物種之貓類的具體實例中，免疫球蛋白包含源自貓類來源抗體之恆定域區域，且取代至供體免疫球蛋白構架區中之殘基源自相應貓類構架區胺基酸殘基。

因此，在免疫球蛋白投予作為目標物種之馬類的具體實例中，免疫球蛋白包含源自馬類來源抗體之恆定域區域，且取代至供體免疫球蛋白構架區中之殘基源自相應馬類構架區胺基酸殘基。

因此，在免疫球蛋白投予作為目標物種之人類的具體實例中，免疫球蛋白包含源自人類來源抗體之恆定域區域，且取代至供體免疫球蛋白構架區中之殘基源自相應人類構架區胺基酸殘基。

在各個其他具體實例中，提供一種組成物，其含有本發明之前述態樣的免疫球蛋白，或其抗原結合片段。組成物可進一步包含至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載

劑。另一態樣提供本發明之前述態樣的免疫球蛋白或其抗原結合片段之用途，其用於製備供治療或預防疾病之醫藥品。在多個其他態樣中，本發明擴展為前述免疫球蛋白或其抗原結合片段之用途，其用於治療方法及診斷方法中。本發明進一步擴展為適用於治療或預防疾病的本發明之前述態樣的免疫球蛋白或其抗原結合片段。

本發明之另一態樣係關於投予個體（特定言之為哺乳動物個體）本發明之前述態樣的免疫球蛋白或其抗原結合片段以便治療或預防疾病。

本發明之另一態樣提供一種生產免疫球蛋白之方法，其包含以下步驟：

-將編碼重鏈及輕鏈之核苷酸引入細胞中，其中核苷酸編碼包含根據本文定義之方法生產的構架區之輕鏈及重鏈可變域，及

-在細胞中表現核苷酸以生產免疫球蛋白。

本發明之另一態樣提供一種生產當投予目標物種時為實質上非免疫原性之免疫球蛋白之方法，該方法包含以下步驟：

(1)比較供體免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈構架區之序列與目標物種免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈構架區之序列集合；

(2)以存在於目標物種免疫球蛋白構架區序列集合中相應位置之胺基酸殘基取代存在於供體免疫球蛋白構架區序列中特定位置但不存在於目標物種免疫球蛋白構架區序列集合中相應位置的任何胺基酸殘基；

(3)合成編碼重鏈及/或輕鏈可變區之 DNA 區段，其包含供體免疫球蛋白可變區及經取代構架區之 CDR，以及物種適當重鏈及/或輕鏈恆定域；

(4)將 DNA 區段引入細胞中；及

(5)在細胞中表現 DNA 區段以生產免疫球蛋白。

在某些具體實例中，方法進一步包含為供體免疫球蛋白輕鏈及重鏈可變區定序之步驟。在某些具體實例中，該方法進一步包含純化免疫球蛋白之步驟。

在某些具體實例中，該方法進一步包含在醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑中調配免疫球蛋白之步驟。

本發明之另一態樣提供能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF）之中和抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及/或重鏈可變區，該輕鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列，該重鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約 15 個胺基酸、較佳約 20 個胺基酸、更佳約 25 個胺基酸之長度上。

抗體可使用本發明之方法製備。

在某些具體實例中，輕鏈包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列。在某

些具體實例中，該一致性係在至少約15個胺基酸、較佳約20個胺基酸、更佳約25個胺基酸之長度上。

在某些具體實例中，重鏈包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 24之胺基酸序列，或與其具有至少85%、90%、95%或99%序列一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約15個胺基酸、較佳約20個胺基酸、更佳約25個胺基酸之長度上。

發明者已進一步定義了一系列可與互補決定區（CDR）組合形成人類化重鏈及輕鏈可變域之構架區（FR）。人類重鏈及輕鏈域各自具有4個構架區，指定為FR1、FR2、FR3及FR4。

因此，亦提供能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF）之中和抗體或抗原結合片段，其中抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含以下至少一者：

由SEQ ID NO: 60之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列的FR1構架區、

由SEQ ID NO: 61之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列的FR2構架區、

由SEQ ID NO: 62之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列的FR3構架區，及

由SEQ ID NO: 63之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列的FR4構架區，

及/或重鏈可變區，該輕鏈可變區包含以下至少一者：

由SEQ ID NO: 64之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO:

64之胺基酸序列的FR1構架區、

由SEQ ID NO: 65之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列的FR2構架區、

由SEQ ID NO: 66之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列的FR3構架區，及

由SEQ ID NO: 67之胺基酸序列組成或包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列的FR4構架。

在某些具體實例中，輕鏈包含所有輕鏈FR1、FR2、FR3及FR4及/或重鏈包含所有重鏈FR1、FR2、FR3及FR4。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的抗體或結合片段以平衡解離常數（K_D）為 1×10^{-8} 或小於 1×10^{-8} 之結合親和力特異性結合於人類NGF。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的抗體或結合片段抑制人類NGF結合於p75或TrkA人類NGF受體之能力。

本發明之上述態樣的抗體或結合片段較佳在人類中不具有免疫原性。

典型地，本發明之上述態樣的抗體包含源自源於人類之免疫球蛋白的輕鏈及/或重鏈恆定域。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的結合片段選自由以下組成之群：單鏈Fv（scFv）抗體片段、Fab抗體片段、Fab'抗體片段及$F(ab')_2$抗體片段。

在多個其他態樣中，本發明擴展為編碼本發明之抗體或抗原結合片段的經分離核酸。

因此，本發明之另一態樣提供編碼根據本發明任何前述態樣之抗體或抗原結合片段之經分離核酸。

在某些具體實例中，聚核苷酸編碼具有 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之輕鏈可變域。

亦提供一種經分離核酸，其編碼具有 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之輕鏈。

在某些具體實例中，聚核苷酸編碼具有 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之重鏈可變域。

亦提供一種經分離核酸，其編碼具有 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之重鏈。

在某些具體實例中，經分離核酸進一步包含編碼一或多個可操作地與其連接之調節序列的核酸。

在另一態樣中，提供一種表現載體，其包含編碼本發明之重鏈及/或輕鏈可變域或重鏈及/或輕鏈的聚核苷酸。在某些具體實例中，表現載體進一步包含一或多個調節序列。在某些具體實例中，載體為質體或反轉錄病毒載體。

另一態樣提供併有本發明之前述態樣之表現載體的宿主細胞。本發明之另一態樣提供生產本發明之任何前述態

樣之抗體的宿主細胞。

本發明之另一態樣提供一種生產人類化 NGF 中和抗體之方法，該方法包含培養本發明之前述態樣之宿主細胞以使細胞表現人類化 NGF 中和抗體的步驟。

本發明之另一態樣提供一種生產根據本發明之 NGF 中和抗體之方法，其包含以下步驟：在適合宿主細胞中表現本發明之前述態樣之一或多種聚核苷酸/核酸或載體（其表現本發明之抗體輕鏈及/或重鏈）、回收可能在宿主細胞中一起表現或在不同宿主細胞中分別表現之所表現多肽，及分離抗體。

在某些具體實例中，提供本發明之抗體或結合片段及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

本發明之另一態樣提供本發明之上述態樣之抗體或結合片段、核酸、醫藥組成物或表現載體之用途，其用於製備供治療或預防疾病（諸如關節炎）或供治療、預防或改善疼痛（諸如與疾病相關之疼痛，例如神經痛、手術後疼痛、慢性疼痛、癌痛等）之醫藥品。在多個其他態樣中，本發明擴展為本發明之上述態樣之抗體或結合片段之用途，其用於治療方法及診斷方法中。

本發明之另一態樣係關於投予個體（特定言之為哺乳動物個體）本發明之上述態樣之抗體或結合片段、核酸、醫藥組成物或表現載體以便治療或預防疾病（例如關節炎）或疼痛。

在某些具體實例中，疾病為由以下引起、與以下相關

或導致以下之病狀：對神經生長因子（NGF）之敏感性增大。在某些具體實例中，疾病係關於由 NGF 誘導增生之腫瘤（例如骨肉瘤）。

在某些具體實例中，本發明之前述方法進一步包含共投予至少一種可增強及/或補充本發明之抗 NGF 抗體之效用的其他醫藥品之步驟。舉例而言，抗體或其抗原結合片段可連同至少一種止痛劑、NSAID、類鴉片、皮質類固醇、類固醇、透明質酸（hyaluronan）或玻尿酸共投予。

在另一態樣中，提供一種細胞系或其衍生物或後代細胞，其生產根據本發明之抗人類 NGF 中和單株抗體或其片段。

本發明之另一態樣提供一種用於治療人類疼痛，或治療與疼痛相關之病狀，或用於治療、改善或抑制與骨關節炎、類風濕性關節炎及炎症相關之疼痛的套組，其包含根據本發明之任何前述態樣之抗 NGF 抗體及其使用說明書。

本發明之另一態樣提供一種試管內、活體外及活體內偵測流體中抗人類 NGF 單株抗體之診斷套組，其適用於測定該抗體之濃度。該套組可包含任何本發明之抗體或其結合片段。該套組可包含其使用說明書。

本發明之另一態樣提供能夠特異性結合於犬類腫瘤壞死因子（TNF）之中和抗體或其抗原結合片段，其中抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及/或重鏈可變區，該輕鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 71 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%、90%、95%或

99%一致性之胺基酸序列，該重鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 16之胺基酸序列，或與其具有至少85%、90%、95%或99%一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約15個胺基酸、較佳約20個胺基酸、更佳約25個胺基酸之長度上。

抗體可使用本發明之方法製備。典型地，本發明之上述態樣之抗體包含源自源於犬類之免疫球蛋白的輕鏈及/或重鏈恆定域。在某些具體實例中，重鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 18、19、20或21之胺基酸序列，或與其具有至少85%、90%、95%或99%序列一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約15個胺基酸、較佳約20個胺基酸、更佳約25個胺基酸之長度上。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的抗體或結合片段以平衡解離常數（K_D）為1×10^{-8}或小於1×10^{-8}之結合親和力特異性結合於犬類NGF。本發明之上述態樣之抗體或結合片段較佳在犬類中不具免疫原性。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的結合片段選自由以下組成之群：單鏈Fv（scFv）抗體片段、Fab抗體片段、Fab'抗體片段及$F(ab')_2$抗體片段。

在多個其他態樣中，本發明擴展為編碼本發明之抗體或抗原結合片段的經分離核酸。

因此，本發明之另一態樣提供編碼根據本發明任何前述態樣之抗體或抗原結合片段之經分離核酸。

在某些具體實例中，多核苷酸編碼具有 SEQ ID NO: 71 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 TNF 抗體或抗原結合片段之輕鏈可變域。

在某些具體實例中，經分離核酸進一步包含編碼一或多個可操作地與其連接之調節序列的核酸。在另一態樣中，提供一種表現載體，其包含編碼本發明之重鏈及/或輕鏈可變域或重鏈及/或輕鏈的聚核苷酸。在某些具體實例中，表現載體進一步包含一或多個調節序列。在某些具體實例中，載體為質體或反轉錄病毒載體。另一態樣提供併有本發明之前述態樣之表現載體的宿主細胞。本發明之另一態樣提供生產本發明之任何前述態樣之抗體的宿主細胞。

本發明之另一態樣提供一種生產犬類化 TNF 中和抗體之方法，該方法包含培養本發明之前述態樣之宿主細胞以使細胞表現犬類化 TNF 中和抗體的步驟。

本發明之另一態樣提供一種生產根據本發明之 TNF 中和抗體之方法，其包含以下步驟：在適合宿主細胞中表現本發明之前述態樣之一或多種聚核苷酸/核酸或載體（其表現本發明之抗體輕鏈及/或重鏈）、回收或許在宿主細胞中一起表現或在不同宿主細胞中分別表現之所表現多肽，及分離抗體。

在某些具體實例中，提供本發明之抗體或結合片段及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

本發明之另一態樣提供本發明之上述態樣之抗體或結合片段、核酸、醫藥組成物或表現載體的用途，其用於製備供治療或預防疾病，特定言之任何由以下引起、與以下相關或導致以下之病狀的醫藥品：在犬類中犬類 TNF 表現增大或對 TNF 之敏感性增大。在多個其他態樣中，本發明擴展為本發明之上述態樣之抗體或結合片段之用途，其用於治療方法及診斷方法中。

本發明之另一態樣係關於投予犬類本發明之上述態樣之抗體或結合片段、核酸、醫藥組成物或表現載體以便治療或預防疾病。

在另一態樣中，提供一種細胞系或其衍生物或後代細胞，其生產根據本發明之抗犬類 TNF 中和單株抗體或其片段。

本發明之另一態樣提供能夠特異性結合於犬類神經生長因子（NGF）之中和抗體或其抗原結合片段，其中抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及/或重鏈可變區，該輕鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列，該重鏈可變區包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約 15 個胺基酸、較佳約 20 個胺基酸、更佳約 25 個胺基酸之長度上。

抗體可使用本發明之方法製備。

在某些具體實例中，輕鏈包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，或與其具有至少85%、90%、95%或99%一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約15個胺基酸、較佳約20個胺基酸、更佳約25個胺基酸之長度上。

在某些具體實例中，重鏈包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：SEQ ID NO: 70之胺基酸序列，或與其具有至少85%、90%、95%或99%序列一致性之胺基酸序列。在某些具體實例中，該一致性係在至少約15個胺基酸、較佳約20個胺基酸、更佳約25個胺基酸之長度上。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的抗體或結合片段以平衡解離常數（K_D）為 1×10^{-8} 或小於 1×10^{-8} 之結合親和力特異性結合於犬類 NGF。在某些具體實例中，本發明之上述態樣之抗體或結合片段抑制犬類 NGF 結合於 p75 或 TrkA 犬類 NGF 受體之能力。本發明之上述態樣之抗體或結合片段較佳在犬類中不具免疫原性。

典型地，本發明之上述態樣之抗體包含源自源於犬類之免疫球蛋白的輕鏈及/或重鏈恆定域。

在某些具體實例中，本發明之上述態樣的結合片段選自由以下組成之群：單鏈 Fv（scFv）抗體片段、Fab 抗體片段、Fab'抗體片段及 $F(ab')_2$ 抗體片段。

在多個其他態樣中，本發明擴展為編碼本發明之抗體或抗原結合片段的經分離核酸。

因此，本發明之另一態樣提供編碼根據本發明任何前

述態樣之抗體或抗原結合片段之經分離核酸。

在某些具體實例中，多核苷酸編碼具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之輕鏈可變域。

亦提供一種經分離核酸，其編碼具有 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之輕鏈。

在某些具體實例中，多核苷酸編碼具有 SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之重鏈可變域。

亦提供一種經分離核酸，其編碼具有 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列或與其具有至少 85%、90%、95%或 99%一致性之胺基酸序列的抗 NGF 抗體或抗原結合片段之重鏈。

在某些具體實例中，經分離核酸進一步包含編碼一或多個可操作地與其連接之調節序列的核酸。

在另一態樣中，提供一種表現載體，其包含編碼本發明之重鏈及/或輕鏈可變域或重鏈及/或輕鏈的聚核苷酸。在某些具體實例中，表現載體進一步包含一或多個調節序列。在某些具體實例中，載體為質體或反轉錄病毒載體。

另一態樣提供併有本發明之前述態樣之表現載體的宿主細胞。本發明之另一態樣提供生產本發明之任何前述態樣之抗體的宿主細胞。

本發明之另一態樣提供一種生產犬類化 NGF 中和抗體之方法，該方法包含培養本發明之前述態樣之宿主細胞以使細胞表現犬類化 NGF 中和抗體的步驟。

本發明之另一態樣提供一種生產根據本發明之 NGF 中和抗體之方法，其包含以下步驟：在適合宿主細胞中表現本發明之前述態樣之一或多種聚核苷酸/核酸或載體（其表現本發明之抗體輕鏈及/或重鏈）、回收或許在宿主細胞中一起表現或在不同宿主細胞中分別表現之所表現多肽，及分離抗體。

在某些具體實例中，提供本發明之抗體或結合片段及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

本發明之另一態樣提供本發明之上述態樣之抗體或結合片段、核酸、醫藥組成物或表現載體之用途，其用於製備供在犬類中治療或預防疾病（諸如關節炎）或治療、預防或改善疼痛（諸如與疾病相關之疼痛，例如神經痛、手術後疼痛、慢性疼痛、癌痛等）之醫藥品中。在多個其他態樣中，本發明擴展為本發明之上述態樣之抗體或結合片段之用途，其用於治療方法及診斷方法中。

本發明之另一態樣係關於投予犬類本發明之上述態樣之抗體或結合片段、核酸、醫藥組成物或表現載體以便治療或預防疾病（例如關節炎）或疼痛。

在某些具體實例中，疾病為由以下引起、與以下相關或導致以下之病狀：對神經生長因子（NGF）之敏感性增大。在某些具體實例中，疾病係關於由 NGF 誘導增生之腫瘤（例

如骨肉瘤）。

在某些具體實例中，本發明之前述方法進一步包含共投予至少一種可增強及/或補充本發明之抗NGF抗體之效用的其他醫藥品之步驟。舉例而言，抗體或其抗原結合片段可連同至少一種止痛劑、NSAID、類鴉片、皮質類固醇、類固醇、透明質酸或玻尿酸共投予。

在另一態樣中，提供一種細胞系或其衍生物或後代細胞，其生產根據本發明之抗犬類 TNF 中和單株抗體或其片段。

本發明之另一態樣提供一種用於治療犬類疼痛，或治療與疼痛相關之病狀，或用於治療、改善或抑制與骨關節炎、類風濕性關節炎及炎症相關之疼痛的套組，其包含根據本發明之任何前述態樣之抗 NGF 抗體及其使用說明書。

本發明之另一態樣提供一種試管內、活體外及活體內偵測流體中抗犬類 NGF 單株抗體之診斷套組，其適用於測定該抗體之濃度。該套組可包含任何本發明之抗體或其結合片段。該套組可包含其使用說明書。

【實施方式】

本發明擴展為設計及製造供體抗體之變異體的新穎方法，該變異體當投予不同於該抗體所源於之物種的物種時具有減小之免疫原性，而同時維持（亦即不減小）抗體對目標配位體之結合親和力、親合力或特異性。特定言之，評估抗體或抗體結合片段之構架區序列且將其修飾以移除在源自待要投予抗體之物種的抗體池中相應位置未見之殘

基。

特定言之，本發明之方法修飾供體（親本）抗體之構架以使其最佳地與預定接受者相容，其中預定接受者為除供體外之物種。

在此項技術中迄今為止，使抗體去除免疫化之最常用方法曾經為自接受者物種之生殖系序列選擇相容性構架且將 CDR 區移植至構架中。此方法之問題在於對於 CDR 而言所選構架很少能完美匹配，因此對預定目標抗原決定基之結合親和力減小。接著需要親和力成熟，其導致引入在引入位置對於接受者有時為外來物的胺基酸。解決方法為本發明之程序，其中僅當胺基酸在特定位置對接受者為外來物時對供體構架進行修飾。置換選自組裝為本發明之部分的選擇清單。因此，作為本發明之關鍵，供體構架基本上無結構修飾，因此 CDR 構形基本上不變形，但同時在構架內不存在「非自體」胺基酸且所得免疫球蛋白缺乏在目標物種中為外來物之構架抗原決定基。該方法可用以修飾免疫球蛋白以便投予任何所需目標物種。

在迄今為止免疫球蛋白序列多樣性之最廣泛研究中，Glanville 及同事（2009）研究了自 654 種人類供體之原生 IgM 擴增的幾乎 100,000 種重鏈及輕鏈 cDNA 之胺基酸組成。95%序列各自與生殖系有多達 30 個突變之不同。證明僅經由體細胞突變來突變之 CDR1 及 CDR2 與生殖系 DNA 不改變，僅 17%及 78% CDR1 及 CDR2 序列具有在 1 個與 6 個之間的胺基酸差異。此研究未描述非 CDR 構架殘基之突

變，其描述於本文所示之表中。鑒於體細胞超突變係經由易錯 DNA 複製機制達成，突變率本身不可能在對於 CDR1 或 CDR2 所觀察到者與構架序列之其餘部分之間不同，且此外，在經歷過抗原之譜系中在免疫反應成熟期間在體細胞超突變後之深刻二級選擇將允許構架區中之進一步胺基酸多樣性。由於此等原因，因此在本文所述之人類、犬類、馬類及貓類 IgG 序列集合中觀察到之多樣性可能代表循環性 IgG 序列。令人驚訝的是，在各物種體細胞超突變後之免疫球蛋白之同源「Kabat」構架位置編碼的胺基酸之間存在可觀的重疊，因此，根據本發明之方法，此減少對自一種物種轉化為另一物種所必需之變化。

作為本發明及以下廣泛實驗之實例，發明者已取得未知結合於犬類 TNFα 或犬類 NGF 之 D2E7 抗人類 TNF 抗體及 αD11 大鼠抗小鼠 NGF 抗體，且已令人驚訝地將其用作生產適用於犬類之非免疫原性抗體的基礎。顯示不使用標準 CDR 移植技術生產之所得非免疫原性抗體顯示分別以高親和力結合於犬類 TNF 及 NGF。此外，已設計抗體以使構架區及恆定區僅併有犬類 IgG 分子中存在之殘基，以便當投予犬類時，不可能於彼處針對其產生外來抗體（xenoantibody）。因此，本發明之犬類化抗體適用於長期投予以便治療犬類之疾病。類似地，本發明之貓類化、人類化及馬類化 NGF 抗體適用於長期投予以便分別治療貓類、人類及馬類之疾病。

發明者已採用的產生本發明之抗體重鏈及輕鏈可變域

的方法導致在該位置以目標（例如犬類）殘基置換已知對目標（例如犬類）為外來物的特異性供體胺基酸殘基，根據發明者分析，該目標殘基將保持 CDR 區之構形，因此維持結合特異性及親合力，同時減少當待要以不變形式投予目標（例如犬類）時可能導致針對抗體產生中和抗體的免疫原性抗原決定基之存在。特定言之，製備本發明抗體之方法（稱為 PET 化）包含藉由比較供體抗體之構架區序列與源自目標（例如犬類）之抗體或抗體池的序列來評估供體（例如人類）抗體之構架區序列對於投予目標（例如犬類）之適用性。儘管比較可在供體序列與目標序列之單一成員之間進行，但明顯的是與目標序列池比較為較佳，因為此將擴大在目標物種中各 Kabat 位置之天然選擇的數目。此將不僅增大供體與目標之間「匹配」的機會，而且將當不存在匹配時擴大置換選擇。因此，將能夠選擇具有儘可能接近供體之特徵的置換。當供體序列與犬類序列在任何 Kabat 編號或相應位置方面不同時，修飾供體序列以用已知在目標（例如犬類）之該位置為天然的胺基酸殘基取代所討論之胺基酸殘基。

當需要取代供體免疫球蛋白構架區中存在之胺基酸殘基時，典型地，此使用保守取代原理來進行，其中胺基酸殘基係經在目標（例如犬類）中該 Kabat 位置為天然的且在尺寸、電荷及疏水性方面與供體序列中所取代之胺基酸儘可能緊密相關的胺基酸殘基置換。目的在於選擇將對供體抗體之三維結構不引起，或引起至少僅最小的干擾或破壞

之置換。在某些情況下，不存在明確選擇且各選擇將有利也有弊。最終決定可能需要三維模型化或甚至表現各種替代性序列。然而，一般而言，明確優先項將可用。作為此程序之結果，僅當殘基在目標中為外來物時進行供體序列變化且置換胺基酸儘可能與其所置換之胺基酸緊密相關。因此，避免產生外來抗原決定基，但保持總體三維結構，因此亦保持親和力及特異性。本發明之此態樣的例示性實例包括：

-輕鏈序列 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17、25、27 及 71。

-重鏈序列 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、19、20、21、24、26、68、69 及 70。

抗體生產

本發明之抗體及結合成員可完全或部分藉由化學合成來生產。舉例而言，本發明之抗體及結合構件可藉由熟習此項技術者熟知之技術（諸如標準液體肽合成）或藉由固相肽合成法來製備。或者，抗體及結合構件可在溶液中使用液相肽合成技術或進一步藉由固相、液相及溶液化學之組合來製備。

本發明進一步擴展為藉由表現編碼至少一種胺基酸之核酸來生產本發明之抗體或結合構件，其於適合表現系統中包含本發明之抗體，以便可編碼所需肽或多肽。舉例而言，可以表現編碼胺基酸輕鏈之第一核酸及編碼胺基酸重鏈之第二核酸以提供本發明之抗體。

因此，在本發明之某些其他態樣中，提供編碼形成本發明之抗體或結合構件的胺基酸序列之核酸。

典型地，編碼形成本發明之抗體或結合構件的胺基酸序列之核酸可以分離形式或純化形式提供，或以實質上不含可與其天然締合（除一或多個調節序列外）之物質的形式提供。表現本發明之抗體或結合構件的核酸可完全或部分合成且可包括（但不限於）DNA、cDNA 及 RNA。

編碼本發明之抗體或結合構件之核酸序列可由熟習此項技術者使用熟習此項技術者熟知之技術，諸如以下中所述之技術輕易製備：Sambrook 等人,「Molecular Cloning」, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 1-3 卷, 2001 (ISBN-0879695773), 及 Ausubel 等人,Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 第 4 版, 1999 (ISBN-0471250929)。該等技術包括(i)使用聚合酶鏈反應（PCR）以擴增核酸樣本，(ii)化學合成，或(iii)製備 cDNA 序列。編碼本發明之抗體或結合構件的 DNA 可以熟習此項技術者已知之任何適合方式產生及使用，包括取得編碼 DNA、在欲表現部分之任一側識別適合之限制酶識別位點，及自 DNA 切掉該部分。接著可使切除部分可操作地連接於適合啟動子且在適合表現系統（諸如市售表現系統）中表現。或者，可藉由使用適合 PCR 引子擴增 DNA 之相關部分。DNA 序列可藉由使用定點突變誘發來修飾。

編碼本發明之抗體或結合構件的核酸序列可以包含至少一種如上所述之核酸的質體、載體、轉錄或表現卡匣之

形式作為構築體來提供。構築體可包含在包含一或多個上述構築體之重組宿主細胞內。表現宜可藉由在適當條件下培養含有適合核酸序列之重組宿主細胞來達成。表現之後，可使用任何適合技術來分離及/或純化抗體或抗體片段，接著適當時加以使用。

熟知用於在多種不同宿主細胞中選殖及表現多肽之系統。適合宿主細胞包括細菌、哺乳動物細胞、酵母、昆蟲及桿狀病毒系統。此項技術中可用於表現異源多肽之哺乳動物細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、海拉細胞(HeLa cell)、幼倉鼠腎細胞及NSO小鼠骨髓瘤細胞。常見的較佳細菌宿主為大腸桿菌(E. coli)。在諸如大腸桿菌之原核細胞中表現抗體及抗體片段在此項技術中為公認的。熟習此項技術者亦可知在培養物中在真核細胞中表現作為生產結合構件之選擇。

熟習此項技術者熟知生產抗體之一般技術，此等方法討論於例如Kohler及Milstein (1975) Nature 256: 495-497；美國專利第4,376,110號；Harlow及Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor。製備重組抗體分子之技術描述於上述參考文獻中以及例如歐洲專利第0,368,684號中。

在本發明之某些具體實例中，採用包含編碼抗體或結合構件之重鏈可變域及/或輕鏈可變域之插入物的重組核酸。根據定義，此等核酸包含單股核酸、由該等編碼核酸及其互補核酸組成之雙股核酸，或此等互補(單股)核酸

本身。

此外，編碼抗體重鏈可變域及/或輕鏈可變域的核酸可為具有編碼天然存在之重鏈可變域及/或輕鏈可變域之可信序列的經酶合成或化學合成核酸，或其突變體。

本發明之抗體可藉由重組方式生產，不僅直接，而且以具有異源多肽之融合多肽的形式生產，該異源多肽較佳為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之 N 端具有特異性裂解位點之其他多肽。所選異源信號序列較佳為由宿主細胞識別及加工（亦即由信號肽酶裂解）之信號序列。因為原核宿主細胞不識別及加工原生抗體信號序列，所以信號序列經例如選自鹼性磷酸酶、青黴素酶（penicillinase）、lpp及熱穩定性腸毒素 II 前導序列之群的原核信號序列取代。

術語「分離」當關於本發明之抗體或源於此之結合構件，或編碼其之多肽使用時，係指以下狀態：該等抗體、結合構件或核酸（聚核苷酸）以分離形式及/或純化形式提供，亦即其已自其天然環境分離或純化，且以實質上純形式或同源形式提供，或在核酸情況下，不含或實質上不含除編碼具有所需功能之多肽之序列外的來源之核酸或基因。因此，此等經分離抗體、結合構件及經分離核酸將不含或實質上不含與其天然締合之物質，諸如與其一起見於其天然環境或其製備環境（例如細胞培養物）（當此製備藉由試管內或活體內實踐之重組 DNA 技術達成時）中之其他多肽或核酸。

抗體、結合構件及核酸可用稀釋劑或佐劑調配且為達

成實踐目的仍被視為以經分離形式提供。舉例而言，若用以塗佈用於免疫分析之微量滴定盤，則抗體及結合構件可與明膠或其他載劑混合，或當用於診斷或療法時將與醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑混合。抗體或結合構件可經糖基化，以天然方式或藉由異源真核細胞（例如 CHO 或 NSO 細胞）系統來達成，或其可（例如若藉由在原核細胞中表現來生產）未經糖基化。

包含本發明抗體之異源製劑亦形成本發明之部分。舉例而言，此等製劑可為抗體與全長重鏈及缺乏 C 端離胺酸之重鏈的混合物，具有各種糖基化程度及/或具有衍生胺基酸，諸如 N 端麩胺酸環化形成焦麩胺酸殘基。

定義

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有熟習本發明技術者通常所理解之含義。術語之含義及範疇應顯而易知，然而，倘若有任何模糊，則本文提供之定義勝於任何詞典定義或外來定義。

在整個說明書中，除非上下文另外需要，否則術語「包含(comprise)」或「包括(include)」或諸如「包含(comprises)」或「包含（comprising）」、「包括（includes）」或「包括（including）」之變化形式將理解為暗示包括所述整數或整數群，但不排除任何其他整數或整數群。

如本文使用，除非上下文另外清楚地有需要，否則諸如「一」及」該」之術語包括單個及多個指示物。因此，舉例而言，提及「活性劑（active agent）」或「藥理學活

性劑（pharmacologically active agent）」包括單一活性劑以及組合之兩種或兩種以上不同活性劑，而提及「載劑」包括兩種或兩種以上載劑之混合物以及單一載劑，及其類似情況。此外，除非上下文另外有需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。

術語「相應胺基酸」意謂當兩個或兩個以上胺基酸序列進行比對以允許序列之間最大序列一致性時可見於相同位置（亦即其彼此橫互）之胺基酸殘基。在相應位置之胺基酸殘基具有相同 Kabat 編號。特定言之，不同抗體之構架區胺基酸序列可進行比對或一種抗體之構架區序列之胺基酸序列可與源自特定物種之多種免疫球蛋白之位置特異性構架區胺基酸殘基池進行比較。對抗體序列進行比對及編號之方法為熟習此項技術者熟知且揭示於 Kabat 等人（Kabat, EA, Wu, T.T., Perry, H., Gottesman.K.及 Foeller,C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. NIH 公開第 91-3242 號）中，其內容以引用的方式經併入。

如本文使用，術語「互補決定區（complementarity determining region；CDR）」係指一起定義原生免疫球蛋白結合位點之天然 Fv 區之結合親和力及特異性的胺基酸序列，如以下所描繪：Kabat 等人（Kabat, E.A, Wu, T.T., Perry,H., Gottesman.K.及 Foeller,C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. NIH 公開第 91-3242 號）。如本文使用，術語「構架區（framework region；

FR）」係指插入 CDR 之間的胺基酸序列。抗體之此等部分用以以適當定向（允許 CDR 結合抗原）容納 CDR。

如本文所用，術語「恆定區（constant region；CR）」係指賦予效應功能之抗體分子之一部分。在本發明中，恆定區典型地意謂目標物種之恆定區，亦即個體物種化抗體之恆定區源自目標物種之免疫球蛋白。舉例而言，在犬類抗體中，重鏈恆定區可選自四種同型 A、B、C 或 D 中任一者。

如本文所用，術語「嵌合抗體（chimeric antibody）」係指含有源自典型地屬於不同物種之兩種不同抗體之序列的抗體。最典型地，嵌合抗體包含源自特異性結合於目標抗原決定基之供體物種的可變域及源自由待要投予抗體之目標物種所獲得之抗體的恆定域。

如本文所用，術語「免疫原性（immunogenicity）」係指當投予接受者時靶向蛋白質或治療部分引起免疫反應（體液反應或細胞反應）之能力的量度。本發明係關於個體物種化抗體之免疫原性。本發明之抗體較佳不具有免疫原性，亦即當投予目標物種時不會針對其產生中和抗體。

如本文所用，術語「基本上由...組成」意謂除所述者以外，多肽可具有其他特徵或要素，限制條件為此等其他特徵或要素不會實質性影響抗體或抗體片段對所需目標具有結合特異性之能力。亦即，包含多肽之抗體或抗體片段可具有不會干擾抗體或抗體片段結合於所需目標之能力且不會拮抗其功能活性之其他特徵或要素。此等修飾可引入胺

基酸序列中以減少抗體免疫原性。舉例而言，基本上由指定序列組成之多肽可在序列之任一端或兩端含有一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個其他經缺失或取代之胺基酸，限制條件為此等胺基酸不會干擾、抑制、阻斷或中斷抗體或片段結合於所需目標且隔離其生物功能之作用。類似地，有助於本發明之拮抗性抗體的多肽分子可用一或多個官能基化學修飾，限制條件為此等官能基不會干擾抗體或抗體片段結合於所需目標且拮抗其功能之能力。

現將參考以下實施例來描述本發明，該等實施例為達成說明目的而提供且不意欲視為限制本發明。

實施例

實施例 1-鼠類抗體轉化為犬類、貓類、馬類及人類抗體

使用程式 ClustalW，使用 BLOSUM 成本矩陣（BLOSUM Cost Matrix）及間隙開放成本 10 及間隙延伸成本 0.1 將源自公開可用所表現 cDNA 序列資料庫及出版物之人類、貓類、犬類及馬類來源之免疫球蛋白 γ（IgG）可變域重鏈（VH）及輕鏈（VL）蛋白序列根據物種以組進行比對。使低同源性之不良品質序列自比對中缺失以避免構架區中之偽造間隙（spurious gap）。根據 Kabat 命名法識別構架及 CDR 區，且識別在各 Kabat 構架區位置之胺基酸殘基且根據輕鏈及重鏈來列表（表 1-8）。儘管輕鏈表係自 κ 輕鏈集合構築，但類似表可自適用於根據本專利中所述之方法將 λ 輕鏈自一種物種轉化為另一物種之 λ 輕鏈構築。

在輕鏈構架位置 Q6、C23、W35、P44、Y83、C85 及

G98及重鏈構架位置G8、C22、W36、R38、D86、Y90、C92且G106之四種物種IgG序列之間的序列保守表明彙集胺基酸資料組存在最少的因起始資料組中之簡單核苷酸序列差錯而產生之污染。存在於表1-8中各構架區之殘基池之組成係藉由各物種之可用資料確定。源自任何所分析物種之免疫球蛋白的其他胺基酸序列之確定可進一步多樣化在表中任何位置之所選組成。此對貓類來源可變輕鏈來說尤其正確，因為在文獻中目前僅可得單個實施例，且對此發明者已藉由貓類脾組織mRNA IgG輕鏈序列之簡並寡核苷酸引子聚合酶鏈反應擴增來產生新組，如表1-8中所示。然而，如下文將證明，目前表可與本文所揭示之方法一起使用以生產適用於投予許多不同物種之抗體。

根據本發明之方法使用表1至表8中提供之資訊以比較存在於供體免疫球蛋白之輕鏈及/或重鏈之構架區之各位置的胺基酸殘基與源自目標物種之免疫球蛋白池之中存在之殘基。若存在於供體構架區之特定位置的胺基酸殘基不為源自目標物種之免疫球蛋白池中該位置存在之胺基酸，則該殘基經如與該位置有關之池中存在的胺基酸取代。當確定哪個胺基酸應置換供體序列中之經取代殘基時，較佳以來自該池之最接近同源殘基之殘基取代供體殘基。亦即，該取代較佳為保守取代。若無可用同源殘基，則較佳可選擇目標物種之共同池胺基酸（亦即最常見於該位置之胺基酸）用於取代。

在確定經取代胺基酸是否可經保守胺基酸置換時，典

型地可對諸如（但不限於）以下之因素進行評估：(a)取代區域內多肽骨架之結構，例如薄片構形或螺旋構形；(b)目標位點之分子的電荷或疏水性及/或(c)側鏈體積。

當考慮目標池中不存在之供體胺基酸是否可經保守取代時，較佳可基於根據側鏈性質相似性集中在一起之胺基酸來評估同源胺基酸是否存在（A. L. Lehninger, Biochemistry, 第2版, 73-75, Worth Publishers, New York (1975))。舉例而言，可確定以下組：(1)非極性的：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)；(2)不帶電的極性的：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)；(3)酸性的：Asp(D)、Glu(E)；及(4)鹼性的：Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

或者，胺基酸殘基可基於常見側鏈性質來分組：(1)疏水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2)中性親水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；(3)酸性的：Asp、Glu；(4)鹼性的：His、Lys、Arg；(5)影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；及(6)芳族的：Trp、Tyr、Phe。

保守取代將需要將此等種類之一的成員交換（取代）為該同一種類之另一成員。

舉例而言，將自大鼠抗小鼠 NGF 單株抗體（αD11）確定之供體免疫球蛋白輕鏈及重鏈可變域序列與此等表進行比對，且 PET 化犬類、馬類及貓類變異體係針對表現來設計及構築。圖 1 中展示針對各物種所選之構架區殘基且

圖 2 中展示與供體大鼠序列之差異。如自圖 1 及圖 2 可見，對犬類、貓類或馬類形式 α D11 必需進行之變化在數目及各物種類型方面不同。

犬類、貓類及馬類形式 α D11 之可變域如下以完整抗體形式表現：與如圖 3、圖 4 及圖 5 所示之各物種之恆定域（可變域 SEQ ID NO 1-6、完整抗體 SEQ ID NO 7-12）C 端融合，及在轉染至 CHO 細胞中之表現載體中共表現適當重鏈及輕鏈對。藉由 SDS-PAGE 分析含有作為完整 IgG 之經表現重鏈及輕鏈對之上清液，且測試其在培養物中之神經生長因子抑制 TF-1 細胞增殖之能力。在庫馬斯藍（Coomassie Blue）染色 SDS-PAGE 凝膠中觀察重鏈及輕鏈（圖 6），且上清液能夠抑制 NGF 誘導之 TF-1 細胞增殖（圖 7）。藉助於比較，α D11 之犬類化變異體之純化樣本在抑制 NGF 活性方面與人類化形式 α D11 一樣有效（Pavone 等人，WO 2006/131951）（圖 5a），說明與 Pavone 等人用以使抗體人類化之 CDR 移植之標準方法進行比較，本文所述之 PET 化技術不會引起抗體結構本身功效減小。圖 7D 進一步說明犬類、貓類及馬類形式 α D11 之類似生物活性。

表 1-輕鏈可變域 FR1 殘基

輕鏈 FR1 位置	Kabat 輕鏈編號位置	犬類 VK	貓類 VK	馬類 VK	人類 VK
1	1	DEA	DEN	DEGKV	DEAKY
2	2	ILV	VIPT	VIFNST	IVK
3	3	V	VEM	VMAGI	VQREAL
4	4	ML	MLI	MLVQ	MLC
5	5	MTI	T	TAI	TI
6	6	QE	Q	Q	Q
7	7	TSA	TS	STF	ST
8	8	P	P	P	PA
9	9	LAPRS	L	EDAPS	SGLADFPT
10	10	SP	SF	STFL	STFAL
11	11	L	L	LSV	LVSP
12	12	SA	SPA	ATESV	SAPH
13	13	VLA	V	VALQT	AVLR
14	14	STR	TIA	SAPT	ST
15	15	PQR	P	LPIR	VPLQR
16	16	EDGR	G	GR	GL
17	17	E	ED	QE	DEQGN
18	18	PTLKEAS	PSA	RSGKT	RPGTAS
19	19	AV	AV	VA	VASI
20	20	STF	S	ETDV	T
21	21	I	IF	MIVLT	IL
22	22	STY	SF	KSRETNQL	TSN
23	23	CY	C	C	C

表 2-輕鏈可變域 FR2 殘基

輕鏈 FR2 位置	Kabat 輕鏈編號系統	犬類 VK	貓類 VK	馬類 VK	人類 VK
1	35	W	W	W	W
2	36	FYILS	YF	YFH	YFL
3	37	RQLIM	LFR	QRS	QHLR
4	38	QH	Q	QHKVCRSY	QHEVGR
5	39	KR	K	KRV	KRISQT
6	40	PSA	P	PSAIL	PALSQ
7	41	GD	G	G	GE
8	42	QH	QR	QE	KQNRHT
9	43	SATP	S	ARSTVP	APSTGV
10	44	P	P	PL	P
11	45	QKER	R	KERIL	KRNQES
12	46	RLPGASDTI	RL	RQLAHGWEK	LFRSVM
13	47	LR	L	LVIFM	LV
14	48	ILT	IM	IFMVT	ILVMF
15	49	YFNSEVH	YHA	YSVFDEQRTWACGHL	YFSH

表 3-輕鏈可變域 FR3 殘基

輕鏈 FR3 位置	Kabat 輕鏈編號位置	犬類 VK	貓類 VK	馬類 VK	人類 VK
1	**57**	GA	GR	GDF	G
2	**58**	VA	V	VFA	VI
3	**59**	PS	P	PLS	PST
4	**60**	DSE	D	DAESGL	SDALEPW
5	**61**	RG	R	R	RM
6	**62**	FLVI	FI	FLY	FI
7	**63**	SIA	ST	SCFGNRT	SGTV
8	**64**	GA	G	GA	GAP
9	**65**	SR	S	SGRDEKTW	SGI
10	**66**	G	G	GRAV	GERV
11	**67**	S	S	SFYTA	SAP
12	**68**	GV	G	GET	GAS
13	**69**	TA	TAS	TASW	TAP
14	**70**	DE	D	DE	DEVS
15	**71**	FC	F	FY	FYH
16	**72**	TSR	TIA	TSAVY	TSIAN
17	**73**	LF	L	LFIP	LFHS
18	**74**	RTKE	RTK	TISAV	TKIAE
19	**75**	I	I	IV	IMSV
20	**76**	STG	SAGT	SNDTG	SNTAD
21	**77**	RGST	RG	SPTEDNR	SRGDNIPT
22	**78**	VLA	VM	LVFP	LVM
23	**79**	EVG	EQ	QER	QEKHLR
24	**80**	APD	AVPT	AEST	PAS
25	**81**	DEGINA	DE	ETAGD	ED
26	**82**	DG	D	DN	DN
27	**82A**	AVTGS	VIHL	VAEGLS	FVSI
28	**82B**	GA	G	AG	AG
29	**82C**	VIL	V	IVTDSMNLEFGY	TVSI
30	**83**	Y	Y	YC	Y
31	**84**	YHFC	YF	YFHSTVW	YF
32	**85**	C	C	C	C

表 4-輕鏈可變域 FR4 殘基

輕鏈 FR4 位置	Kabat 輕鏈 FR4 位置	犬類 VK	貓類 VK	馬類 VK	人類 VK
1	95	FLS	FS	FIL	FL
2	96	GS	G	G	GA
3	97	AQPTK	QP	QAL	QGP
4	98	GE	G	G	G
5	99	TPA	T	TS	TA
6	100	KQSNH	KHQEST	KNRM	KRT
7	101	VLW	L	LVM	VLI
8	102	DERVG	ED	EADK	EDP
9	103	LIM	IVML	ILVFM	ITVFM
10	104	KR	KRDT	KERTAGIQV	KRTEN

表 5-重鏈可變域 FR1 殘基

重鏈 FR1 位置	Kabat 重鏈編號位置	犬類 VH	貓類 VH	馬類 VH	人類 VH
1	1	EDG	QDEH	Q	QEHL
2	2	VGLEIM	VE	V	VLGIM
3	3	QHRAVEKLPS	LQR	Q	QRHIKY
4	4	LVP	LV	L	LV
5	5	VALEM	VM	KQ	VQLEK
6	6	EQA	QED	E	EQDV
7	7	SFLT	S	S	SWP
8	8	GA	G	G	GAE
9	9	GEA	GAR	P	GAPT
10	10	DAGNETW	EDN	GD	GEDARV
11	11	LQRVW	LVR	LQ	LVFPSW
12	12	VAIMK	VRSK	VM	VKLIMRAGT
13	13	KRNQ	KTQENR	KMNR	KQERNT
14	14	PFT	PT	PIS	PALR
15	15	GAETS	GE	SAG	GSER
16	16	GEA	GATE	QE	GESRAQTVD
17	17	STP	SA	TA	STA
18	18	LRV	LV	L	LVRE
19	19	RKTGV	RKES	ST	RKSTHI
20	20	LIV	ILP	L	LVIR
21	21	SY	FTS	TVIS	STFN
22	22	C	C	C	C
23	23	VLAIEK	VKAMQ	TASF	AKTEVSIRQDG
24	24	ATVGIS	ATDV	VI	AVGITS
25	25	SPGT	S	ST	SYCF
26	26	GDRT	GA	GA	GVAR
27	27	FLIDSTV	FYL	LFAGIMNQS	GDAVY

表 6-重鏈可變域 FR2 殘基

重鏈 FR2 位置	Kabat 重鏈編號系統	犬類 VH	貓類 VH	馬類 VH	人類 VH
1	**36**	WC	W	W	W
2	**37**	VIAFL	VLWFIA	VL	VILFA
3	**38**	RQ	RCH	R	RFP
4	**39**	QLHRE	Q	Q	QHRL
5	**40**	ASTGPVDC	APVTS	APSV	APSVMLHDGT
6	**41**	PL	P	P	PSAR
7	**42**	GERL	GAES	G	GSEQRW
8	**43**	KREGAMQ	KQTE	KRW	KQRNT
9	**44**	GERDTV	G	GR	GRK
10	**45**	LTPFM	LFP	LPW	LHIP
11	**46**	QEHDLPRK	QE	E	EQVADK
12	**47**	WLCSYFM	WCL	FYWEHRSV	W
13	**48**	VLIFM	VMI	VI	VMIL
14	**49**	ATSGLV	AGTS	GASD	GSA

表 7-重鏈可變域 FR3 殘基

重鏈 FR3 位置	Kabat 重鏈編號位置	犬類 VH	貓類 VH	馬類 VH	人類 VH
1	66	RQ	RQK	R	RQHG
2	67	FVL	FL	AVGCIT	FVILMAT
3	68	TAIS	TIA	SRIDMNT	TISAVH
4	69	IVLMT	ILVM	IV	IMVFALT
5	70	SAFT	ST	TSIL	STLNV
6	71	RKA	RAITKGV	KRES	RAVLTISPEKW
7	72	DEN	D	DEN	DN
8	73	NDTSIGL	TNDAS	TSAEIPY	NTDEKAMIS
9	74	AGVSDPT	ASDTG	SEGKT	SAVYGT
10	75	KRENQGMT	KTRGQE	KELNQR	KTRIEQANS
11	76	NDSKHR	NDK	SNGKR	NSKTDAG
12	77	TMIAS	TIA	QERH	TQSIHEFR
13	78	LVMAIQF	LAVG	VILSAF	LAFVMSIT
14	79	YFSHT	YFASVWD	YLSTVFR	YSFHDTVW
15	80	LIM	LM	LV	LM
16	81	QHEDRA	QELRDHV	TIQA	QEKNRHDST
17	82	ML	MLT	LMV	MLWIV
18	82A	NDSTHKPRE	NSDTGRH	NTDKRS	NSTRHD
19	82B	SGDRNT	SNIRT	STADEGKM	SRNDGTAIL
20	82C	LV	L	LVM	LV
21	83	RTGKSI	KRTGQ	TS	RTKQ
22	84	AVDTSGP	STPAIV	SGDER	ASITPVGDLN
23	85	EDAV	EATDGS	EDG	EADSGK
24	86	D	D	D	DN
25	87	TASM	T	TA	TSA
26	88	AGV	AGS	AS	AGS
27	89	VMILFTKQY	TVMIA	VD	VIMLT
28	90	YH	YH	Y	Y
29	91	YFHAGT	YHFC	YFWAI	YFH
30	92	C	CR	C	C
31	93	AVTGMRSCLPK	AITSVGM	ATVGEIS	AVTGSLM
32	94	KRSNGATPDQVEIM	RKSTIVPNG	GRAEHIKS	RKGTSNVAHIY

表 8-重鏈可變域 FR4 殘基

重鏈 FR4 位置	Kabat 重鏈編號位置	犬類 VH	貓類 VH	馬類 VH	人類 VH
1	103	WL	WRCL	W	WCISY
2	104	GAS	GRA	G	GLS
3	105	QPHRD	QPHVR	QP	QKRHLAEP
4	106	G	GD	G	GPR
5	107	TASIN	ATVIS	I	TISAEP
6	108	LSQPR	LIQMST	L	LTMVPQACN
7	109	VLIP	VI	V	VICFGLW
8	110	TFIASLPY	TAIR	T	TISADLV
9	111	VA	VIG	V	VGILP
10	112	SACPT	STP	S	SFTW
11	113	SLAP	SQPA	-	SPFGT

實施例 2-生產抗人類 NGF 去除免疫化抗體

使用上述方法及表 1-8 中所示之人類來源構架區位置特異性胺基酸殘基池，PET 化技術亦可用以將具有替代性人類胺基酸重鏈及輕鏈序列之抗體轉化為 Pavone 等人之序列以便人類使用（上文稱為「再人類化」）。

除所得 VH 及 VL 序列（圖 9A）外，亦展示輕鏈（圖 8A）與重鏈（圖 8B）之再人類化構架序列的比較。顯而易知的是，使用本文揭示之方法需要對人類化 α D11 MAb 產生之變化（構架區改變 3 個胺基酸）比 Pavone 及同事之標準 CDR 移植方法需要對人類化 α D11 MAb 產生之變化（43 個胺基酸變化）少得多。

再人類化 α D11 抗體（新-Hu α D11，圖 9A）之可變重鏈（VH）及輕鏈（VL）變異體之蛋白質序列係設計有來自大鼠 α D11 之 N 端信號序列及分別來自 IgG4 重鏈及人類

κ輕鏈之C端人類IgG恆定域（圖9B）。編碼其之合成基因係藉由基於寡核苷酸之基因合成來製備且各自次選殖至哺乳動物表現載體pcDNA3.1+中。共轉染至CHO細胞中且使用蛋白質A層析自細胞上清液純化得到純化之抗體。藉由ELISA測試抗體對NGF之結合且與Pavone等人所述之αD11之人類化變異體之結合（WO 06/131951，藉由CDR移植設計）進行比較。如自圖9C中所示之ELISA結果可見，本專利之新Hu αD11變異體對NGF所具有之結合不能區別於Pavone等人所述者。藉由圖7C中所述之方法測試圖9C中所述之抗體對NGF之抑制。兩種人類化抗體展示等效生物活性。

實施例3-生產對犬類TNF具有結合特異性之犬類抗體

再舉例而言，將本專利之PET化方法用於結合腫瘤壞死因子之人類抗體D2E7作為起點以製造其犬類變異體。

下文所示之表9-16說明人類單株抗體D2E7之輕鏈及重鏈可變域之構架區與對於犬類免疫球蛋白構架序列之各位置定義之胺基酸殘基池（如表1-8中所示）的比對。在Kabat序列位置先前被認為外來物之某些殘基（表9中標記*）現被視為對犬類為天然的，因此標記*之位置所示的變化現將不再產生，或可選擇替代性更保守之殘基（在表10中標記**）。根據此其他資訊，三個輕鏈位置將不變，該等位置包括Scr9、Ala13及Gly16（圖9中標記*）。輕鏈His42將為在該位置之殘基的替代性選擇（圖10中標記**）。犬類化D2E7構架殘基在此等位置之修飾，及包含此

等修飾之抗體意欲屬於本發明之範疇。除了在位置 9 提供絲胺酸殘基，在位置 13 提供丙胺酸殘基且在位置 16 提供甘胺酸殘基以代替 SEQ ID NO: 15 中此等位置所示之殘基之外，此等抗體將包含具有 SEQ ID NO: 15 中所示之序列的輕鏈可變域。視情況，可在 SEQ ID NO: 15 之位置 42 提供組胺酸殘基以代替麩醯胺酸。展示此等變化之經修飾序列係以 SEQ ID NO: 71 提供。本發明擴展為包含含有 SEQ ID NO: 71 之輕鏈可變域的抗體，及源於其之抗原結合片段。

表 9-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化輕鏈 FR1 序列

輕鏈 FR1 位置	Kabat 輕鏈編號位置	人類 Mab D2E7 VL	犬類 VK 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VL
1	1	D	DEA	D
2	2	I	ILV	I
3	3	Q	V	V
4	4	M	ML	M
5	5	T	MTI	T
6	6	Q	QE	Q
7	7	S	TSA	S
8	8	P	P	P
9	9	S	LAPRS	A*
10	10	S	SP	S
11	11	L	L	L
12	12	S	SA	S
13	13	A	VLA	L*
14	14	S	STR	S
15	15	V	PQR	Q
16	16	G	EDGR	E*
17	17	D	E	E
18	18	R	PTLKEAS	K
19	19	V	AV	V
20	20	T	STF	T
21	21	I	I	I
22	22	T	STY	T
23	23	C	CY	C

表 10-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化輕鏈 FR2 序列

輕鏈 FR2 位置	Kabat 輕鏈編號系統	人類 MAb D2E7 VL	犬類 VK 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VL
1	35	W	W	W
2	36	Y	FYILS	Y
3	37	Q	RQLIM	Q
4	38	Q	QH	Q
5	39	K	KR	K
6	40	P	PSA	P
7	41	G	GD	G
8	42	K	QH**	Q
9	43	A	SATP	A
10	44	P	P	P
11	45	K	QKER	K
12	46	L	RLPGASDTI	L
13	47	L	LR	L
14	48	I	ILT	I
15	49	Y	YFNSEVHW	Y

表 11-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化輕鏈 FR3 序列

輕鏈 FR3 位置	Kabat 輕鏈編號位置	人類 MAb D2E7 VL	犬類 VK 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VL
1	57	G	GA	G
2	58	V	VA	V
3	59	P	PS	P
4	60	S	DSE	S
5	61	R	RG	R
6	62	F	FLVI	F
7	63	S	SIA	S
8	64	G	GA	G
9	65	S	SR	S
10	66	G	G	G
11	67	S	S	S
12	68	G	GV	G
13	69	T	TA	T
14	70	D	DE	D
15	71	F	FC	F
16	72	T	TSR	T
17	73	L	LF	L
18	74	T	RTKE	T
19	75	I	I	I
20	76	S	STG	S
21	77	S	RGST	S
22	78	L	VLA	L
23	79	Q	EVG	E
24	80	P	APD	P
25	81	E	DEGINA	E
26	82	D	DG	D
27	82A	V	AVTGS	V
28	82B	A	GA	A
29	82C	T	VIL	V
30	83	Y	Y	Y
31	84	Y	YHFC	Y
32	85	C	C	C

表 12-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化輕鏈 FR4 序列

輕鏈 FR4 位置	Kabat 輕鏈 FR4 位置	人類 MAb D2E7 VL	犬類 VK 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VL
1	95	F	FLS	F
2	96	G	GS	G
3	97	Q	AQPTK	Q
4	98	G	GE	G
5	99	T	TPA	T
6	100	K	KQSNH	K
7	101	V	VLW	V
8	102	E	DERVG	E
9	103	I	LIM	I
10	104	K	KR	K

表 13-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化重鏈 FR1 序列

重鏈 FR1 位置	Kabat 重鏈 編號位置	人類 Mab D2E7 VH	犬類 VH 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VH
1	1	E	EDG	E
2	2	V	VGLEIM	V
3	3	Q	QHRAVEKLPS	Q
4	4	L	LVP	L
5	5	V	VALEM	V
6	6	E	EQA	E
7	7	S	SFLT	S
8	8	G	GA	G
9	9	G	GEA	G
10	10	G	DAGNETW	G
11	11	L	LQRVW	L
12	12	V	VAIMK	V
13	13	Q	KRNQ	Q
14	14	P	PFT	P
15	15	G	GAETS	G
16	16	R	GEA	G
17	17	S	STP	S
18	18	L	LRV	L
19	19	R	RKTGV	R
20	20	L	LIV	L
21	21	S	SY	S
22	22	C	C	C
23	23	A	VLAIEK	A
24	24	A	ATVGIS	A
25	25	S	SPGT	S
26	26	G	GDRT	G
27	27	F	FLIDSTV	F

表 14-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化重鏈 FR2 序列

重鏈 FR2 位置	Kabat 重鏈編號系統	人類 MAb D2E7 VH	犬類 VH 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VH
1	36	W	WC	W
2	37	V	VIAFL	V
3	38	R	RQ	R
4	39	Q	QLHRE	Q
5	40	A	ASTGPVDC	A
6	41	P	PL	P
7	42	G	GERL	G
8	43	K	KREGAMQ	K
9	44	G	GERDTV	G
10	45	L	LTPFM	L
11	46	E	QEHDLPRK	E
12	47	W	WLCSYFM	W
13	48	V	VLIF M	V
14	49	S	ATSGLV	S

表 15-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化重鏈 FR3 序列

重鏈 FR3 位置	Kabat 重鏈 編號位置	人類 D2E7 Mab VH 序列	犬類 VH 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VH
1	66	R	RQ	R
2	67	F	FVL	F
3	68	T	TAIS	T
4	69	I	IVLMT	I
5	70	S	SAFT	S
6	71	R	RKA	R
7	72	D	DEN	D
8	73	N	NDTSIGL	N
9	74	A	AGVSDPT	A
10	75	K	KRENQGMT	K
11	76	N	NDSKHR	N
12	77	S	TMIAS	S
13	78	L	LVMAIQF	L
14	79	Y	YFSHT	Y
15	80	L	LIM	L
16	81	Q	QHEDRA	Q
17	82	M	ML	M
18	82A	N	NDSTHKPR E	N
19	82B	S	SGDRNT	S
20	82C	L	LV	L
21	83	R	RTGKSI	R
22	84	A	AVDTSGP	A
23	85	E	EDAV	E
24	86	D	D	D
25	87	T	TASM	T
26	88	A	AGV	A
27	89	V	VMILFTKQY	V
28	90	Y	YH	Y
29	91	Y	YFHAGT	Y
30	92	C	C	C
31	93	A	AVTGMRSC LPK	A
32	94	K	KRSNGATPDQVEIM	K

表 16-人類來源 D2E7 單株抗體之犬類化重鏈 FR4 序列

重鏈 FR4 位置	Kabat 重鏈編號位置	人類 D2E7 Mab VH 序列	犬類 VH 胺基酸池序列	犬類 PET 化 D2E7 VH
1	103	W	WL	W
2	104	G	GAS	G
3	105	Q	QPHRD	Q
4	106	G	G	G
5	107	T	TASIN	T
6	108	L	LSQPR	L
7	109	V	VLIP	V
8	110	T	TFIASLPY	T
9	111	V	VA	V
10	112	S	SACPT	S
11	113	S	SLAP	S

圖 10、11 及 12 說明編碼 SEQ ID NO: 15 至 SEQ ID NO: 21 中 D2E7 之犬類 PET 化 Mab 變異體的可變域（圖 10）及完全抗體（圖 11（輕鏈）及圖 12（重鏈））序列。使用寡核苷酸合成將序列構造為 DNA 且次選殖至表現載體且轉染至如上 CHO 細胞。特定言之，使用寡核苷酸合成將 SEQ ID NO: 17（輕鏈）及 SEQ ID NO: 18-21（重鏈同型 A、B、C 及 D）之序列設計及構造為 DNA，且次選殖至 pcDNA3.1+ 表現載體且以不同組合轉染至 CHO 細胞中。

將編碼具有 SEQ ID NO: 17（輕鏈）及 SEQ ID NO: 19（重鏈，同型 B）之胺基酸序列之犬類化抗 TNF 單株抗體，及具有 SEQ ID NO: 22 胺基酸之輕鏈及 SEQ ID NO: 23 之重鏈（圖 13）的嵌合抗 TNF 單株抗體的 cDNA 與胺基末端分泌性信號序列（圖中未示）一起次選殖至 pcDNA3.1+（Invitrogen/Life technologies）中。以犬類化重鏈及輕鏈序

列（ca-HCB + ca-kLC）或嵌合重鏈及輕鏈（ch-HCB + ch-kLC）之組合共轉染 CHO 細胞。以蛋白質 A 純化所得上清液，藉由 SDS-PAGE 分析（圖 14A），且藉由 ELISA 在指定抗體濃度（μg/ml）下測試對犬類 TNFα（以 5 μg/ml 塗佈；R&D systems）之結合，且使用抗犬類多株抗體-辣根過氧化酶結合物（Sigma A9042）來偵測（圖 14B）。陰性對照組為僅於塗佈抗原上之偵測多株抗體。

使用以 pTRH1 轉染之 293-HEK 細胞以生產藉由螢光對人類 TNF 起反應之 TNF 敏感性 NF-kB-EGFP 報導細胞系來測試純化之抗體抑制犬類 TNF 活性之能力（Vince 等人，Cell 131, 682, 2007）。首先證明犬類 TNF 活化此等細胞中之 GFP 表現（在約 1 ng/mL 下 50%最大刺激），接著測試圖 14 中所示之犬類抗體抑制 1 ng/mL 犬類 TNF 之能力。

如圖 15（A-C）中所示，犬類化抗體與嵌合抗體在此分析中均為犬類 TNF 之有效抑制劑。

此等結果一起顯示，本發明之犬類化抗體及人類-犬類嵌合抗體結合犬類 TNF 且依據 ELISA 與抑制分析為等效的，證明犬類化過程已生產出原始 D2E7 抗體之完全活性犬類形式。

圖 16 說明犬類化及嵌合 D2E7 單株抗體（MAb）與基於抗人類 TNF MAb 純系 148 之另一犬類化抗體的比較。在 CHO 細胞中表現犬類化抗 huTNF MAb 148（SEQ ID NO: 26 及 SEQ ID NO: 27，圖 17），且使用蛋白質 A 層析純化（圖 A，左側色帶）。測試犬類化 148 MAb 對人類 TNF（B 圖）

及犬類 TNF（C 圖）之結合，與圖 14 及圖 15 中基於犬類化（Ca）及嵌合（Ch）D2E7 之 MAb 進行比較（背景陰性對照組結合由箭頭展示）。自圖 B 及圖 C 可見，犬類化 MAb 148 結合於人類 TNF，但不結合於犬類 TNF。因此，基於 D2E7 之犬類化 MAb 及嵌合 MAb 及本發明之標的出乎意料地顯示強結合於犬類 TNF，等效於對人類 TNF 之結合，而犬類化 MAb 148 顯示僅結合於人類 TNF。因此，基於犬類化 D2E7 之 MAb 令人驚訝地適用於治療由犬類 TNF 介導之犬類疾病。

總而言之，PET 化大鼠抗 NGF MAb αD11 之犬類、馬類、貓類及新人類形式及人類抗 TNF MAb 之犬類 PET 化形式證明藉由本專利中所述之方法進行可變域構架之 PET 化轉化為穩固、可重現的且適用於多種 MAb 之多物種轉化。

實施例 4-抗犬類 NGF 單株抗體活體內減少發炎性疼痛之作用

抗體療法

使源自表現 SEQ ID NO: 7 及 SEQ ID NO: 70(犬類 HCA 型重鏈)之表現載體的抗犬類 NGF 單株抗體表現於 CHO 細胞中且藉由離子交換層析法、疏水相互作用層析法及尺寸排阻層析法之組合來純化，且緩衝交換至磷酸鹽緩衝鹽水中。

炎症之犬類模型

所有實驗均預先在機構倫理委員會（Institutional Ethics Committee/CRL, Ireland）批准下進行。將高嶺土注

射（＝第-1日）至米格魯犬（Beagle dog）一條後腿之足墊中以產生自消解炎症，該炎症在約24小時後開始且導致狗暫時變跛。在此模型中，一旦對高嶺土之初始發炎反應減弱，狗即穩定變得不太跛，歷經約1-2週之時間，接著完全恢復。

向3只狗之組靜脈內注射200微克/公斤體重之抗犬類NGF單株抗體或作為媒劑對照組之磷酸鹽緩衝鹽水（＝第0日）。經7日藉由視覺評分法（0分，不跛（全負重）；1分，微跛（未全負重，但走路良好）；2分，中度跛（稍微負重且走路不好）；3分，嚴重跛（不負重））評估狗之跛度。觀察者不知哪些狗接受哪種注射。

結果展示於圖18中。與媒劑對照組進行比較，接受抗NGF單株抗體之狗在注射後第3日跛度分數減小，表明較之僅用媒劑所見，抗NGF單株抗體具有減少狗之疼痛的作用。延遲活性與抗犬類NGF單株抗體之血漿藥物動力學一致，證明約30小時之緩慢組織分佈（α）期及足墊區域之相對不良血管形成。圖18中所示之結果顯示藉由本發明之方法生產的抗犬類NGF抗體減少狗之發炎性疼痛，隨後使跛度減小。

所有在本說明書中提及之文件均以引用的方式併入本文中。對本發明之所述具體實例的各種修改及變化在不偏離本發明之範疇的情況下將對熟習此項技術者顯而易知。儘管已與特定較佳具體實例相關描述了本發明，但應瞭解，如主張之本發明不應過度限於此等特定具體實例。實

際上，本發明意欲覆蓋對熟習此項技術者顯而易知的實施方式的各種修改。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示大鼠 α D11 抗體輕鏈之構架區序列 FR1 至 FR4 與犬類、貓類及馬類物種特異性形式（SEQ ID NO: 28 至 43）的比對。

圖 2 展示大鼠 α D11 抗體重鏈之構架區序列 FR1 至 FR4 與犬類、貓類及馬類物種特異性形式（SEQ ID NO: 44 至 59）的比對。

圖 3 展示 α D11 抗 NGF MAb 及完全輕鏈（SEQ ID NO: 7）及重鏈（SEQ ID NO: 8）之犬類形式的重鏈（SEQ ID NO: 2）及輕鏈（SEQ ID NO: 1）可變域之胺基酸序列。

圖 4 展示 α D11 抗 NGF MAb 及完全輕鏈（SEQ ID NO: 9）及重鏈（SEQ ID NO: 10）之貓類形式的重鏈（SEQ ID NO: 4）及輕鏈（SEQ ID NO: 3）可變域之胺基酸序列。

圖 5 展示 α D11 抗 NGF MAb 及完全輕鏈（SEQ ID NO: 11）及重鏈（SEQ ID NO: 12）之馬類形式的重鏈（SEQ ID NO: 6）及輕鏈（SEQ ID NO: 5）可變域之胺基酸序列。

圖 6 展示具有 α D11 MAb 之犬類、貓類及馬類物種化形式之表現的凝膠。

圖 7A 為展示經表現及純化之犬類 MAb 至犬類 NGF 為生物學活性之圖。圖 7B 為展示經表現及純化之貓類 MAb 至貓類 NGF 為生物學活性之圖，而圖 7C 為展示經表現及純化之馬類 MAb 至馬類 NGF 為生物學活性之圖。圖 7D 為

比較犬類、貓類及馬類MAb中和NGF生物活性之能力的圖。

圖 8A 為展示大鼠αD11 抗體之已知人類化形式（Pavone 等人，WO 06/131951）與αD11之新穎人類化變異體（新 Hu - SEQ ID NO: 60-63）之間的輕鏈構架區修飾比較之胺基酸比對。圖 8B 為展示大鼠αD11 抗體之已知人類化形式（Pavone 等人, WO 06/131951）與αD11之新穎人類化變異體（新 Hu - SEQ ID NO: 64-67）之間的重鏈構架區修飾的比較。

圖 9A 展示圖 8（CDR 加下劃線）之新穎人類化αD11 抗體之輕鏈（SEQ ID NO: 13）及重鏈（SEQ ID NO: 14）可變域胺基酸序列。圖 9B 展示使用圖 9A 中所示之輕鏈及重鏈可變域設計之完全重鏈及輕鏈（SEQ ID NO: 24 及 25）。圖 9C 展示比較由圖 9B 中之序列製得之抗體與藉由 CDR 移植設計出之抗體（如 Pavone 及同事先前所述）的 ELISA 分析。圖 9D 展示圖 9C 中所用之αD11 單株抗體之兩種人類化變異體對 TF-1 細胞之 NGF 增殖的抑制。

圖 10 展示基於人類 MAb D2E7 之犬類化抗 TNF 抗體之輕鏈（SEQ ID NO: 15）及重鏈（SEQ ID NO: 16）可變域胺基酸序列（Salfield 等人，美國專利第 6,090,382 號）。

圖 11 展示犬類化抗 TNF 抗體之κ輕鏈胺基酸序列（SEQ ID NO: 17）。

圖 12 展示犬類化抗 TNF 抗體之 4 種亞型（A、B、C 及 D 型重鏈）之重鏈胺基酸序列。

圖 13 展示嵌合人類-犬類抗 TNF 抗體之完整輕鏈(SEQ

ID NO: 22）及重鏈（SEQ ID NO: 23）胺基酸序列。

圖 14A 展示使用蛋白質 A 純化且藉由 SDS-PAGE 分析之共表現犬類化（Ca）及嵌合（Ch）抗 TNF 抗體之結果，而圖 14B 展示顯示所表現重組蛋白結合於犬類 TNF-α之 ELISA 的結果。展示抗體自 5 μg/ml 至 0.05 μg/ml 之各種稀釋液的結果。

圖 15 展示使用以 NF-kB-EGFP 報導子構築體 pTRH1 轉染之 293-HEK 細胞的犬類 TNF 生物活性之抑制。此等細胞藉由螢光對犬類 TNF 起反應。犬類化（圖 15A）與嵌合（圖 15B）MAb 同樣好地抑制 TNF 誘導之螢光，如圖 15C 中所定量。

圖 16 展示與在 CHO 細胞中表現且使用蛋白質 A 層析純化（A 圖，左側色帶）之基於抗 TNF MAb 純系 148 之另一犬類化 MAb 的比較。測試 MAb 對人類 TNF（B 圖）及犬類 TNF（C 圖）之結合，與圖 14 中基於犬類化（Ca）及嵌合（Ch）D2E7 之 MAb 進行比較（背景陰性對照組結合由箭頭展示）。

圖 17 展示犬類化 MAb 148 之重鏈（SEQ ID NO: 26 - ca148-HCB）及輕鏈（SEQ ID NO: 27 - ca148-kLC）。

圖 18 展示藉由本發明之方法製備之抗犬類 NGF 單株抗體減少狗的發炎性疼痛。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> NVIP有限公司（NVIP Pty Ltd）
吉倫 大衛（Gearing, David）

<120> 經修飾抗體及生產其之方法

<130> P120110.WO.01

<150> US 61/531439
<151> 2011-09-06

<160> 71

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之犬類形式的輕鏈可變域-犬類VK

<400> 1

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之犬類形式的重鏈可變域-犬類VH

<400> 2

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

```
Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65                  70                  75                  80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之貓類形式的輕鏈可變域-貓類VK

<400> 3

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之貓類形式的重鏈可變域-貓類VH

<400> 4

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

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

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

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之馬類形式的輕鏈可變域-馬類VK

<400> 5

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之馬類形式的重鏈可變域-馬類VH

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之犬類化形式之完整輕鏈-犬類VK及犬類κ輕鏈恆定域

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

```
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
                85                  90                  95

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

Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
        115                 120                 125

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
    130                 135                 140

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
        195                 200                 205

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
    210                 215
```

<210> 8
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之犬類形式之完整重鏈-犬類VH及犬類重鏈B恆定域

<400> 8

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
            20                  25                  30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65                  70                  75                  80

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

```
Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
        115                 120                 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
    130                 135                 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
        195                 200                 205

His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu
    210                 215                 220

Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp
        275                 280                 285

Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
    290                 295                 300

Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
            340                 345                 350

Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
        355                 360                 365

Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
    370                 375                 380
```

```
Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
385                 390                 395                 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
            420                 425                 430

Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        435                 440                 445

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 9
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之貓類形式之完整輕鏈-貓類VK及貓類κ輕鏈恆定域

<400> 9

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Asp Ala Gln
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu Leu His Thr Gly
        115                 120                 125

Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr Pro Lys Glu Val
    130                 135                 140

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr Lys Ala Ser Lys
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser His Glu Lys Phe
            180                 185                 190

Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser Thr Leu Val Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu
    210                 215
```

<210> 10
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之貓類形式的完整重鏈-貓類VH及貓類重鏈恆定域

<400> 10

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

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

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

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
        115                 120                 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
    130                 135                 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly 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 Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
        195                 200                 205

His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg Lys Thr Asp
    210                 215                 220

His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
225                 230                 235                 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val
            260                 265                 270

Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp
        275                 280                 285

Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu Glu Gln Phe
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu
                325                 330                 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro His
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg
        355                 360                 365

Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro Pro Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Val
                405                 410                 415

Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr
            420                 425                 430

Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln
        435                 440                 445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之馬類形式之完整輕鏈-馬類VK及馬類κ輕鏈恆定域

<400> 11

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

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

Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Ser Ser Gly
115 120 125

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Val Tyr Gly Phe Tyr Pro Ser Gly Ala
130 135 140

Thr Ile Asn Trp Lys Val Asp Gly Leu Ala Lys Thr Ser Ser Phe His
145 150 155 160

Ser Ser Leu Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Asn Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Pro Lys Ala Asp Tyr Glu Ala His Asn Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Ser His Lys Thr Leu Ser Ser Pro Leu Val Lys Ser
195 200 205

Phe Lys Arg Gln Asp Cys
210

<210> 12
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之馬類形式之完整重鏈-馬類VH及馬類重鏈2恆定域

<400> 12

```
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
            20                  25                  30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65                  70                  75                  80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
        115                 120                 125

Lys Tyr Phe Gln Leu Thr Pro Ser Cys Gly Ile Thr Ser Asp Ala Thr
    130                 135                 140

Val Ala Leu Gly Cys Leu Val Ser Asp Tyr Tyr 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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Ser Ser Met Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ala Ser Thr Trp Thr Ser Glu Thr Tyr Ile Cys Asn Val Ala
        195                 200                 205

His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Arg Ile Pro Pro Cys Val
    210                 215                 220

Leu Ser Ala Glu Gly Val Ile Pro Ile Pro Ser Val Pro Lys Pro Gln
225                 230                 235                 240

Cys Pro Pro Tyr Thr His Ser Lys Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
                245                 250                 255

Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
```

260 265 270

Val Val Thr Cys Val Val Val Asn Leu Ser Asp Gln Tyr Pro Asp Val
275 280 285

Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Asn Thr Glu Val His Ser Ala Ile Thr
290 295 300

Lys Gln Arg Glu Ala Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
325 330 335

Ser Val Thr Asn Val Gly Val Pro Gln Pro Ile Ser Arg Ala Ile Ser
340 345 350

Arg Gly Lys Gly Pro Ser Arg Val Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
355 360 365

His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Ser Val Glu Trp Gln Ser Asn Arg
385 390 395 400

Trp Pro Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp
405 410 415

Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Leu Glu Thr Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Val Glu Ser Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Phe Thr Lys Thr Asp Ile Ser Glu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 新Hu αD11 VL

<400> 13

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

Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 新Hu αD11 VH

<400> 14

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之輕鏈可變域-犬類VK

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之重鏈可變域-犬類VH

<400> 16

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 217

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之完整輕鏈-犬類VK及犬類κ輕鏈恆定域

<400> 17

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Ala Gln
100 105 110

Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
115 120 125

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
180 185 190

Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
195 200 205

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
210 215

<210> 18
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之完整重鏈-犬類VH及犬類重鏈A恆定域

<400> 18

```
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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val His
        195                 200                 205

Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg
    210                 215                 220

Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp
            260                 265                 270
```

```
Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His Thr
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr Val
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp
    370                 375                 380

Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val
            420                 425                 430

Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser His
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 19
<211> 456
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之完整重鏈-犬類VH及犬類重鏈B恆定域

<400> 19

```
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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
```

```
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His
        195                 200                 205

Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn
    210                 215                 220

Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270

Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly
        275                 280                 285

Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
    290                 295                 300

Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335
```

```
Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln
            340                 345                 350

Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn
        355                 360                 365

Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile
    370                 375                 380

Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr
385                 390                 395                 400

Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe
            420                 425                 430

Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu
        435                 440                 445

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 20
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之完整重鏈-犬類VH及犬類重鏈C恆定域

<400> 20

```
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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser
```

```
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His
        195                 200                 205

Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys Glu
    210                 215                 220

Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu
                245                 250                 255

Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln
        275                 280                 285

Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly Thr
    290                 295                 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Ser
305                 310                 315                 320

Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro
                325                 330                 335

Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro Asn
            340                 345                 350

Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr Val
        355                 360                 365

Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val
    370                 375                 380

Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Met
385                 390                 395                 400
```

```
Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys
            420                 425                 430

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser Leu
        435                 440                 445

Ser His Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 21
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之完整重鏈-犬類VH及犬類重鏈D恆定域

<400> 21

```
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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Val
```

```
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val His
        195                 200                 205

Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser Thr
    210                 215                 220

Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His Thr
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp
    370                 375                 380

Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr Ala
385                 390                 395                 400

Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser His
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 22
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合抗TNF MAb輕鏈-人類VK及犬類κ輕鏈

<400> 22

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Ala Gln
100 105 110

Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
115 120 125

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
180 185 190

Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
195 200 205

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
210 215

<210> 23
<211> 456
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合抗TNF MAb重鏈-人類VH及犬類重鏈B型恆定域

<400> 23

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

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

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val
    130                 135                 140

Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His
        195                 200                 205

Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn
    210                 215                 220

Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270
```

```
Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly
        275                 280                 285

Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
    290                 295                 300

Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335

Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln
            340                 345                 350

Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn
        355                 360                 365

Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile
    370                 375                 380

Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr
385                 390                 395                 400

Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe
            420                 425                 430

Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu
        435                 440                 445

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 24
<211> 468
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 新Hu αD11完整HC-IgG4

<400> 24

```
Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Thr Cys
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
        35                  40                  45
```

```
Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
                85                  90                  95

Val Phe Leu Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met
        115                 120                 125

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225                 230                 235                 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
                245                 250                 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    290                 295                 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                325                 330                 335
```

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 25
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 新Hu αD11完整κ LC

<400> 25

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
1 5 10 15

Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

```
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe
            100                 105                 110

His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 26
<211> 480
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ca148-HCB重鏈

<400> 26

```
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1               5                   10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
        35                  40                  45

Ser Ser Tyr Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
                85                  90                  95
```

```
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr
        115                 120                 125

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
    130                 135                 140

Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys
145                 150                 155                 160

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly
                165                 170                 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr
            180                 185                 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
        195                 200                 205

Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu
    210                 215                 220

Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp
225                 230                 235                 240

Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp
                245                 250                 255

Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
            260                 265                 270

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val
    290                 295                 300

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr
305                 310                 315                 320

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
                325                 330                 335

Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys
            340                 345                 350

Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
        355                 360                 365

Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro
    370                 375                 380
```

```
Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile
385                 390                 395                 400

Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly
                405                 410                 415

Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp
            420                 425                 430

Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser
        435                 440                 445

Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala
    450                 455                 460

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475                 480
```

<210> 27
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ca148-kLC輕鏈

<400> 27

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                   10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Pro Gly Glu Lys Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Pro Ser
            100                 105                 110

Asn Trp Pro Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
        115                 120                 125

Arg Asn Asp Ala Gln Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp
    130                 135                 140
```

Gln Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln
165 170 175

Asp Thr Gly Ile Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser
195 200 205

His Glu Leu Tyr Ser Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr
210 215 220

Leu Ile Lys Ser Phe Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
225 230 235

<210> 28
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠VK輕鏈之αD11 FR1區

<400> 28

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys
20

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之犬類化FR1區

<400> 29

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之貓類化FR1區

<400> 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之馬類化FR1區

<400> 31

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys
20

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠VK輕鏈之αD11 FR2區

<400> 32

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之犬類化FR2區

<400> 33

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之貓類化FR2區

<400> 34

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之馬類化FR2區

<400> 35

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠VK輕鏈之αD11 FR3區

<400> 36

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之犬類化FR3區

<400> 37

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之貓類化FR3區

<400> 38

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 39
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之馬類化FR3區

<400> 39

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

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠VK輕鏈之αD11 FR4區
<400> 40

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之犬類化FR4區

<400> 41

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之貓類化FR4區

<400> 42

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體之VK輕鏈之馬類化FR4區

<400> 43

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠重鏈之αD11 FR1區

<400> 44

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
20 25

<210> 45
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之犬類化FR1區

<400> 45

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe
20 25

<210> 46
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之貓類化FR1區

<400> 46

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

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

<210> 47
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之馬類化FR1區

<400> 47

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
20 25

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠重鏈之αD11 FR2區

<400> 48

Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之犬類化FR2區

<400> 49

Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之貓類化FR2區

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之馬類化FR2區

<400> 51

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠重鏈之αD11 FR3區

<400> 52

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 53

<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之犬類化FR3區

<400> 53

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 54
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之貓類化FR3區

<400> 54

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

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之馬類化FR3區

<400> 55

Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠重鏈之αD11 FR4區

<400> 56

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之犬類化FR4區

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之貓類化FR4區

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠αD11抗體重鏈之馬類化FR4區

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 60
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之輕鏈的FR1區（新Hu）

<400> 60

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

Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys
20

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之輕鏈的FR2區（新Hu）

<400> 61

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 62

<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之輕鏈的FR3區（新Hu）

<400> 62

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之輕鏈的FR4區（新Hu）

<400> 63

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之重鏈的FR1區（新Hu）

<400> 64

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys
20

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之重鏈的FR2區（新Hu）

<400> 65

Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 66
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之重鏈的FR3區（新Hu）

<400> 66

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11之新穎人類化變異體之重鏈的FR4區（新Hu）

<400> 67

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 68
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之犬類化形式之完整重鏈-VH及HCA

<400> 68

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

```
145                 150                 155                 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
        195                 200                 205

His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
    210                 215                 220

Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
                245                 250                 255

Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
        275                 280                 285

Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
            340                 345                 350

Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
        355                 360                 365

Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
    370                 375                 380

Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415

Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
            420                 425                 430
```

Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
435 440 445

His Ser Pro Gly Lys
450

<210> 69
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之替代性犬類形式之重鏈可變域-犬類VH

<400> 69

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 Val Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> αD11抗NGF MAb之替代性犬類化形式之完整重鏈-VH及HCA

<400> 70

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 Val Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
        115                 120                 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
    130                 135                 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
        195                 200                 205

His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
    210                 215                 220

Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
                245                 250                 255

Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
        275                 280                 285

Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
                325                 330                 335
```


S

```
Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
            340                 345                 350

Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
        355                 360                 365

Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
    370                 375                 380

Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415

Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
            420                 425                 430

Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

His Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 71
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類D2E7抗TNF MAb之犬類形式之經更新輕鏈可變域-犬類VK

<400> 71

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

七、申請專利範圍：

1.一種生產用於投予目標物種之非免疫原性免疫球蛋白之方法，該方法包含以下步驟：

自除該目標物種外之物種識別供體免疫球蛋白，其中該供體免疫球蛋白對該目標物種中存在之目標抗原決定基具有結合特異性，

確定該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區的胺基酸序列，

比較該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列的各胺基酸殘基與存在於一或多種源自該目標物種之免疫球蛋白之構架區之胺基酸序列中相應位置的胺基酸殘基，以識別該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區的胺基酸序列內一或多個在該一或多種源自該目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置所不存在之胺基酸殘基，及

以存在於該一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置的胺基酸殘基取代存在於該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中但不存在於該一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置之一或多個經識別胺基酸殘基。

2.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中將該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列的各胺基酸殘基與包含存在於多種源自該目標物種之免疫球蛋白

之構架區之胺基酸序列中相應位置之胺基酸殘基的胺基酸殘基池進行比較。

3.如申請專利範圍第1或2項之方法，其中使用保守取代原理進行該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中存在之胺基酸殘基的取代。

4.如申請專利範圍第3項之方法，其中保守取代包含以以存在於該一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置之胺基酸殘基同源取代該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中存在之胺基酸殘基。

5.如申請專利範圍第4項之方法，其中該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中存在之胺基酸殘基經與該正被取代之胺基酸具有共同特徵之保守胺基酸殘基置換，該等共同特徵諸如為類似側鏈、類似電荷及類似疏水性中至少一者。

6.如申請專利範圍第5項之方法，其中該經取代之胺基酸殘基及該置換胺基酸殘基均為相同胺基酸組之成員，其中該等組包含：

(1)非極性殘基：Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）、Pro（P）、Phe（F）、Trp（W）、Met（M）；

(2)不帶電的極性殘基：Gly（G）、Ser（S）、Thr（T）、Cys（C）、Tyr（Y）、Asn（N）、Gln（Q）；及

(3)酸性殘基：Asp（D）、Glu（E）；及(4)鹼性的：Lys（K）、Arg（R）、His（H）。

7.如申請專利範圍第5項之方法，其中該經取代之胺基酸殘基及該置換胺基酸殘基均為相同胺基酸組之成員，其中該等組包含：

(1)芳族：Phe（F）、Trp（W）、Tyr（Y）；

(2)無極性的：Leu（L）、Val（V）、Ile（I）、Ala（A）、Met（M）；

(3)脂族的：Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）；

(4)酸性的：Asp（D）、Glu（E）；

(5)鹼性的：His（H）、Lys（K）、Arg（R）；及

(6)極性的：Gln（Q）、Asn（N）、Ser（S）、Thr（T）、Tyr（Y）。

8.如申請專利範圍第5項之方法，其中該經取代之胺基酸殘基及該置換胺基酸殘基均為相同胺基酸組之成員，其中該等組包含：

(1)疏水性的：Met（M）、Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）；

(2)中性親水性的：Cys（C）、Ser（S）、Thr（T）、Asn（N）、Gln（Q）；

(3)酸性的：Asp（D）、Glu（E）；

(4)鹼性的：His（H）、Lys（K）、Arg（R）；

(5)影響鏈定向之殘基：Gly（G）、Pro（P）；及

(6)芳族：Trp（W）、Tyr（Y）、Phe（F）。

9.如申請專利範圍第3項之方法，其中保守取代包含以存在於該一或多種源自目標物種之免疫球蛋白之構架區之

胺基酸序列中相應位置之共同(consensus)胺基酸殘基取代該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中存在之胺基酸殘基。

10.如前述申請專利範圍中任一項之方法，其進一步包含以下步驟：以源自源於該目標物種之免疫球蛋白的重鏈及/或輕鏈之恆定域置換該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈之至少一個恆定域。

11.如申請專利範圍第10項之方法，其中該等目標物種來源恆定域為抗體亞型免疫球蛋白G（IgG）的。

12.如前述申請專利範圍中任一項之方法，其中該目標物種為哺乳動物目標物種。

13.如申請專利範圍第12項之方法，其中該哺乳動物物種為選自由狗、貓及馬組成之群的伴侶動物。

14.如申請專利範圍第12項之方法，其中該哺乳動物物種為人類。

15.如前述申請專利範圍中任一項之方法，其中存在於該供體免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈可變域之構架區之胺基酸序列中且亦存在於該一或多種源自目標物種之免疫球蛋白中至少一者之構架區之胺基酸序列中相應位置的任何胺基酸殘基均未經取代。

16.一種組成物，其含有如申請專利範圍第1至15項中任一項生產之免疫球蛋白，或其抗原結合片段。

17.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第1至15項中任一項生產之免疫球蛋白，或其抗原結合片段，及至

少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

18.一種如申請專利範圍第1至15項中任一項生產之免疫球蛋白或其抗原結合片段的用途，其用於製備供治療預防疾病之醫藥品。

19.一種適用於治療或預防疾病之如申請專利範圍第1至15項中任一項生產之免疫球蛋白，或其抗原結合片段。

20.一種治療有需要之個體之疾病的方法，其包含以下步驟：投予該個體治療有效量之如申請專利範圍第1至15項中任一項生產之免疫球蛋白，或其抗原結合片段。

21.一種投予目標物種之免疫球蛋白，其包含：

源自該目標物種之免疫球蛋白的輕鏈及重鏈恆定域，

源自供體免疫球蛋白之互補決定區（CDR），其中該供體免疫球蛋白特異性結合於該供體與該目標物種中存在之配位體，及

源自該供體免疫球蛋白之構架區，其中亦未存在於該目標物種之任何免疫球蛋白之相應位置的任何胺基酸殘基均經該目標物種中該相應位置所見之胺基酸取代。

22.如申請專利範圍第21項之免疫球蛋白，其中不對該抗體之CDR區進行胺基酸取代。

23.如申請專利範圍第21或22項之免疫球蛋白，其中源自該供體免疫球蛋白之構架區之不超過7個連續胺基酸殘基經來自該目標物種之殘基取代。

24.如申請專利範圍第21或22項之免疫球蛋白，其中源自該供體免疫球蛋白之構架區之不超過5個連續胺基酸

殘基經來自該目標物種之殘基取代。

25.如申請專利範圍第 21 或 22 項之免疫球蛋白，其中源自該供體免疫球蛋白之構架區之不超過 3 個連續胺基酸殘基經來自該目標物種之殘基取代。

26.如申請專利範圍第 21 至 23 項中任一項之免疫球蛋白，其中該目標物種為哺乳動物物種。

27.如申請專利範圍第 26 項之免疫球蛋白，其中該哺乳動物物種選自由人類、犬類、貓類及馬類組成之群。

28.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 21 至 27 項中任一項之免疫球蛋白，或其抗原結合片段，及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

29.一種如申請專利範圍第 21 至 27 項中任一項之免疫球蛋白或其抗原結合片段的用途，其用於製備供治療預防疾病之醫藥品。

30.一種適用於治療或預防疾病之如申請專利範圍第 21 至 27 項中任一項之免疫球蛋白，或其抗原結合片段。

31.一種治療有需要之個體之疾病的方法，其包含以下步驟：投予該個體治療有效量之如申請專利範圍第 21 至 27 項中任一項生產之免疫球蛋白，或其抗原結合片段。

32.一種中和抗體或其抗原結合片段，其能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF），其中該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及/或重鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸

序列，或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

33.如申請專利範圍第 32 項之抗體或其抗原結合片段，其中該輕鏈包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

34.如申請專利範圍第 32 或 33 項之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%序列一致性之胺基酸序列。

35.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 32 至 34 項中任一項之抗體或其抗原結合片段，及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

36.一種經分離核酸，其編碼如申請專利範圍第 32 至 34 項中任一項之抗體或抗原結合片段。

37.一種經分離核酸，其編碼能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF）之中和抗體輕鏈可變區，其中該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

38.一種經分離核酸，其編碼能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF）之中和抗體輕鏈，其中該輕鏈包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

39.一種經分離核酸，其編碼能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF）之中和抗體重鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

40.一種經分離核酸，其編碼能夠特異性結合於人類神經生長因子（NGF）之中和抗體重鏈，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

41.如申請專利範圍第 36 至 40 項中任一項之經分離核酸，其可操作地連接於一或多個調節序列。

42.一種表現載體，其包含如申請專利範圍第 36 至 40 項中任一項之核酸。

43.如申請專利範圍第 42 項之表現載體，其進一步包含一或多個調節序列。

44.如申請專利範圍第 42 或 43 項之表現載體，其中該表現載體為質體或反轉錄病毒載體。

45.一種宿主細胞，其併有如申請專利範圍第 42 至 44 項中任一項之表現載體。

46.一種生產人類化 NGF 中和抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包含以下步驟：培養如申請專利範圍第 45 項之宿主細胞以使該細胞表現人類化抗 NGF 中和抗體或其抗原結合片段。

47.一種治療、改善或抑制有需要之人類之疼痛的方法，該方法包含以下步驟：投予該人類治療有效量之如申請專利範圍第 32 至 34 項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第 35 項之醫藥組成物、如申請專利範圍第 36 至 41 項中任一項之核酸或如申請專利範圍第 42 至 44 項中任一項之表現載體。

48.一種適用於治療或預防人類疼痛之如申請專利範圍第32至34項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第35項之醫藥組成物、如申請專利範圍第36至41項中任一項之核酸或如申請專利範圍第42至44項中任一項之表現載體。

49.如申請專利範圍第48項之抗體、抗原結合片段、醫藥組成物、核酸或表現載體，其中該疼痛選自由以下組成之群：急性痛、慢性疼痛、圍手術期疼痛、手術後疼痛、發炎性疼痛、瘙癢性疼痛、由骨科手術引起之疼痛、與軟組織手術相關之疼痛、與癌症或癌症病狀相關之慢性疼痛及與以下相關或由以下引起之疼痛：類風濕性關節炎、免疫介導多發性關節炎或骨關節炎。

50.一種適用於治療人類關節炎之如申請專利範圍第32至34項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第35項之醫藥組成物、如申請專利範圍第36至41項中任一項之核酸或如申請專利範圍第42至44項中任一項之表現載體。

51.如申請專利範圍第50項之抗體、抗原結合片段、醫藥組成物、核酸或表現載體，其中該關節炎選自由骨關節炎、免疫介導多發性關節炎及類風濕性關節炎組成之群。

52.一種如申請專利範圍第32至34項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第35項之醫藥組成物、如申請專利範圍第36至41項中任一項之核酸或如申請專利範圍第42至44項中任一項之表現載體的用途，其用於

製備供治療或預防人類疼痛之醫藥品。

53.一種如申請專利範圍第 32 至 34 項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第 35 項之醫藥組成物、如申請專利範圍第 36 至 41 項中任一項之核酸或如申請專利範圍第 42 至 44 項中任一項之表現載體的用途，其用於製備供治療或預防人類關節炎之醫藥品。

54.一種治療或預防人類關節炎之方法，該方法包含以下步驟：投予該人類治療有效量之如申請專利範圍第 32 至 34 項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第 35 項之醫藥組成物、如申請專利範圍第 36 至 41 項中任一項之核酸或如申請專利範圍第 42 至 44 項中任一項之表現載體。

55.一種細胞系或其衍生物或後代細胞，其生產如申請專利範圍第 32 至 34 項中任一項之抗人類 NGF 中和單株抗體或其片段。

56.一種中和抗體或其抗原結合片段，其能夠特異性結合於犬類神經生長因子（NGF），其中該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及/或重鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

57.如申請專利範圍第 56 項之抗體或其抗原結合片段，其中該輕鏈包含 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

58.如申請專利範圍第 56 或 57 項之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列，或與其具有至少 85%序列一致性之胺基酸序列。

59.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 56 至 58 項中任一項之抗體或其抗原結合片段，及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

60.一種經分離核酸，其編碼如申請專利範圍第 56 至 58 項中任一項之抗體或抗原結合片段。

61.一種經分離核酸，其編碼能夠特異性結合於犬類神經生長因子（NGF）之中和抗體重鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

62.一種經分離核酸，其編碼能夠特異性結合於犬類神經生長因子（NGF）之中和抗體重鏈，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列或與其具有至少 85%一致性之胺基酸序列。

63.如申請專利範圍第 60 至 62 項中任一項之經分離核酸，其可操作地連接於一或多個調節序列。

64.一種表現載體，其包含如申請專利範圍第 60 至 62 項中任一項之核酸。

65.如申請專利範圍第 64 項之表現載體，其進一步包含一或多個調節序列。

66.如申請專利範圍第 64 或 65 項之表現載體，其中該表現載體為質體或反轉錄病毒載體。

67.一種宿主細胞，其併有如申請專利範圍第 64 至 66 項中任一項之表現載體。

68.一種生產犬類化NGF中和抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包含以下步驟：培養如申請專利範圍第 67 項之宿主細胞以使該細胞表現犬類化抗 NGF 中和抗體或其抗原結合片段。

69.一種治療、改善或抑制有需要之犬類之疼痛的方法，該方法包含以下步驟：投予該犬類治療有效量之如申請專利範圍第 56 至 58 項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第 59 項之醫藥組成物、如申請專利範圍第 60 至 63 項中任一項之核酸或如申請專利範圍第 64 至 66 項中任一項之表現載體。

70.一種適用於治療或預防犬類疼痛之如申請專利範圍第 56 至 58 項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第 59 項之醫藥組成物、如申請專利範圍第 60 至 63 項中任一項之核酸或如申請專利範圍第 64 至 66 項中任一項之表現載體。

71.如申請專利範圍第 70 項之抗體、抗原結合片段、醫藥組成物、核酸或表現載體，其中該疼痛選自由以下組成之群：急性痛、慢性疼痛、圍手術期疼痛、手術後疼痛、發炎性疼痛、瘡癢性疼痛、由骨科手術引起之疼痛、與軟組織手術相關之疼痛、與癌症或癌症病狀相關之慢性疼痛及與以下相關或由以下引起之疼痛：類風濕性關節炎、免疫介導多發性關節炎或骨關節炎。

72.一種適用於治療犬類關節炎之如申請專利範圍第56至58項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第59項之醫藥組成物、如申請專利範圍第60至63項中任一項之核酸或如申請專利範圍第64至66項中任一項之表現載體。

73.如申請專利範圍第72項之抗體、抗原結合片段、醫藥組成物、核酸或表現載體，其中該關節炎選自由骨關節炎、免疫介導多發性關節炎及類風濕性關節炎組成之群。

74.一種如申請專利範圍第56至58項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第59項之醫藥組成物、如申請專利範圍第60至63項中任一項之核酸或如申請專利範圍第64至66項中任一項之表現載體的用途，其用於製備供治療或預防犬類疼痛之醫藥品。

75.一種如申請專利範圍第56至58項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第59項之醫藥組成物、如申請專利範圍第60至63項中任一項之核酸或如申請專利範圍第64至66項中任一項之表現載體的用途，其用於製備供治療或預防犬類關節炎之醫藥品。

76.一種治療或預防犬類關節炎之方法，該方法包含以下步驟：投予該犬類治療有效量之如申請專利範圍第56至58項中任一項之抗體或抗原結合片段、如申請專利範圍第59項之醫藥組成物、如申請專利範圍第60至63項中任一項之核酸或如申請專利範圍第64至66項中任一項之表現載體。

77.一種細胞系或其衍生物或後代細胞，其生產如申請專利範圍第 56 至 58 項中任一項之抗犬類 NGF 中和單株抗體或其片段。

八、圖式：

(如次頁)

77.一種細胞系或其衍生物或後代細胞，其生產如申請專利範圍第 56 至 58 項中任一項之抗犬類 NGF 中和單株抗體或其片段。

八、圖式：

(如次頁)

輕鏈

FR1		
大鼠	aD11	DIQMTQSPASLSASLGETVTIEC (SEQ ID NO:28)
犬類	VK	DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITC (SEQ ID NO:29)
貓類	VK	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISC (SEQ ID NO:30)
馬類	VK	DIVMTQSPASLSASLGETVTIEC (SEQ ID NO:31)
FR2		
大鼠	aD11	WYQQKPGKSPQLLIY (SEQ ID NO:32)
犬類	VK	WYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:33)
貓類	VK	WYLQKPGQSPRRLIY (SEQ ID NO:34)
馬類	VK	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:35)
FR3		
大鼠	aD11	GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFC (SEQ ID NO:36)
犬類	VK	GVPSRFSGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYC (SEQ ID NO:37)
貓類	VK	GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFC (SEQ ID NO:38)
馬類	VK	GVPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFC (SEQ ID NO:39)
FR4		
大鼠	aD11	FGGGTKLELK (SEQ ID NO:40)
犬類	VK	FGAGTKVELK (SEQ ID NO:41)
貓類	VK	FGPGTKLEIK (SEQ ID NO:42)
馬類	VK	FGQGTKLELK (SEQ ID NO:43)

圖1

重鏈

FR1		
大鼠	aD11	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGF (SEQ ID NO:44)
犬類	VH	EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGF (SEQ ID NO:45)
貓類	VH	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGF (SEQ ID NO:46)
馬類	VH	QVQLKESGPGLVNPSQTLSLTCTVSGF (SEQ ID NO:47)
FR2		
大鼠	aD11	WVRQATGRGLEWMG (SEQ ID NO:48)
犬類	VH	WVRQALGRGLEWVG (SEQ ID NO:49)
貓類	VH	WVRQAPGKGLEWMG (SEQ ID NO:50)
馬類	VH	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:51)
FR3		
大鼠	aD11	RLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSEDTATYYCAR (SEQ ID NO:52)
犬類	VH	RLTITRDTSKSTVFLQMHSLRSEDTATYYCAR (SEQ ID NO:53)
貓類	VH	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKTEDTATYYCAR (SEQ ID NO:54)
馬類	VH	RATITRDTSKSQVFLQMNSLTSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:55)
FR4		
大鼠	aD11	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:56)
犬類	VH	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:57)
貓類	VH	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:58)
馬類	VH	WGQGILVTVSS (SEQ ID NO:59)

圖2

SEQ ID NO:1 – 犬類 VK

DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGQAPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYCQHYFHYPRTFGAGTKVELK

SEQ ID NO:2 – 犬類 VH

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVRQALGRGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRLTITRDTSKSTVFLQMHSLRSEDTATYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:7 – 犬類VK及犬類κ輕鏈恆定域

DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGQAPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYCQHYFHYPRTFGAGTKVELKRNDAQ
PAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDK
DSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

SEQ ID NO:8 – 犬類VH及犬類重鏈B恆定域

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVRQALGRGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRLTITRDTSKSTVFLQMHSLRSEDTATYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVS
WNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKV
DKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVV
DLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQ
FTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFYPP
DIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAV
MHEALHNHYTQESLSHSPGK

圖3

SEQ ID NO:3 – 貓類 VK

DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKPGQSPRRLIYNTDTLHTGV
PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFCQHYFHYPRTFGPGTKLEIK

SEQ ID NO:4 – 貓類 VH

QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWMGGVWA
GGATDYNSALKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKTEDTATYYCARDGGYSSSTLYAM
DAWGQGTLVTVSS

SEQ ID SEQ ID NO:9 – 貓類VK及貓類κ輕鏈恆定域

DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKPGQSPRRLIYNTDTLHTGV
PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFCQHYFHYPRTFGPGTKLEIKRSDAQPS
VFLFQPSLDELHTGSASIVCILNDFYPKEVNVKWKVDGVVQTKASKESTTEQNSKDS
TYSLSSTLTMSRTEYQSHEKFSCEVTHKSLASTLVKSFNRSECQRE

SEQ ID NO:10 – 貓類VH及貓類重鏈恆定域

QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWMGGVWA
GGATDYNSALKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKTEDTATYYCARDGGYSSSTLYAM
DAWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLGYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQASGLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHPPSNTKVDKTVR
KTDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDD
SDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSK
SLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEIT
GQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHT
QKSLTQSPGK

圖4

SEQ ID NO:5 – 馬類 VK

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGQSPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFCQHYFHYPRTFGQGTKLELK

SEQ ID NO:6 - 馬類 VH

QVQLKESGPGLVNPSQTLSLTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRATITRDTSKSQVFLQMNSLTSEDTAVYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGILVTVSS

SEQ ID NO: 11 – 馬類VK及馬類κ輕鏈恆定域

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGQSPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFCQHYFHYPRTFGQGTKLELKRDDAK
PSAFIFPPSSEELSSGSASVVCLVYGFYPSGATINWKVDGLAKTSSFHSSLTEQDS
KDNTYSLSSTLTLPKADYEAHNVYACEVSHKTLSSPLVKSFKRQDC

SEQ ID NO: 12 – 馬類VH及馬類重鏈2恆定域

QVQLKESGPGLVNPSQTLSLTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRATITRDTSKSQVFLQMNSLTSEDTAVYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGILVTVSSASTTAPKYFQLTPSCGITSDATVALGCLVSDYYPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPSVLQSSGLYALSSMVTVPASTWTSETYICNVAHPASSTKVDK
RIPPCVLSAEGVIPIPSVPKPQCPPYTHSKFLGGPSVFIFPPNPKDALMISRTPVVTC
VVVNLSDQYPDVQFSWYVDNTEVHSAITKQREAQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLS
GKEFKCSVTNVGVPQPISRAISRGKGPSRVPQVYVLPPHPDELAKSKVSVTCLVKD
FYPPDISVEWQSNRWPELEGKYSTTPAQLDGDGSYFLYSKLSLETSRWQQVESF
TCAVMHEALHNHFTKTDISESLGK

圖5

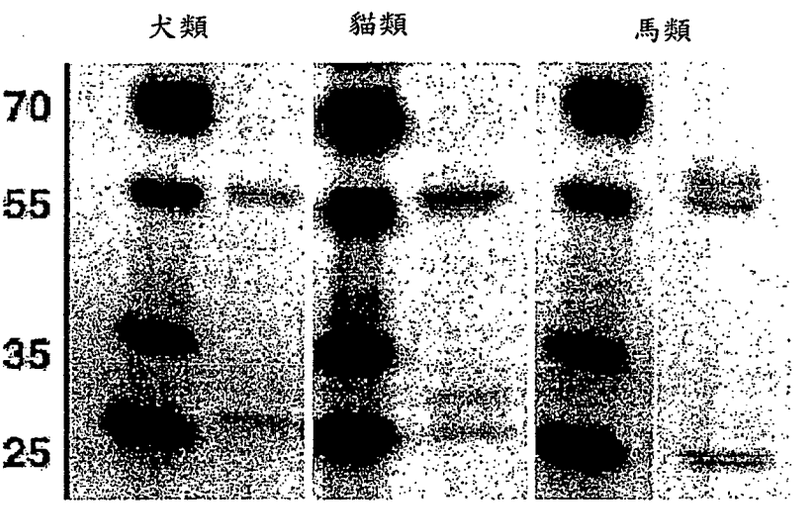


圖6

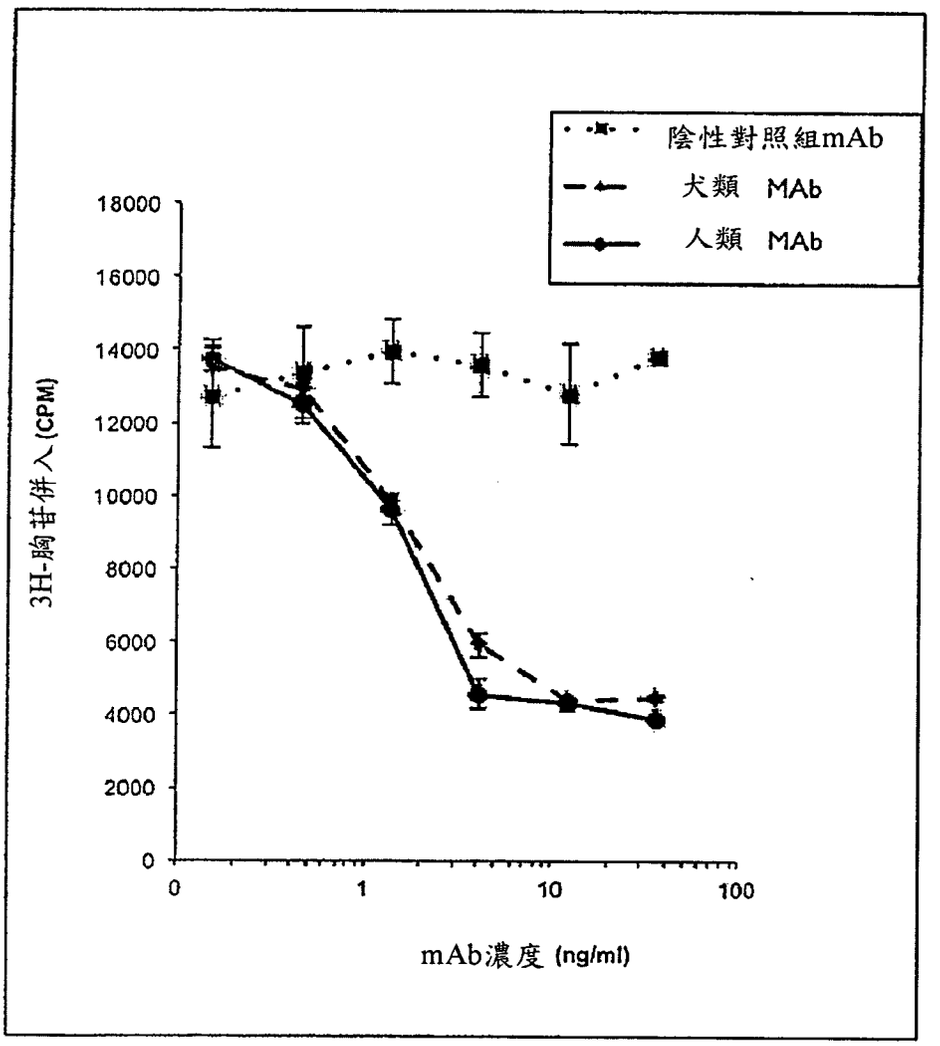

陰性對照組mAb
犬類 MAb
人類 MAb
3H-胸苷併入(CPM)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
1
10
100
mAb濃度 (ng/ml)

圖7A

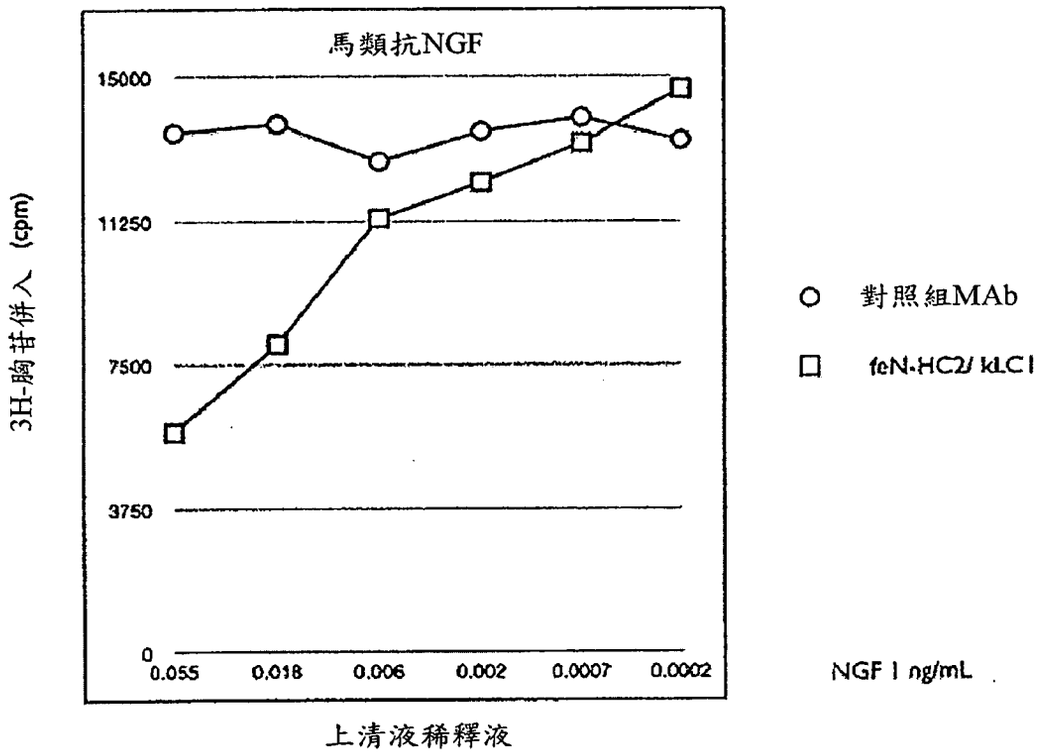

馬類抗NGF
15000
11250
7500
3750
0
3H-胸苷併入 (cpm)
0.055
0.018
0.006
0.002
0.0007
0.0002
上清液稀釋液
對照組MAb
feN-HC2/ kLC1
NGF I ng/mL

圖7B

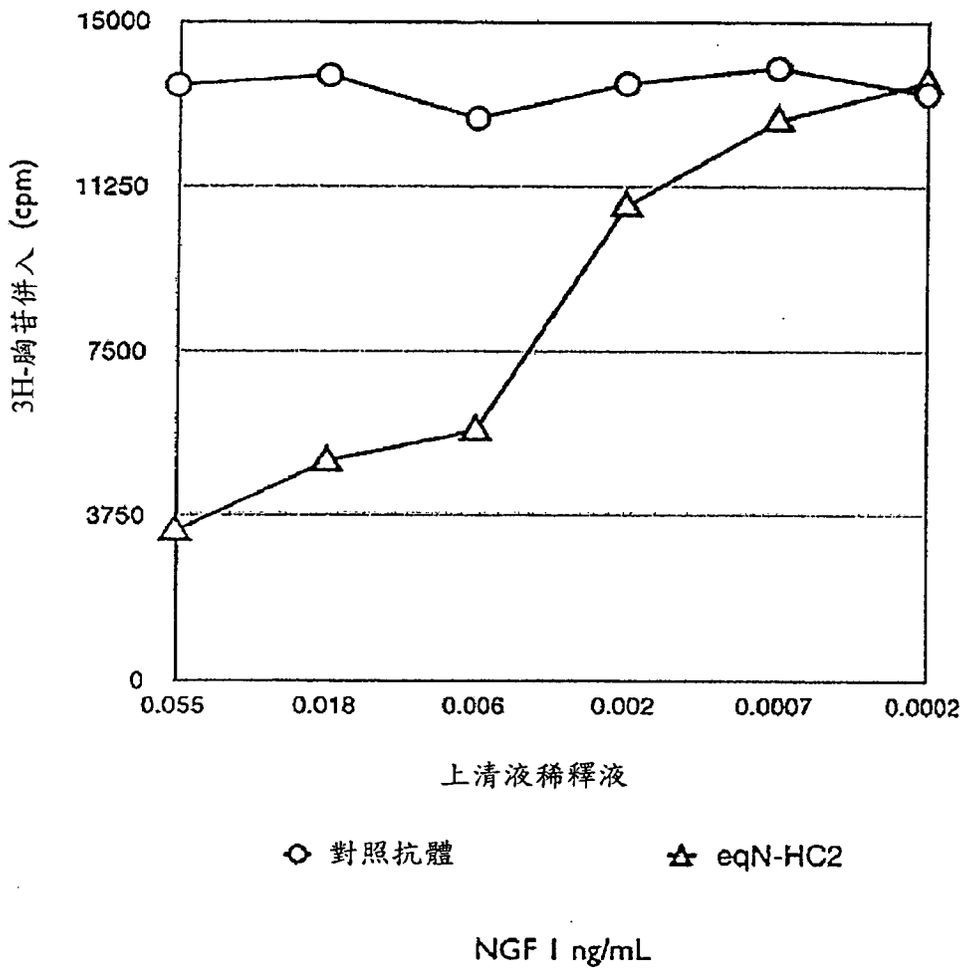

15000
11250
7500
3750
0
3H-胸苷併入 (cpm)
0.055
0.018
0.006
0.002
0.0007
0.0002
上清液稀釋液
對照抗體
eqN-HC2
NGF I ng/mL

圖7C

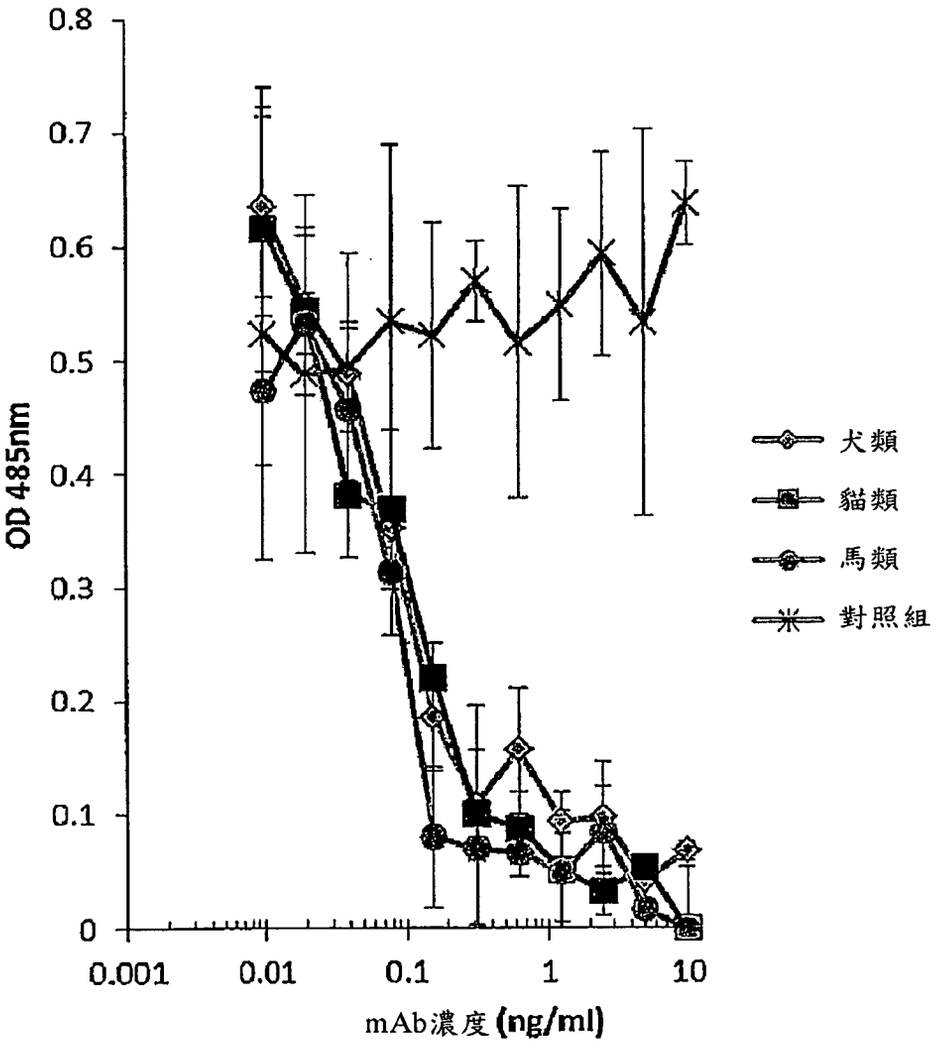

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD 485nm
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb濃度 (ng/ml)
犬類
貓類
馬類
對照組

圖7D

輕鏈

新 Hu LC FR1	DIQMTQSPASLSASLGETVTINC	SEQ ID NO:60
大鼠 aD11 Ruberti	E	
Hu-aD11 Pavone	S V DR T	
新 Hu LC FR2	WYQQKPGKSPQLLIY	SEQ ID NO:61
大鼠 aD11 Ruberti		
Hu-aD11 Pavone	A K	
新 Hu LC FR3	GVPSRFSGSGSGTEYSLKINSLQSEDVASYFC	SEQ ID NO:62
大鼠 aD11 Ruberti	Q	
Hu-aD11 Pavone	D T T S P F T	
新 Hu LC FR4	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:63
大鼠 aD11 Ruberti	L	
Hu-aD11 Pavone	Q V I	

圖8A

重鏈

新 Hu HC FR1	QVQLKESGPGLVQPSQILSLTCTVSGF	SEQ ID NO:64
大鼠 aD11 Ruberti		
Hu-aD11 Pavone	E V G GGS R S AA	
新 Hu HC FR2	WVRQASGRGLEWMG	SEQ ID NO:65
大鼠 aD11 Ruberti	T	
Hu-aD11 Pavone	P K V	
新 Hu HC FR3	RLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSEDTATYYCAR	SEQ ID NO:66
大鼠 aD11 Ruberti		
Hu-aD11 Pavone	F S N NTAY Q N RA V	
新 Hu HC FR4	WGQGTTVTVSS	SEQ ID NO:67
大鼠 aD11 Ruberti	S	
Hu-aD11 Pavone	L	

圖8B

SEQ ID NO:13 New Hu αD11 VL

DIQMTQSPASLSASLGETVTINCRASEDIYN
ALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVPS
RFSGSGSGTEYSLKINSLQSEDVASYFCQH
YFHYPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:14 New Hu αD11 VH

QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLT
NNNVNWVRQASGRGLEWMGGVWAGGAT
DYNSALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQS
EDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT
TVTVSS

圖9A

SEQ ID NO:24 - new Hu αD11完整HC-IgG4

MAVLVLLLCLVTFPTCVLSQVQLKESGPGLVQPSQTLS
LTCTVSGFSLTNNNVNWVRQASGRGLEWMGGVWAG
GATDYNSALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSEDTAT
YYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTTVTVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY
TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK**

SEQ ID NO:25 - new Hu αD11完整κ LC

MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIQMTQSPASLSASLGET
VTINCRASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLH
TGVPSRFSGSGSGTEYSLKINSLQSEDVASYFCQHY
FHYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC**

圖9B

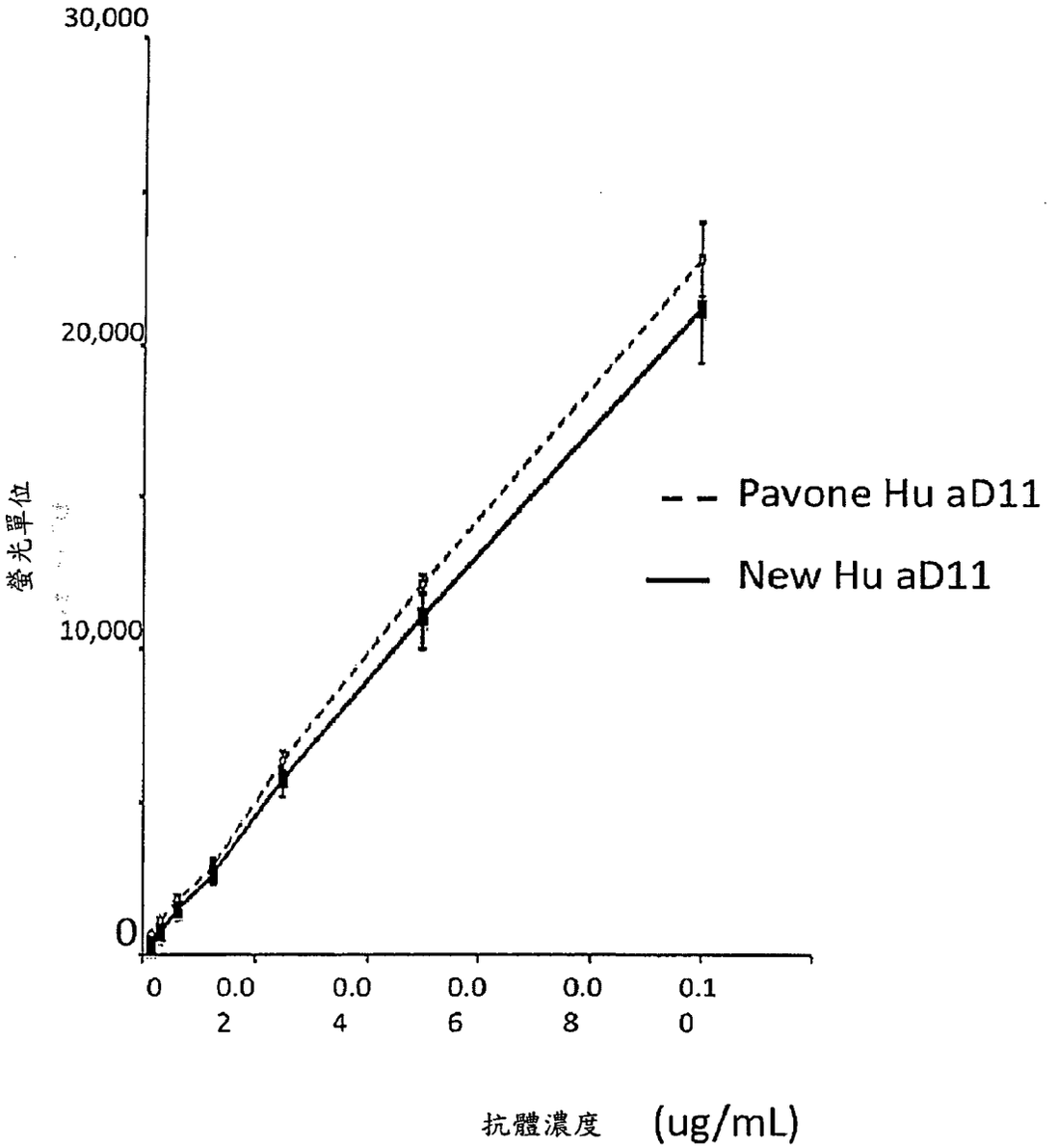

30,000
20,000
10,000
0
螢光單位
0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
Pavone Hu aD11
New Hu aD11
抗體濃度 (ug/mL)

圖9C

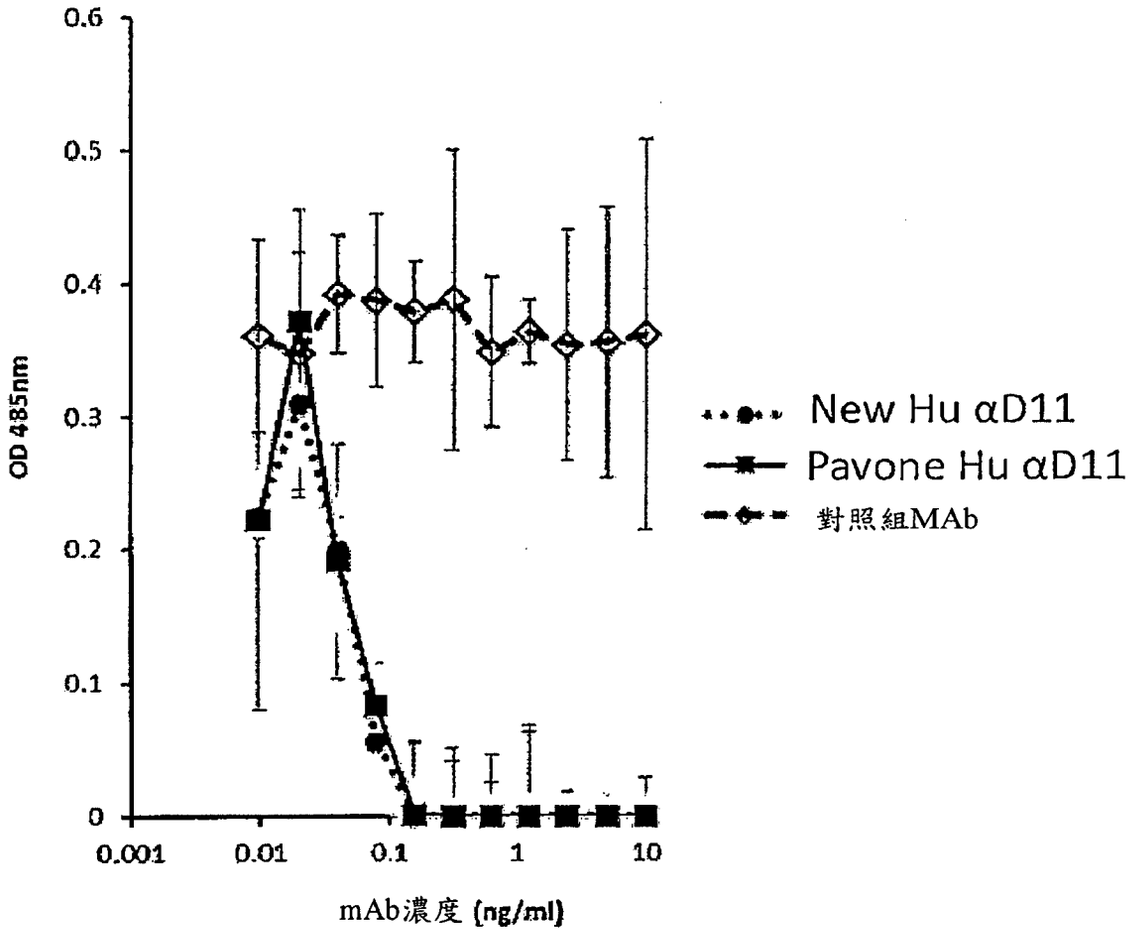

0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD 485nm
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb濃度 (ng/ml)
New Hu αD11
Pavone Hu αD11
對照組MAb

圖 9D

SEQ ID NO 15: 犬類化抗TNF Mab VK域

DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQGIRNYLA
WYQQKPGQAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDVAVYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIK

SEQ ID NO 16: 犬類化抗TNF MAb VH域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYA
MHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVE
GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
VSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS

圖10

SEQ ID NO 17: 犬類化抗TNF MAb κ輕鏈

DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQGIRNYLA
WYQQKPGQAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDVAVYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCL
LNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKD
STYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLI
KSFQRSECQRVD*

圖11

SEQ ID NO 18: 犬類化抗TNF Mab重鏈A型恆定域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
ADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
SASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQS
SGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGP
SVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNG
TYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKEL
SSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
RWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLSHSPGK*

SEQ ID NO 19: 犬類化抗TNF Mab重鏈B型恆定域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
ADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
SASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQS
SGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPE
MLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPRE
EQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPP
SREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLS
VDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK*

SEQ ID NO 20: 犬類化抗TNF Mab重鏈C型恆定域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
ADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
SASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVSGYIPEPVTVSWNSVSLTSGVHTFPSVLQS
SGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVAKECECKCNCNNCPCPGCGLL
GGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQ
SNGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLPPSR
DEMSKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVEWQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVD
KSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSPGK*

SEQ ID NO 21: 犬類化抗TNF Mab重鏈D型恆定域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
ADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
SASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQS
SGLYSLSSTVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVPKESTCKCISPCPVPESLGGP
SVFIFPPKPKDILRITRTPEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNS
TYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSPKEL
SSSDTVTLTCLIKDFYPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
RWQQGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK*

圖12

SEQ ID NO 22：嵌合抗TNF MAb.人類VK-犬類κ輕鏈

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQ
GTKVEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKV
DGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSL
PSTLIKSFQRSECQRVD*

SEQ ID NO 23：嵌合抗TNF MAb.人類VH-犬類重鏈B型恆定域

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSA
ITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS
YLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLV
SGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSE
TFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIF
PPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPRE
EQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQA
HQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPESKY
RTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESL
SHSPGK*

圖13

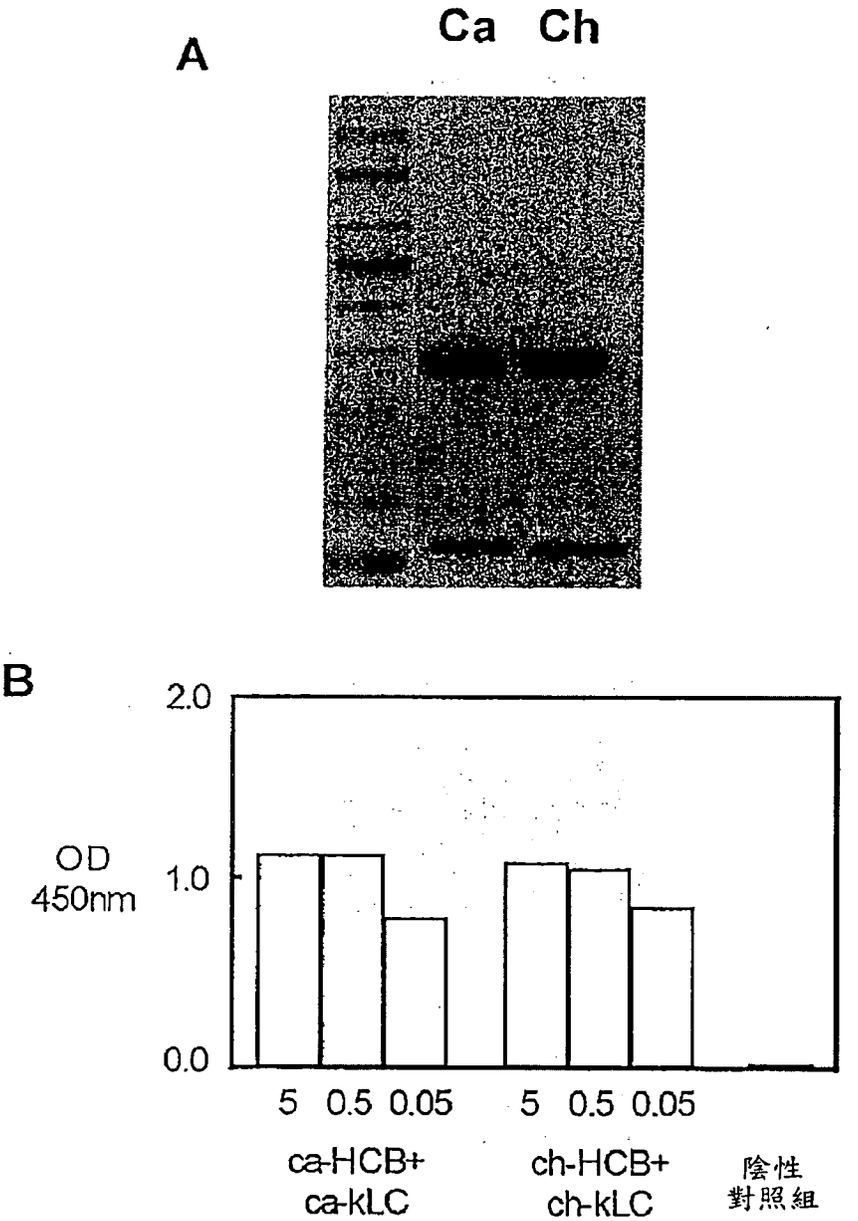
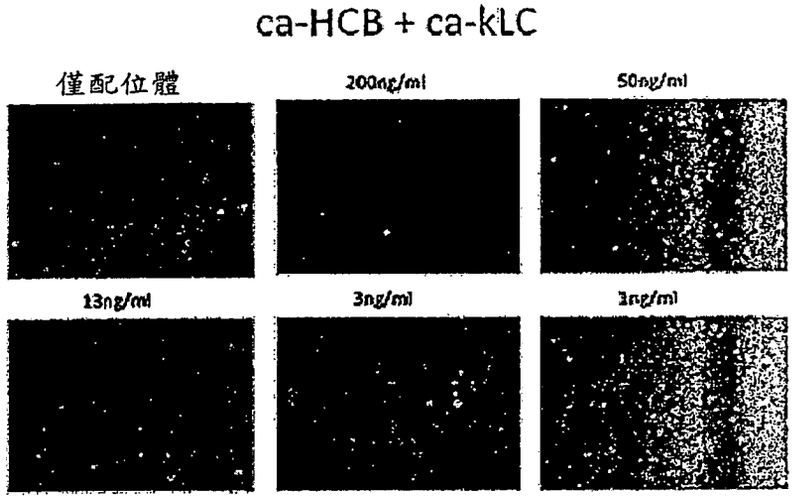

A
Ca Ch
B
OD
450nm
2.0
1.0
0.0
5 0.5 0.05
5 0.5 0.05
ca-HCB+
ca-kLC
ch-HCB+
ch-kLC
陰性
對照組

圖14

A


ca-HCB + ca-kLC
僅配位體
200ng/ml
50ng/ml
13ng/ml
3ng/ml
1ng/ml

B

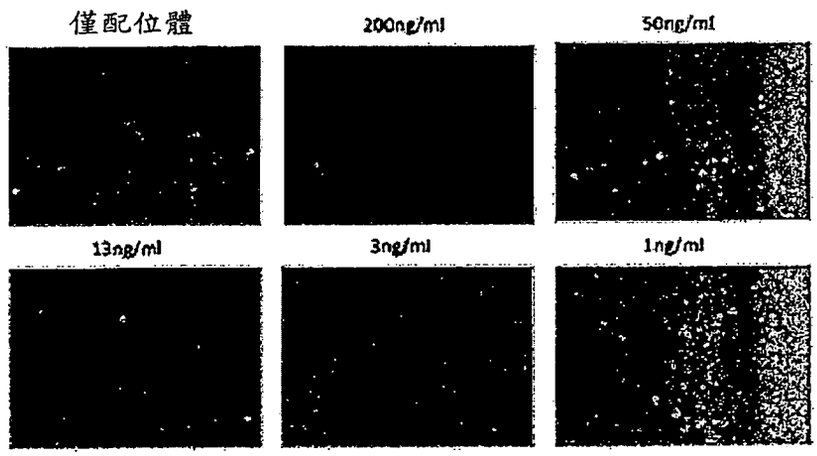

ch-HCB + ch-kLC
僅配位體
200ng/ml
50ng/ml
13ng/ml
3ng/ml
1ng/ml

圖15

C

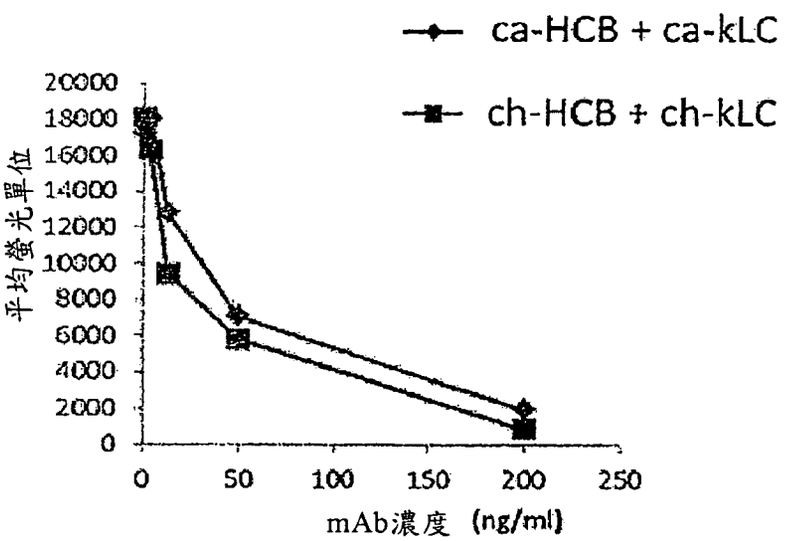

ca-HCB + ca-kLC
ch-HCB + ch-kLC
平均螢光單位
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
50
100
150
200
250
mAb濃度 (ng/ml)

圖15

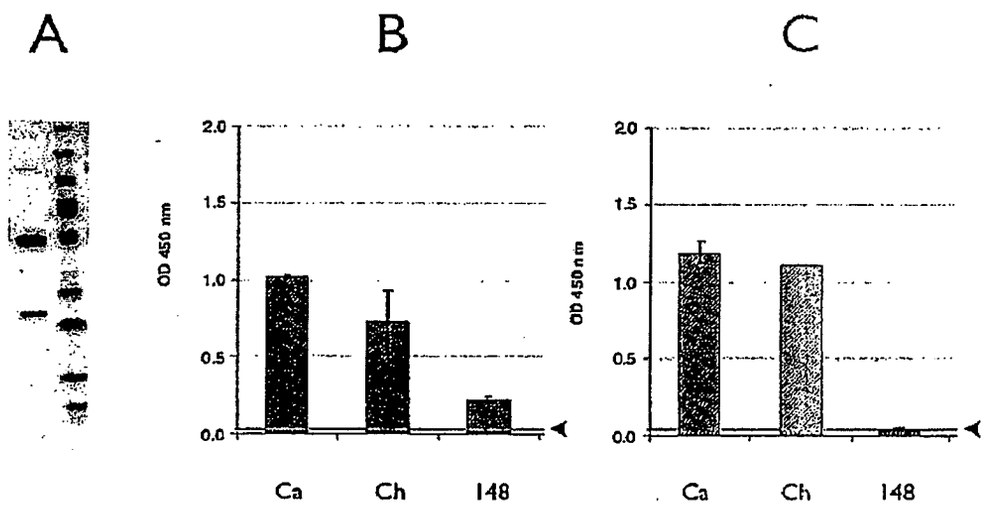

A
B
C
OD 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ca
Ch
148
OD 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ca
Ch
148

圖16

SEQ ID NO:26 - ca148-HCB 重鏈

MGFGLSWVFLVALLRGVQCEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
GFIFSSYAMRWVRQAPGKGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMD
VWGQGTSVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYF
PEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWP
SETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEML
GGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK
QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNK
ALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFY
PPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK**

SEQ ID NO:27 - ca148-kLC 輕鏈

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPASLSLSPGEKATISCRAS
QSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLEPEDVAVYYCQQPSNWPPFTFGPGTKVDIKRNDAQPAV
YLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQ
ESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKS
FQRSECQRVD**

圖17

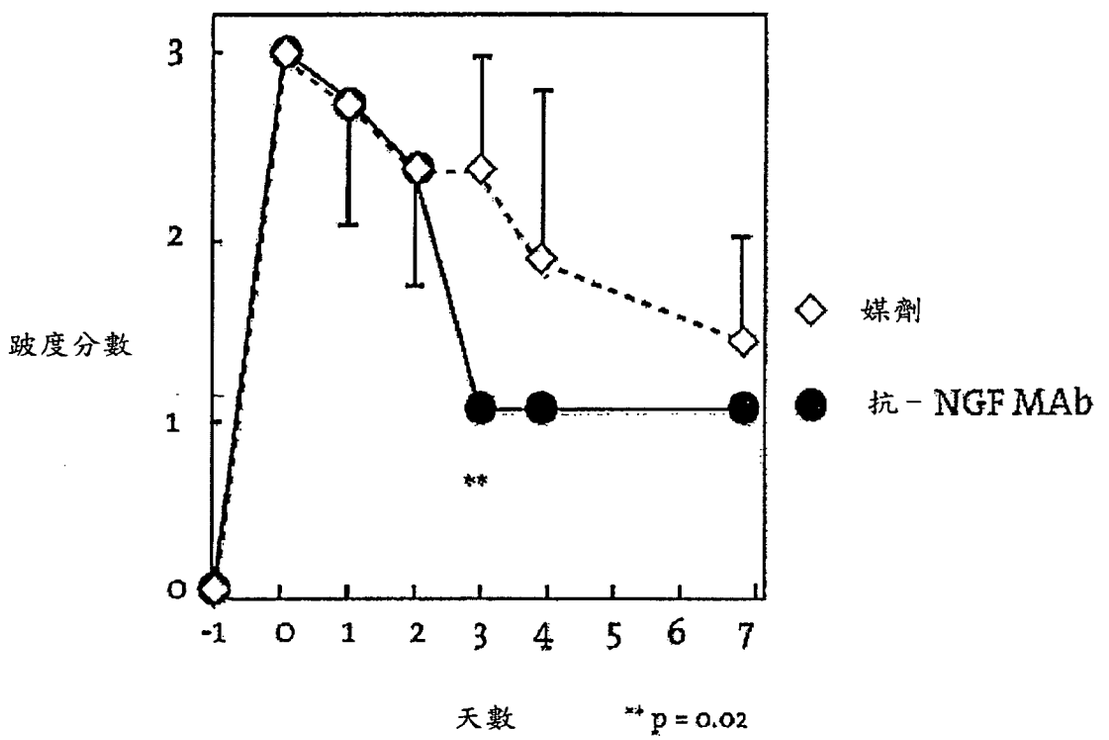


圖18