



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I519646 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：102134040

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 18 日

(51)Int. Cl. : *C12Q1/02 (2006.01)* *G01N33/577 (2006.01)*  
*C40B20/04 (2006.01)* *C40B30/04 (2006.01)*  
*C07K16/24 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*  
*A61P17/06 (2006.01)* *A61P19/02 (2006.01)*

(30)優先權：2012/09/19 美國 61/703,170

(71)申請人：艾伯維生物醫療股份有限公司(美國) ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (US)  
美國(72)發明人：哈汀 費歐那 A HARDING, FIONA A. (US)；雷索 奧莉薇 珍妮佛 RAZO,  
OLIVIA JENNIFER (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 6090382

Harding FA et al., "The immunogenicity of humanized and fully human antibodies", mAbs, vol.2, no.3, p.256-265, 2010/05/01

Yoon SO et al., "Construction, affinity maturation, and biological characterization of an anti-tumor-associated glycoprotein-72 humanized antibody", The Journal of Biological Chemistry, vol.281, no.11, p.6985-6992, 2006/03/17

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：22 共 88 頁

(54)名稱

識別具有降低免疫原性之抗體之方法

METHODS FOR IDENTIFYING ANTIBODIES WITH REDUCED IMMUNOGENICITY

(57)摘要

本揭示闡述識別與參考抗體相比具有降低免疫原性之該參考抗體變體的方法。本揭示進一步闡述與參考抗 TNF- $\alpha$  參考抗體相比具有降低免疫原性之該參考抗 TNF- $\alpha$  抗體的變體。

The disclosure describes method of identifying a variant of a reference antibody with reduced immunogenicity as compared to the reference antibody. The disclosure further describes variants of a reference anti-TNF- $\alpha$  antibody having reduced immunogenicity as compared to the reference anti-TNF- $\alpha$  reference antibody.

指定代表圖：

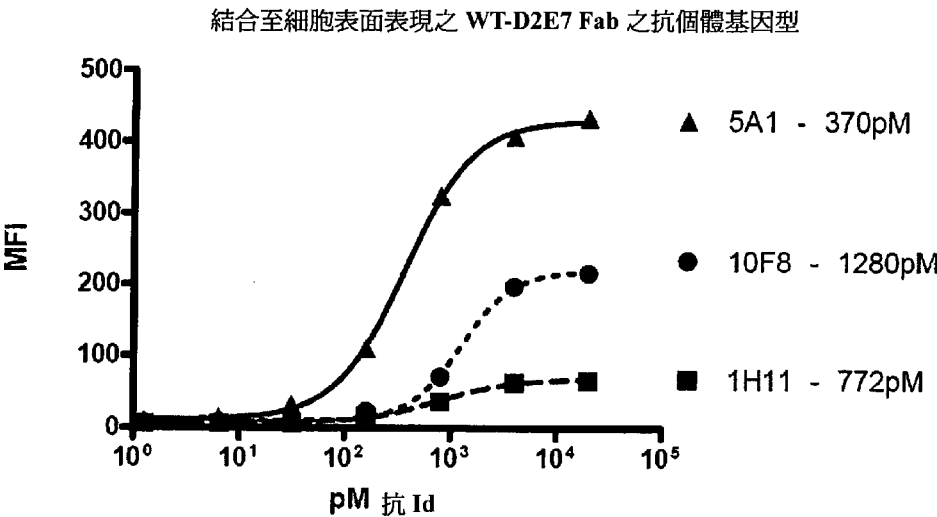


圖 6

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

識別具有降低免疫原性之抗體之方法

METHODS FOR IDENTIFYING ANTIBODIES WITH REDUCED  
IMMUNOGENICITY

## 相關申請案的交叉參考

本申請案根據35 U.S.C. § 119(e)主張對2012年9月19日提出申請之臨時申請案系列第61/703,170號之優先權，其內容之全文以引用方式併入本文中。

## 【先前技術】

B細胞表位係由免疫系統之抗體鑑別之分子的位點。治療蛋白中之B細胞表位之識別可用於設計在投與患者時不會引發免疫反應之變體。

B細胞表位可藉由通常利用丙胺酸(丙胺酸掃描)使蛋白質之胺基酸個別突變並測定每一突變對抗體結合之效應來識別(Onda等人，2011, Proc. Natl. Acad. Sci. 108(14):5742-7)。誘變後蛋白質-抗體結合之破壞指示突變殘基係由抗體鑑別之B細胞表位的一部分。已發現，甚至B細胞表位中之單一突變可消除與一組針對蛋白質之抗體的結合，且蛋白質之免疫原性可藉由在B細胞表位中引入突變來降低(Nagata 及 Pastan, 2009, Advanced Drug Delivery Reviews 61:977-985)。然而，此方法亦耗時且勞動密集。此外，丙胺酸掃描不必識別可最大降低免疫原性之突變。

因此，需要容許識別並消除B細胞表位之簡單的非勞動密集但全面之方法。

**【發明內容】**

本發明提供允許對欲闡明之參考抗體感興趣之區域內之每一及每個胺基酸之免疫原性貢獻的系統。本揭示內容提供，參考抗體之任何、一些或所有位置處之胺基酸殘基可突變成其他19胺基酸中之一些或全部且評價該突變對抗體之免疫原性的效應。亦可評價突變對抗體之表現程度及/或與靶分子之結合的效應，從而容許識別抗體變體，其中消除或減少免疫原性區但其保留有利性質(例如，適宜表現程度、與靶分子結合)。因此，本發明提供降低抗體之免疫原性的方法。該等方法係基於篩選並識別抗體變體，其中與抗個體基因型抗體之結合降低。與抗個體基因型抗體之結合降低與降低之活體內免疫原性相關(例如，參見Nagata及Pastan, 2009, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:977-985)。

本揭示內容之方法通常包含以下步驟：(a) 使宿主細胞庫與特異性結合至參考抗體之抗個體基因型抗體接觸，該參考抗體係結合至靶分子之單株抗體，該宿主細胞庫包含各自在細胞表面上表現因單一胺基酸點突變不同於參考抗體之抗體變體的哺乳動物宿主細胞；(b) 識別該宿主細胞庫中之細胞群體，其表現展示相對於參考抗體與抗個體基因型抗體之結合降低的抗體變體；及(c) 識別在該群體中富含之抗體變體，藉此識別具有降低免疫原性之參考抗體之變體。在某些態樣中，該等方法需要使宿主細胞庫經受流式細胞計數法及使用(例如)螢光活化細胞分選(FACS)自宿主細胞庫分選該群體。

在某些態樣中，該等方法進一步包含以下步驟：測定具有降低免疫原性之抗體變體是否以實質上等於或優於參考抗體之程度結合至靶分子及/或以實質上等於或優於參考抗體之表現程度的程度表現。在具體實施例中，結合及表現係藉由流式細胞計數法、磁性珠粒分選、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa或KinExA測定，且係在識別

具有降低免疫原性之抗體變體之前、同時或之後測定。

本文所述方法已適用於抗TNF- $\alpha$ 抗體D2E7 (亦稱作阿達木單抗 (Adalimumab))。識別與1個、2個或3個不同抗個體基因型抗體之結合降低之D2E7之變體。本發明提供具有與D2E7之CDR序列相關之CDR序列的抗TNF- $\alpha$ 抗體，但其具有至少一個降低與抗Id抗體之結合的取代。該等變體在本文中有時稱作「降低免疫原性」變體。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體包含6個具有對應於以下序列之胺基酸序列的CDR：SEQ ID NO:5 (CDR-H1)、SEQ ID NO:6 (CDR-H2)、SEQ ID NO:7 (CDR-H3)、SEQ ID NO:8 (CDR-L1)、SEQ ID NO:9 (CDR-L2)及SEQ ID NO:10 (CDR-H3)，且具有至少一個選自以下之取代：CDR-L1中之G5F、CDR-L1中之G5I、CDR-L1中之G5V、CDR-L1中之G5W、CDR-L1中之G5Y、CDR-L1中之R7I、CDR-L1中之R7T、CDR-L1中之R7V、CDR-L1中之N8A、CDR-L1中之N8D、CDR-L1中之N8E、CDR-L1中之N8G、CDR-L1中之N8L、CDR-L1中之N8M、CDR-L1中之N8Q、CDR-L1中之N8R、CDR-L1中之N8T、CDR-L2中之A1I、CDR-L2中之A1T、CDR-L2中之A1V、CDR-L2中之T4D、CDR-L3中之R2G、CDR-L3中之N4F、CDR-L3中之N4M、CDR-L3中之N4W、CDR-L3中之N4Y、CDR-L3中之R5L、CDR-L3中之R5N、CDR-L3中之R5W、CDR-L3中之R5Y、CDR-L3中之T9Y、CDR-H1中之D1S、CDR-H1中之Y2A、CDR-H1中之Y2C、CDR-H1中之Y2K、CDR-H1中之Y2M、CDR-H1中之Y2R、CDR-H1中之Y2S、CDR-H1中之Y2V、CDR-H1中之H5C、CDR-H1中之H5D、CDR-H1中之H5E、CDR-H1中之H5S、CDR-H1中之H5T、CDR-H2中之T3A、CDR-H2中之T3G、CDR-H2中之T3N、CDR-H2中之W4A、CDR-H2中之W4F、CDR-H2中之W4H、CDR-H2中之W4L、CDR-H2中之W4M、CDR-H2中之W4V、CDR-H2中之N5G、CDR-H2中之S6D、CDR-H2中之S6L、

CDR-H2中之I9K、CDR-H2中之D10L、CDR-H2中之Y11A、CDR-H2中之Y11C、CDR-H2中之Y11E、CDR-H2中之Y11F、CDR-H2中之Y11G、CDR-H2中之Y11H、CDR-H2中之Y11I、CDR-H2中之Y11K、CDR-H2中之Y11L、CDR-H2中之Y11M、CDR-H2中之Y11N、CDR-H2中之Y11Q、CDR-H2中之Y11R、CDR-H2中之Y11S、CDR-H2中之Y11V、CDR-H2中之Y11W、CDR-H2中之A12Y、CDR-H2中之D13N、CDR-H2中之V15D、CDR-H2中之V15L、CDR-H2中之V15M、CDR-H2中之V15Q、CDR-H2中之V15T、CDR-H2中之E16F、CDR-H2中之E16H、CDR-H2中之E16K、CDR-H2中之E16R、CDR-H2中之E16T、CDR-H2中之E16W、CDR-H2中之G17A、CDR-H2中之G17C、CDR-H2中之G17E、CDR-H2中之G17H、CDR-H2中之G17I、CDR-H2中之G17K、CDR-H2中之G17L、CDR-H2中之G17M、CDR-H2中之G17N、CDR-H2中之G17P、CDR-H2中之G17Q、CDR-H2中之G17R、CDR-H2中之G17S、CDR-H2中之G17T、CDR-H2中之G17Y、CDR-H3中之V1G、CDR-H3中之V1R、CDR-H3中之V1W、CDR-H3中之L4T、CDR-H3中之L4V、CDR-H3中之T6V、CDR-H3中之S9K、CDR-H3中之S9W、CDR-H3中之S9Y及CDR-H3中之D11V。與阿達木單抗之CDR序列相比，6個CDR一起可具有至多8個、至多7個、至多6個、至多5個或至多4個胺基酸取代。在某些態樣中，與阿達木單抗之CDR相比，每一CDR可具有至多4個、至多3個或至多2個取代。在具體實施例中，本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體具有胺基酸取代之一或多個組合，其中重鏈取代(若存在)包含以下中之至少一者：(a) CDR-H1中之Y2K；(b) CDR-H1中之Y2M；(c) CDR-H1中之Y2K及CDR-H3中之T6V；(d) CDR-H1中之Y2K、CDR-H3中之V1G及CDR-H3中之T6V；(e) CDR-H3中之V1W；及(f) CDR-H3中之V1G及CDR-H3中之T6V，且其中輕鏈取代(若存在)包含以下中之至少一者：(a) CDR-L1中之

G5S 及 CDR-L1 中之 A11S ; (b) CDR-L1 中之 R7I ; (c) CDR-L1 中之 G5S 、 CDR-L1 中之 R7T 及 CDR-L1 中之 A11S ; 及 (d) CDR-L1 中之 G5S 、 CDR-L1 中之 R7I 及 CDR-L1 中之 A11S 。在具體實施例中，本揭示內容之抗體包含選自圖22中所述胺基酸取代之胺基酸取代的組合。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體較佳與阿達木單抗抗個體基因型抗體 5A1、10F8、7A11、1H11、6A11及10B7中之一者、二者、三者、四者、五者或所有六者之結合降低。

本發明進一步係關於編碼本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體的核酸分子及包含其之宿主細胞。

本發明進一步係關於包含本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體之醫藥組合物及藉由投與抗TNF- $\alpha$ 抗體或含有其之醫藥組合物治療患有免疫病症之人類患者的方法。在某些態樣中，所治療免疫病症係類風濕性關節炎(RA) (包括成人之中度至嚴重RA)、幼年型特發性關節炎(JIA) (包括4歲及更大患者之中度至嚴重多關節JIA)、牛皮癬性關節炎(PsA) (包括成人之PsA)、關節黏連性脊椎炎(AS) (包括成人之AS)、克羅恩氏病(Crohn's disease) (CD) (包括成人之中等或嚴重CD)、慢性斑塊狀牛皮癬(Ps) (包括成人之中度至嚴重慢性斑塊狀牛皮癬)或軸心型脊椎關節炎(axSpA) (包括無結構損害之X射線證據之成人患者之嚴重axSpA)。

### 【圖式簡單說明】

圖1A-1C：圖1A提供合成D2E7 (阿達木單抗，HUMIRA)可變重鏈(V<sub>H</sub>)及可變輕鏈(V<sub>L</sub>)片段之轉譯胺基酸序列。圖1B提供D2E7 V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>片段之CDR胺基酸序列。圖1C提供D2E7 V<sub>H</sub>及D2E7 V<sub>L</sub>片段之核苷酸序列。

圖2：提供D2E7- V<sub>L</sub>中引起與TNF- $\alpha$ 之中性結合及與抗Id 5A1 (a)、10F8 (b)或7A11 (c)之降低結合之有益突變的列表。胺基酸位置

係在個別CDR情況中以Kabat編號給出。

**圖3A-3B：**圖3A提供D2E7-  $V_H$  CDR-H1及CDR-H2中引起與TNF- $\alpha$ 之中性結合及與抗Id 1H11 (d)、6A11 (e)或10B7 (f)之降低結合之有益突變的列表。圖3B提供D2E7-  $V_H$  CDR-H3中引起與TNF- $\alpha$ 之中性結合及與抗Id 1H11 (d)、6A11 (e)或10B7 (f)之降低結合之有益突變的列表。胺基酸位置係在個別CDR情況中以Kabat編號給出。

**圖4**提供載體pYA206及pCW600中之D2E7之結構。

**圖5**提供人類TNF- $\alpha$ 對細胞表面表現之WT D2E7 Fab上之滴定曲線。

**圖6**提供結合至細胞表面表現之WT-D2E7 Fab之抗個體基因型(抗Id)的滴定曲線。

**圖7A-7B：**圖7A提供經TNF- $\alpha$ 染色之野生型D2E7的FACS分選概況。圖7B提供經TNF- $\alpha$ 染色之 $V_H$ 點突變庫的FACS分選概況。

**圖8A-8B**提供經1H11染色之野生型D2E7及 $V_H$ 點突變庫的FACS分選概況。

**圖9**提供沉默密碼子突變D2E7富含比(以位置計)。胺基酸位置係在個別CDR情況中給出。

**圖10**提供D2E7子庫之板圖。胺基酸位置係在個別CDR情況中以Kabat編號給出。

**圖11**提供D2E7突變體子庫及野生型對照之FACS概況。

**圖12**提供D2E7突變體子庫及野生型對照之FACS概況。

**圖13A-13D**提供D2E7重鏈可變區之空間填充模型。圖A、B及C分別以灰色顯示輕鏈CDR 1、2及3。圖D以灰色顯示抗Id 1H11之表位。如下文所繪示 $V_H$ 序列(SEQ ID NO:2)顯示加下劃線之CDR及對於與抗Id 1H11之結合重要之位置(以粗體、雙下劃線文本表示)。三個CDR中之每一者皆向該表位貢獻一或多個胺基酸。



EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD**DYAMH**WVRQAPG  
KGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE  
DTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS

圖14A-14D提供D2E7輕鏈可變區之空間填充模型。圖A、B及C分別以灰色顯示輕鏈CDR 1、2及3。圖D以灰色顯示抗Id 5A1及10F8之表位。如下文所繪示V<sub>L</sub>序列(SEQ ID NO:4)顯示加下劃線之CDR且以粗體、雙下劃線文本表示對於與抗Id 5A1及10F8之結合重要之位置。三個CDR中之每一者皆向該表位貢獻一或多個胺基酸。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI**RNYL**AWYQQKPGKAP  
KLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR  
APYTFGQGTKVEIK

圖15提供D2E7- V<sub>H</sub> CDR1-2突變體之單點FACS分析。

圖16提供D2E7代表性位置分析。

圖17提供平均1H11富含比(以位置計)。

圖18提供平均5A1富含比(以位置計)。

圖19提供平均10F8富含比(以位置計)。

圖20A-20B顯示抗TNF- $\alpha$ 抗體突變對與四個市售供體之血清試樣中之抗阿達木單抗抗體之結合的影響。胺基酸位置係以Kabat編號給出。VL-SS係指CDR-L1中具有取代G28S及A34S (Kabat編號)之VL，其對應於CDR-L1中之G5S + A11S組合。

圖21A-21B顯示與抗阿達木單抗抗體之結合之降低最大之抗TNF- $\alpha$ 變體抗體。VL-SS係指CDR-L1中具有取代G28S及A34S (Kabat編號)之VL，其對應於CDR-L1中之G5S + A11S組合。

圖22顯示具有多個胺基酸取代之變體的結合數據。VL-SS係指CDR-L1中具有取代G28S及A34S (Kabat編號)之VL，其對應於CDR-L1中之G5S + A11S組合。

**【實施方式】****識別具有降低免疫原性之抗體的方法**

本發明進一步提供允許對欲闡明之所關注抗體(參考抗體)感興趣之區域內之每一及每個胺基酸之免疫原性貢獻的系統。該等方法需要使參考抗體在一或多個區(例如，CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4中之一或多者)中經受全面誘變及評價突變對與抗個體基因型抗體(「抗Id」)之結合之效應。本文所述方法可識別上述具有降低免疫原性之抗TNF- $\alpha$ 抗體變體。

**庫設計及構築：**設計抗體庫，其含有在參考抗體之期望區或域中之每一可能位置處的每一可能單一胺基酸取代用於識別突變對與抗Id抗體之結合的效應(良好、差或中性)。隨後使用(例如)「隨機化NNK密碼子」構築抗體變體之庫以產生單一胺基酸變體，其中「N」係指任何鹼基(例如，A、C、G或T)且「K」係指G或T。NNK隨機化方案可編碼覆蓋所有20種天然胺基酸之32個不同密碼子。抗體之每一位置處之胺基酸殘基可突變為在相同位置處不同於野生型胺基酸之19種胺基酸中之任一者，從而在抗體中產生單一胺基酸點突變。最終結果係涵蓋具有一個因庫中之成員而異之殘基的多種抗體群組之抗體變體庫。基於靶向突變之胺基酸之數目，庫之總複雜性可介於約50-10,000個成員之間(例如，50、100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500或10,000個成員)，介於約1000-5000個成員之間，或為約1000個成員。與庫之大小及複雜性無關，本文所述方法容許同時篩選庫之所有成員並同時對其進行測序。

作為非限制性實例，為識別與參考抗體相比具有降低免疫原性之特定抗體變體，互補決定區(CDR)中之胺基酸殘基係用於突變之潛

在靶。B細胞表位之消除或減輕可產生具有降低免疫原性之抗體。通常，可考慮並識別約50至60個CDR胺基酸位置用於突變。合成DNA片段組可經設計並構築，其編碼野生型親代V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>及所有可能之單一胺基酸抗體變體。可使用上述隨機化NNK密碼子產生單一胺基酸抗體變體。因此，CDR內每一位置處之胺基酸殘基可突變，從而沿所選CDR區產生單一胺基酸點突變。最終結果係抗體變體庫，其係具有一個因庫中之成員而異之殘基的多種抗體群組。在此實例中，庫具有約1000-1300個成員，其中所選區中之50至60或65個CDR胺基酸位置中之每一者在任何給定位置處皆經總共20種不同胺基酸之19種天然胺基酸中之一者取代(即， $50 \times 20 = 1000$ ； $60 \times 20 = 1200$ ；或 $65 \times 20 = 1300$ )。

**抗體變體之表現：**在庫構築後，第二步驟係使抗體變體之庫表現用於藉由細胞表面展示分選。可使用基於展示之方法(例如噬菌體展示、酵母展示、細菌展示及核糖體展示)使變體之庫表現，且其較佳在哺乳動物細胞中表現以確保所變體適當摺疊並轉譯後修飾。

對於哺乳動物表現而言，用於在細胞表面上連接並展示四聚體免疫球蛋白分子之跨膜域可為能夠經由酶、化學或光解裂解移除之任何跨膜域。在一些實施例中，跨膜域側接由裂解酶鑑別並裂解之裂解位點。舉例而言，裂解酶可為脂肪酶、酯酶、磷酸酶、糖苷酶或羧肽酶。在一些實施例中，跨膜域包含具有經由經核酸酶(例如核糖核酸酶(RNase)或去氧核糖核酸酶(DNase))鑑別並裂解之序列的寡核苷酸或寡核苷酸類似物。在一些實施例中，跨膜域包含由蛋白酶鑑別並裂解之肽或肽類似物。

在一些實施例中，可使用mRNA剪接產生具有或無跨膜域之免疫球蛋白(例如，參見美國專利第7,947,495號，其全部內容皆以引用方式併入本文中)。

在其他實施例中，跨膜域側接由重組酶鑑別之重組酶鑑別位點。重組酶鑑別位點之實例包括(但不限於) *lox*位點、*att*位點、*dif*位點及*frt*位點。關於重組酶之綜述，參見(例如) Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotech.* 5:521-527；Landy, 1993, *Curr. Opin. Biotech.* 3:699-707；Sadowski, 1993, *FASEB* 7:760-767；及美國專利公開案第20040115814號。

用於本文所述組合物及方法中之跨膜域可源自I型、II型及III型膜蛋白(例如，參見Chesnut等人，1996, *J. Imm. Methods*, 193:17-27；Wahlberg等人，1997, *J. Cell Biol.*, 137:555-562；Liao, 2001, *Biotech. 及 Bioeng.*, 73:313-323；及美國專利第5,264,357號及第6,686,168號)。本文所述跨膜域可用於產生包含全長抗體(例如，IgG)或其片段之免疫球蛋白-跨膜域融合蛋白，其連接至使融合蛋白表現之細胞表面並在其上展示。

尤其可用於本文所述組合物及方法中之跨膜域包括(但不限於)血小板源生長因子受體(PDGF-R)跨膜域(例如，參見Chesnut等人，1996, *J. Imm. Methods*, 193:17-27)、B7-1跨膜域(例如，參見Chou等人，1999, *Biotech. 及 Bioeng.*, 65(2):160-169)及無唾液酸糖蛋白受體(ASGPR)跨膜域(例如，參見Liao, 2001, *Biotech. 及 Bioeng.*, 73:313-323)。在一些實施例中，細胞表面連接域係指GPI信號序列，其引導免疫球蛋白經由糖基化磷脂醯肌醇(GPI)連接體錨固至細胞表面(例如，參見Medof等人，1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:2007-2011；及美國專利第5,109,133號及第5,264,357號)。在某些情形下，GPI信號序列係來自人類促衰變因子(DAF)。在其他實施例中，細胞表面跨膜域錨係來自免疫球蛋白蛋白質。

哺乳動物展示載體可用於展示完整抗體，但亦可展示抗體片段，例如Fc、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>及單鏈Fv。重鏈及輕鏈二者皆可藉助使用

內部核糖體進入位點(IRES)元件編碼為單一轉錄物，該元件將編碼可變及恆定輕鏈之多核苷酸序列連接至編碼可變及恆定重鏈之多核苷酸。

在實施例中，哺乳動物展示載體包含稠合至重鏈恆定區之C末端之可移除GPI錨，以有利於具有期望結合特性及生物活性之抗體分離。GPI錨在存在時使得能夠在哺乳動物宿主細胞表面上展示免疫球蛋白分子。藉由用適當限制性內切核酸酶消化移除GPI錨使得可自膜結合分子轉化為可溶性免疫球蛋白分子。

適宜哺乳動物宿主細胞之實例包括(但不限於) HeLa細胞(HeLa S3細胞，ATCC CCL2.2)、Jurkat細胞、Raji細胞、Daudi細胞、人類胚腎細胞(293-HEK；ATCC 293c18，ATCC CRL 1573)、非洲綠猴腎細胞(CV-1；Vero；ATCC CRL 1587)、SV40轉形之猴腎細胞(COS-1；ATCC CRL 1650)、犬類腎細胞(MDCK；ATCC CCL 34)、幼倉鼠腎細胞(BHK-21，BHK-570；ATCC CRL 8544，ATCC CRL 10314)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO-K1；ATCC CCL61；CHO DG44 (Chasin等人，1986、Som Cell Molec Genet、12、555))及其他齧齒類動物細胞系(例如NSO、SP2/O、GH1 (ATCC CCL82)、H-4-II-E (ATCC CRL 1548)及NIH-3T3 (ATCC CRL 1658))。

在一個實施例中，可使用美國專利第7,947,495號(其全部內容皆以引用方式併入本文中)中所述之方法及載體。哺乳動物細胞表面展示系統包括自複製載體及哺乳動物細胞。自複製哺乳動物載體通常包含：(1) 自複製複製起點；(2) 至少一個真核啟動子；(3) 固定或可移除跨膜域；(4) 輕鏈恆定區；(5) 重鏈恆定區；(6) 用於插入輕鏈及重鏈可變區之限制位點；(7) 內部核糖體進入位點(IRES)；及(8) 至少一個可選標記。另外，載體可包含原核複製起點、轉錄終止子、多腺苷酸化信號及/或前導序列、以及在真核宿主細胞中表現所需之

其他序列。宿主細胞在轉形後，在容許抗體表現之條件下對其進行培育。可自如所述細胞容易地回收所得質粒(例如，參見Hirt, 1967, J. Mol. Biol., 26, 365-369)。

除上述技術外，酵母表面展示庫可用於變體抗體庫之細胞表面展示。酵母表面展示技術(由Boder及Wittrup, 2000, Methods in Enzymology 328:430-444 (其全部內容以引用方式併入本文中)綜述)容許抗體庫在酵母表面上以可用於與細胞分選方法中之分析用標記分子相互作用之形式表現。在一個實施例中，變體表現為具有所有或部分酵母AGA2蛋白之融合蛋白(其在酵母細胞壁表面上展示)，用於根據下文所述方法進行方法。例如，參見Boder等人，1997, Nat. Biotechnol. 15:553-557及Feldhaus等人，2003, Nat. Biotechnol. 21:163-170。

亦可使用抗體變體之噬菌體展示。抗體鏈可表現為具有噬菌體外表面之噬菌體外殼蛋白的融合蛋白。其後，展示包裝可經篩選用於展示與靶結合之抗體。在一個實施例中，抗體變體以單價方式自絲狀噬菌體顆粒展示，其呈與包裝於每一顆粒內並在噬菌體外部表現之M13之基因III產物之融合體形式。抗體噬菌體展示方法已為彼等熟習此項技術者已知且闡述於(例如) Hoogenboom, 「Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications」, Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien及Aitken編輯，Human Press, Totowa, N.J.) 中。

在另一實施例中，使用核糖體展示技術(參見Hanes等人，2000, Meth. Enzymol. 328: 403-430；Pluckthun等人，2000, Adv. Prot. Chem. 55:367-403；Lipovsek及Pluckthun, 2004, J. Immunological Methods 290:51-67)使變體抗體表現。核糖體展示技術在基因型(例如RNA)與

編碼表現型(例如變體抗體)之間納入活體外轉譯及共價或非共價連接，以針對與抗Id抗體之結合降低之變體抗體進行選擇。庫係藉由合成不同序列之合成DNA池來製得，該等不同序列隨後經轉錄以產生mRNAs池。活體外轉譯用於產生展示之編碼多肽或蛋白質，且使用固定結合配偶體選擇期望結合相互作用。編碼結合實體之mRNA可用於製造cDNA，其隨後可經擴增且可重複該過程以富含編碼具有期望特性之變體抗體之基因的群體。可藉由選殖個別編碼序列及DNA測序識別所選蛋白。

亦可使用細菌展示系統使變體抗體表現。例如，參見Skerra等人，1988, *Science* 240:1038-1041；Better等人，1988, *Science* 240:1041-1043；Harvey等人，2004, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(25):9193-9198；及Mazor等人，2007, *Nat. Biotechnol.* 25(5):563-565。

庫分選：可使用基於親和性之富含分析分選展示所表現抗體變體之宿主細胞。變體抗體可基於其(1) 與抗Id之結合之損失、(2) 視情況與靶抗原之結合之保留及(3)視情況表現程度進行分選。抗Id係針對其他抗體之可變區的抗體。出於此原因，抗Id之抗原結合位點可類似於由抗Id所鑑別之抗體結合的靶分子。製造抗Id之方法已為業內所知，且通常需要使用所關注抗體(例如，參考抗體)作為免疫原以藉由傳統方式(例如彼等下文針對參考抗體所述者)產生抗體。抗Id抗體可人類或動物起源之單株抗體。

適用於分選抗體變體之分析之實例包括(但不限於)螢光活化細胞分選(FACS)、磁性珠粒分選、Trellis Bioscience公司(South San Francisco, CA)之CellSpot™抗體篩選技術及/或Genetix有限公司(Hampshire, United Kingdom)之ClonePix FL哺乳動物細胞純系篩選設備。

對於FACS分選，將細胞與螢光標記之抗體(例如，在變體之非誘變部分中檢測到共同表位的抗Id或抗體)或靶抗原以接近參考抗體親和性之解離常數( $K_D$ )之濃度一起培育，以最顯著地區別參考抗體與具有類似親和性之變體。以使具有所關注性質之變體在有關子群中之頻率增加或減小之方式將經染色細胞分選成一或多個子群。

可使用上述方法中之任一者實施抗Id結合之分選。通常，將表現抗體變體之細胞與抗Id一起培育並由所結合抗Id之量進行分選。可自表現參考抗體之細胞獲得基線結合值，且可藉由將展示與抗Id之結合降低之細胞分選成具有高於或低於基線值之結合抗Id的子群來識別該等細胞。

視情況，亦基於表現程度分選細胞表現抗體變體。(例如) FACS期間結合至表現抗體變體之細胞之螢光抗體或抗原的總量與結合親和性及所展示變體抗體之總量二者有關。所展示變體抗體之量可因純系而異。因此，在某些情況下，可使用FACS使用針對免疫球蛋白之螢光標記抗體(例如抗IgG抗體)分選表現所關注變體抗體之細胞(例如經由跨膜域錨連接至細胞表面之全長IgG) (除分選抗Id結合外)。用於檢測不同性質之不同抗體(例如用於檢測表現程度之抗Id及抗IgG抗體)通常經具有不同激發及/或發射譜之螢光團標記，藉此提供雙色檢測系統。

亦可針對靶結合分選細胞。通常，期望選擇保留與靶之結合的抗體變體(例如，與參考抗體相比與靶分子具有近似相等或更大結合之變體)。可藉由FACS將經抗Id及靶分子共染色之庫分選成兩個子群：第一群體高於靶結合之特定臨限值，且第二群體雙重分選靶結合以及降低之抗個體基因型結合。用於檢測不同性質之不同分子(例如抗Id及靶分子)通常經具有不同激發及/或發射譜之螢光團標記，藉此提供雙色檢測系統。



在在在一些實施例中，可針對抗Id結合、表現程度及靶結合分選細胞。在該等實施例中，可使用利用三個不同標記之三色檢測系統。

在使用雙重或三重染色以針對抗Id結合及表現程度及/或靶結合同時分選時，通常用具有不同激發及/或發射譜之螢光團標記經標記靶及經標記抗體，藉此提供雙色或三色檢測系統。亦可連續分選成不同群體。舉例而言，可基於靶結合及表現程度將分選成與抗Id之結合降低之子群的細胞分選成其他子群，基於分選之靶結合及表現程度同時或依序發生。在其他實施例中，針對抗個體基因型抗體結合分選期間識別之變體(及表現其之宿主細胞)的特徵在於使用下述獨立性驗證方法進行靶結合。

**分選群體之分析：**在分選成子群後，可藉由對編碼變體之質粒進行測序來測定各抗體變體在各子群中之頻率。本揭示之較佳DNA測序方法係「大規模平行測序」或「大規模平行焦磷酸測序」(參見例如美國專利第6,787,308號、第6,833,246號、第6,897,023號、第6,956,11號、第7,057,026號、第7,115,400號、第7,211,390號及第7,232,656號)。此方法容許快速且廉價地對DNA進行測序且加速具有期望活性或特性之特定抗體變體之識別。

在測序後，可實施序列之統計分析以識別期望變體。該等分析可包括原始DNA序列之電腦分析。原始DNA序列可轉譯成蛋白質序列，與參考抗體比對及比較以識別突變。可針對類別之類型(例如降低免疫原性，及增加、降低或中性表現，或對靶分子之親和性)將各位置觀察到之各胺基酸之頻率表列並與參考抗體比較。具有期望活性之變體(例如降低免疫原性、保留表現及/或保留與靶分子結合者)將富含於所選群體中，同時在所選群體中將缺乏具有不期望活性之變體。

可針對各變體計算富含比(ER)，其提供與其他變體及/或參考抗體相比群體中該變體之富含或缺乏程度的量度。在細胞係基於(a) 表

現程度高於特定臨限值及(b)與抗個體基因型之低結合分選(「分選」群體)的實施例中，一特定位置發現突變之次數係針對該位置測序且以每1000個序列之頻率表現之次數標準化。隨後用分選群體中突變之頻率除以所表現群體中之頻率以提供富含比(ER)，其指示與所表現群體相比分選群體中富含或缺乏突變及其程度。分選群體中富含之突變降低與抗個體基因型之結合，而缺乏之突變增加與抗個體基因型之結合。類似地，可針對各分選變體對靶之增加、降低或類似(中性)親和性計算富含比。

在僅針對與抗個體基因型之降低結合分選細胞(例如其中並不同時針對表現程度分選細胞)的實施例中，富含比可藉由將具有低於自表現參考抗體之細胞測定之基線值之結合抗個體基因型之子群中的突變頻率除以具有基線值或以上之結合抗個體基因型之子群中的突變頻率來測定。

**個別變體之驗證：**可使用多種技術分析個別表現之變體多肽之結合特性儀確認其在庫背景中之特徵。該等技術包括BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa及KinExA。BIAcore分析使用表面電漿共振(SPR) (一種容許檢測未經標記之相互作用物之光學現象)測定結合且其可用於測定個別抗體變體之結合親和性(例如，美國專利申請案第2008/0274114號；及Che等人，2009, J. Pharm. and Biomed. Analysis 50(2):183-188)。可使用AlphaLISA測定個別變體與靶分子之結合親和性(例如，參見Ullman等人，1996, Clinical Chemistry, 42(9):1518-1526；及Hideharu等人，2007, Cancer Science 98(8):1275-1280)。KinExA (動力學排除分析)量測受體、配體(L)及LR複合物之混合物中之未複合受體(R)分子之濃度。藉由將溶液相混合物暴露於固相固定之L極短時間段來量測未複合R之濃度。溶液相混合物與固相固定L之間之「接觸時間」保持足夠短以使LR複合物之解離不明顯。在動力

學上排除LR複合物明顯解離之可能性時，僅未複合(「游離」) R可結合至固相。結合至固相之游離R之量(藉由自次要標記之螢光發射量測)與溶液相試樣中之游離R之濃度成正比。亦可使用KinExA測定個別變體與靶分子之結合親和性(例如，參見美國專利申請案第2008/0274114 號；及 Darling 等人，2004, ASSAY and Drug Development Technologies 2:647-657)。

### 變體抗TNF- $\alpha$ 抗體

上述方法已適於抗TNF- $\alpha$ 抗體D2E7 (亦稱作阿達木單抗)，以識別與D2E7相比對抗個體基因型抗體之親和性降低的變體)。展示對抗個體基因型抗體之親和性降低之變體稱作「降低免疫原性」變體。

在某些態樣中，本發明提供與D2E7相比具有降低免疫原性之抗TNF- $\alpha$ 抗體。與D2E7之CDR相比，本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體之CDR中通常具有一或多個胺基酸取代，其中與D2E7相比，該至少一或多個取代降低抗體之免疫原性。在某些實施例中，降低免疫原性係由消除或減少一或多個B細胞表位產生。

D2E7之重鏈及輕鏈可變區之胺基酸序列分別係由SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:4代表，且分別由SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:3編碼。重鏈及輕鏈可變區之胺基酸序列亦繪示於圖1A中。D2E7之CDR及其相應識別符之胺基酸序列提供於圖1B中。如美國專利第6,090,382號中公開之D2E7之重鏈及輕鏈可變區之核苷酸序列示於圖1C中。編碼SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4之任何其他核苷酸序列可替代已公開序列用於本發明之組合物及方法中。

在某些態樣中，具有降低免疫原性之本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體具有相對於D2E7相當或改良之與TNF- $\alpha$ 之結合。可藉由(例如)部分5.7中所述之驗證方法測試親和性。

產生具有消除或減少B細胞表位且與D2E7相比具有較低免疫原性

之抗TNF- $\alpha$ 抗體的例示性取代列舉於圖2及3中。適宜取代包括CDR-L1中之G5F、CDR-L1中之G5I、CDR-L1中之G5V、CDR-L1中之G5W、CDR-L1中之G5Y、CDR-L1中之R7I、CDR-L1中之R7T、CDR-L1中之R7V、CDR-L1中之N8A、CDR-L1中之N8D、CDR-L1中之N8E、CDR-L1中之N8L、CDR-L1中之N8M、CDR-L1中之N8Q、CDR-L1中之N8R、CDR-L2中之A1I、CDR-L2中之A1T、CDR-L2中之A1V、CDR-L2中之T4D、CDR-L3中之R2G、CDR-L3中之N4F、CDR-L3中之N4M、CDR-L3中之N4W、CDR-L3中之N4Y、CDR-L3中之R5L、CDR-L3中之R5N、CDR-L3中之R5W、CDR-L3中之R5Y、CDR-H1中之D1S、CDR-H1中之Y2A、CDR-H1中之Y2C、CDR-H1中之Y2K、CDR-H1中之Y2M、CDR-H1中之Y2R、CDR-H1中之Y2S、CDR-H1中之Y2V、CDR-H1中之H5C、CDR-H1中之H5D、CDR-H1中之H5E、CDR-H1中之H5S、CDR-H1中之H5T、CDR-H2中之T3A、CDR-H2中之T3G、CDR-H2中之W4A、CDR-H2中之W4F、CDR-H2中之W4H、CDR-H2中之W4L、CDR-H2中之W4M、CDR-H2中之W4V、CDR-H2中之N5G、CDR-H2中之S6D、CDR-H2中之S6L、CDR-H2中之I9K、CDR-H2中之D10L、CDR-H2中之Y11A、CDR-H2中之Y11C、CDR-H2中之Y11E、CDR-H2中之Y11F、CDR-H2中之Y11G、CDR-H2中之Y11H、CDR-H2中之Y11I、CDR-H2中之Y11K、CDR-H2中之Y11L、CDR-H2中之Y11M、CDR-H2中之Y11N、CDR-H2中之Y11Q、CDR-H2中之Y11R、CDR-H2中之Y11S、CDR-H2中之Y11V、CDR-H2中之Y11W、CDR-H2中之A12Y、CDR-H2中之D13N、CDR-H2中之V15D、CDR-H2中之V15L、CDR-H2中之V15M、CDR-H2中之V15Q、CDR-H2中之V15T、CDR-H2中之E16F、CDR-H2中之E16H、CDR-H2中之E16K、CDR-H2中之E16T、CDR-H2中之E16W、CDR-H2中之G17A、CDR-H2中之G17C、CDR-H2中之G17E、CDR-H2中之

G17H、CDR-H2中之G17I、CDR-H2中之G17K、CDR-H2中之G17L、CDR-H2中之G17M、CDR-H2中之G17P、CDR-H2中之G17Q、CDR-H2中之G17R、CDR-H2中之G17S、CDR-H2中之G17T、CDR-H2中之G17Y、CDR-H3中之V1G、CDR-H3中之V1R、CDR-H3中之V1W、CDR-H3中之L4T、CDR-H3中之L4V、CDR-H3中之T6V、CDR-H3中之S9K、CDR-H3中之S9W、CDR-H3中之S9Y及CDR-H3中之D11V。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可僅包含圖2及3中所列舉取代中任一者或其組合及視情況一或多個額外取代。產生具有消除或減少T細胞表位且與D2E7相比具有較低免疫原性之抗體的例示性CDR-L1取代列舉於美國公開案第2010/0266613 A1號及PCT國際公開案第2010/121140之表11中，該等案件之全部內容皆以引用方式併入本文中。CDR-L1中之適宜取代及取代之組合包括R7Q；A11S；R7Q + A11S；N8T；N8T + A11S；I6T；A11G；I6T + A11G；Q4G；Q4G + A11S；Q4G + A11G；Q4H；Q4H + A11S；Q4R；Q4R + A11S；G5S；G5S + A11S；N8S + A11S；I6T + A11S；及N8T + A11G。

與D2E7相比產生與TNF- $\alpha$ 之親和性增加之抗體的例示性取代列舉於美國公開案第2010/0266613 A1號及PCT國際公開案第2010/121140號之表12及25中。適宜取代包括CDR-L2中之S3K、CDR-L2中之S3R、CDR-L2中之S3N、CDR-L2中之T4H、QCDR-L2中之T4、CDR-L2中之T4V、CDR-L2中之T4F、CDR-L2中之T4W、CDR-L2中之T4Y；CDR-L2中之L5R、CDR-L2中之L5K、CDR-L2中之Q6K、CDR-L2中之Q6R、CDR-H1中之D1G、CDR-H1中之Y2H、CDR-H1中之A3G及CDR-H2中之T3N。

本揭示內容之抗體可包含美國公開案第2010/0266613 A1號及PCT國際公開案第2010/121140號之表11-25中所述之一或多個取代。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可為單株、遺傳改造及原本經修飾形

式之抗體(包括(但不限於)嵌合抗體、人類化抗體、異源偶聯物抗體(例如，雙特異性抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體))及抗體之抗原結合片段(包括(例如) Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv、rIgG及scFv片段)。此外，除非另外指明，否則術語「單株抗體」(mAb)意欲包括能夠特異性結合至蛋白質之完整分子以及抗體片段(例如，Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及Fv片段)。

Fab及F(ab')<sub>2</sub>片段無完整抗體之Fc段，與完整抗體相比，自動物或植物之循環更快速清除，且可具有較少非特異性組織結合(Wahl等人，1983, J. Nucl. Med. 24:316)。Fab片段含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(C<sub>H</sub>1)。Fab'片段因在重鏈C<sub>H</sub>1域之羧基末端增加了若干殘基而與Fab片段有所不同，該等殘基包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱氨酸。F(ab')<sub>2</sub>片段係藉由在F(ab')<sub>2</sub>胃蛋白酶消化產物之鉸鏈半胱氨酸處使二硫鍵裂解來產生。「Fv」片段係含有完全靶鑑別及結合位點之最小抗體片段。此區係由一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域以緊密非共價締合組成(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二聚物)。「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含單一多肽鏈中之抗體之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>域，且以在本揭示內容之範疇內。本揭示內容涵蓋之其他抗體包括「單一域抗體」，其包括呈現與靶分子之足夠親和性的單一V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>域。在具體實施例中，單一域抗體係駱駝科抗體(例如，參見Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231 :25-38)。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體較佳係單株抗體。本文所用術語「單株抗體」並不限於經由雜交瘤技術產生之抗體。術語「單株抗體」係指源自單一純系(包括任何真核、原核或噬菌體純系)之抗體而並非係指產生其之方法。可結合本發明使用之單株抗體可使用業內已知之多種技術(包括使用雜交瘤、重組及噬菌體展示技術或其組合)製得。本揭示內容之抗體包括嵌合、靈長類化、人類化或人類抗體。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可為雙特異性抗體。雙特異性抗體係對至少兩種不同抗原具有結合特異性之單株抗體，經常為人類或人類化抗體。在本發明中，結合特異性之一可針對任何兩種抗原，例如細胞表面蛋白、受體、受體亞單位、組織特異性抗原、病毒源蛋白、病毒編碼之包膜蛋白、細菌源蛋白或細菌表面蛋白等。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體包括衍生化抗體。舉例而言，但並不加以限制，衍生化抗體通常藉由糖基化、乙醯基化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、藉由已知保護/封端基團、蛋白水解裂解、連接至細胞配體或其他蛋白質衍生化等加以修飾。多種化學修飾中之任一者皆可藉由已知技術(包括(但不限於)衣黴素(tunicamycin)之特定化學裂解、乙醯基化、甲醯化、代謝合成等)來實施。另外，衍生物可使用(例如)ambrx技術含有一或多個非天然胺基酸(例如，參見 Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2)。

在本揭示內容之又一實施例中，抗TNF- $\alpha$ 抗體可為序列相對於相應野生型序列經修飾以改變至少一個恆定區調介之生物效應子功能的抗體。舉例而言，在一些實施例中，本揭示內容之參考抗體及/或抗體變體可經修飾以相對於未經修飾之抗體降低至少一個恆定區調介之生物效應子功能(例如，與Fc受體(Fc $\gamma$ R)之結合降低)。Fc $\gamma$ R結合可藉由使Fc $\gamma$ R相互作用所需之特定區處之抗體之免疫球蛋白恆定區區段突變來降低(例如，參見 Canfield 及 Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491；及Lund等人，1991, J. Immunol. 147:2657-2662)。降低抗體之Fc $\gamma$ R結合能力亦可降低其他效應子功能，該等效應子功能依賴於Fc $\gamma$ R相互作用，例如調理作用、吞噬作用及抗原依賴性細胞毒性(「ADCC」)。

在本揭示內容之其他實施例中，參考抗體及/或抗體變體可經修飾以相對於未經修飾之抗體獲得或改良至少一個恆定區調介之生物效

應子功能，以(例如)增強Fc $\gamma$ R相互作用(例如，參見US 2006/0134709)。舉例而言，本揭示內容之參考抗體及/或抗體變體可具有較相應野生型恆定區以更大親和性結合Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB及/或Fc $\gamma$ RIIIA的恆定區。

因此，本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體的生物活性可具有變化，其引起增加或降低調理作用、吞噬作用或ADCC。該等變化已為業內所知。舉例而言，降低ADCC活性之抗體之修飾闡述於美國專利第5,834,597號中。例示性ADCC降低變體對應於「突變體3」(示於美國專利第5,834,597號之圖4中)，其中殘基236缺失且殘基234、235及237(使用EU編號)經丙胺酸取代。

在一些實施例中，本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體具有低含量岩藻糖或無岩藻糖。無岩藻糖之抗體與增強之ADCC活性相關，尤其低劑量之抗體。參見Shields等人，2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740；Shinkawa等人，2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73。製備無岩藻糖之抗體之方法包括在大鼠骨髓瘤YB2/0細胞中生長(ATCC CRL 1662)。YB2/0細胞表現低含量之FUT8 mRNA，其編碼 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基岩轉移酶，即多肽之岩藻糖基化所需之酶。

在又一態樣中，抗TNF- $\alpha$ 抗體可為藉由(例如)使參與FcRn相互作用之特定區處之免疫球蛋白恆定區區段突變經修飾以增加或降低其與新生兒Fc受體(FcRn)之結合親和性的抗體(例如，參見WO 2005/123780)。在特定實施例中，IgG類之參考抗體及/或抗體變體經突變，以使重鏈恆定區之胺基酸殘基250、314及428中之至少一者在250及428位處、或在250及314位處、或在314及428位處、或在250、314及428位處單獨或以其任何組合經取代，其中250及428位為特定組合。對於250位，取代胺基酸殘基可為除蘇胺酸外之任何胺基酸殘基，包括(但不限於)丙胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、苯丙胺



酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、離胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺、脯胺酸、麩醯胺酸、精胺酸、絲胺酸、纈胺酸、色胺酸或酪胺酸。對於314位，取代胺基酸殘基可為除白胺酸外之任何胺基酸殘基，包括(但不限於)丙胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺、脯胺酸、麩醯胺酸、精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、色胺酸或酪胺酸。對於428位，取代胺基酸殘基可為除甲硫胺酸外之任何胺基酸殘基，包括(但不限於)丙胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、離胺酸、白胺酸、天冬醯胺、脯胺酸、麩醯胺酸、精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、色胺酸或酪胺酸。該等突變增加抗體與FcRn之結合，此保護抗體免於降解並增加其半衰期。

在再一些態樣中，參考抗體及/或抗體變體具有一或多個插入一或多個其超變區中之胺基酸，如(例如) Jung及Plückthun, 1997, Protein Engineering 10:9, 959-966；Yazaki等人，2004, Protein Eng. Des. Sel. 17(5):481-9. Epub 2004 Aug 17；及美國專利申請案第2007/0280931號中所述。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體包括抗體偶聯物，其藉由(例如)將任何類型之分子共價附接至抗體以使共價附接不干擾與TNF- $\alpha$ 之結合而經修飾。

在某些態樣中，本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可偶聯至效應子部分或標記。本文所用術語「效應子部分」包括(例如)抗惡性腫瘤藥劑、藥物、毒素、生物活性蛋白質(例如酶)、其他抗體或抗體片段、合成或天然聚合物、核酸(例如，DNA及RNA)、放射性核素(具體而言放射性碘化物)、放射性同位素、螯合金屬、奈米粒子及報告基團(例如螢光化合物或可藉由NMR或ESR光譜檢測之化合物)。

在一個實例中，抗TNF- $\alpha$ 抗體可偶聯至效應子部分，例如細胞毒性劑、放射性核素或藥物部分，以修飾給定生物反應。效應子部分可為蛋白質或多肽，例如(但不限於)毒素(例如相思豆毒素，蓖麻毒素A，假單胞菌(*Pseudomonas*) 外毒素或白喉(*Diphtheria*)毒素)、信號傳導分子(例如 $\alpha$ -干擾素、 $\beta$ -干擾素、神經生長因子、血小板源生長因子或組織纖維溶酶原活化劑)、血栓形成劑或抗血管生成劑(例如，血管抑素(angiostatin)或內皮抑素(endostatin))或生物反應調節劑(例如細胞因子或生長因子(例如，介白素-1 (IL-1)、介白素-2 (IL-2)、介白素-6 (IL-6)、顆粒球巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球集落刺激因子(G-CSF)或神經生長因子(NGF)))。

在另一實例中，效應子部分可為細胞毒素或細胞毒性劑。細胞毒素及細胞毒性劑之實例包括紫杉醇(taxol)、細胞鬆弛素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠、依米丁(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、替托泊苷(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicine)、多柔比星(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光輝黴素(mithramycin)、放線菌素D、1-去氫睪甾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)及其類似物或同系物。

效應子部分包括(但不限於)抗代謝物類藥物(例如胺甲蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-鳥嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺(decarbazine))、烷基化劑(例如，雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、塞替哌(thiotepa)、氯芥苯丁酸(chlorambucil)、美法倫(melphalan)、卡莫司汀(carmustine) (BSNU)及洛莫司汀

(lomustine) (CCNU)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、鏈脲黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C5及順二氯二胺鉑(cis-dichlorodiamine platinum) (II) (DDP) 順鉑)、蔥環抗生素(anthracycline) (例如，柔紅黴素(先前稱作道諾黴素(daunomycin))及多柔比星)、抗生素(例如，放線菌素D (dactinomycin) (先前稱作放線菌素(actinomycin))、博來黴素(bleomycin)、光輝黴素、氨茴黴素(anthramycin) (AMC)、卡奇黴素(calicheamicin)或多卡米星(duocarmycin))及抗有絲分裂劑(例如，長春新鹼及長春鹼)。

其他效應子部分可包括放射性核素(例如但不限於 $^{111}\text{In}$ 及 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、鉍 $^{213}$ 、釷 $^{252}$ 、銥 $^{192}$ 及鎢 $^{187}$ /銻 $^{188}$ )及藥物(例如但不限於烷基磷酸膽鹼、拓撲異構酶I抑制劑、類紫杉醇及蘇拉明(suramin))。

偶聯該等效應子部分與抗體之技術已為業內所熟知(例如，參見Hellstrom等人，Controlled Drug Delivery，第2版，第623-53頁(Robinson等人編輯，1987))；Thorpe等人，1982, Immunol. Rev. 62:119-58及Dubowchik等人，1999, Pharmacology and Therapeutics 83:67-123)。

在某些態樣中，抗TNF- $\alpha$ 抗體偶聯至小分子毒素。在某些例示性實施例中，本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體偶聯至多拉斯他汀(dolastatin)或多拉斯他汀肽類似物或衍生物，例如奧裏斯他汀(auristatin) (美國專利第5,635,483號及第5,780,588號)。多拉斯他汀或奧裏斯他汀藥物部分可經由其N (胺基)末端或C (羧基)末端附接至抗體(WO 02/088172)。例示性奧裏斯他汀實施例包括N-末端連接之單甲基奧裏斯他汀藥物部分DE及DF，如美國專利第7,498,298號(其全部內容皆以引用方式併入本文中)中所揭示(例如，揭示連接體及製備單甲基巰胺酸化化合物(例如偶聯至連接體之MMAE及MMAF)的方法)。

在其他例示性實施例中，小分子毒素包括(但不限於)卡奇黴素、美坦生(maytansine) (美國專利第5,208,020號)、單端孢黴烯(trichothene)及CC1065。在本揭示內容之一個實施例中，抗體偶聯至一或多個美坦生分子(例如，約1至約10個美坦生分子/抗體分子)。美坦生可(例如)轉化為May-SS-Me，其可還原為May-SH3並與抗體反應(Chari等人，1992, *Cancer Research* 52: 127-131)以產生類美坦生(maytansinoid)-抗體或類美坦生-Fc融合偶聯物。亦可使用之卡奇黴素之結構類似物包括(但不限於)  $\gamma_1^1$ 、 $\gamma_3^1$ 、N-乙醯基- $\gamma_1^1$ 、PSAG及 $\theta_1^1$  (Hinman等人，1993, *Cancer Research* 53:3336-3342；Lode等人，1998, *Cancer Research* 58:2925-2928；美國專利第5,714,586號；美國專利第5,712,374號；美國專利第5,264,586號；美國專利第5,773,001號)。

本揭示內容之抗體亦可偶聯至脂質體用於靶向遞送(例如，參見Park等人，1997, *Adv. Pharmacol.* 40:399-435；Marty及Schwendener, 2004, *Methods in Molecular Medicine* 109:389-401)。

詞語「標記」在本文中使用时係指可直接或間接偶聯至本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體的可檢測化合物或組合物。該標記自身為可檢測(例如，放射性同位素標記或螢光標記)或在酶標記情況下可催化可檢測受質化合物或組合物之化學變化。有用之螢光部分包括(但不限於)螢光素、螢光素異硫氰酸酯、羅丹明(rhodamine)、5-二甲基胺-1-萘磺醯氯、藻紅素及諸如此類。有用之酶標記包括(但不限於)鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、葡萄糖氧化物酶及諸如此類。

### 核酸及表現系統

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可藉由在宿主細胞中重組表現免疫球蛋白輕鏈及重鏈基因來製得。為了以重組方式表現抗體，用一或多個攜帶編碼該抗體之免疫球蛋白輕鏈及重鏈之DNA片段的重組表現載體

轉染宿主細胞，以使得該等輕鏈及重鏈在該宿主細胞中表現並視情況分泌至培養宿主細胞之培養基中，可自該培養基回收抗體。使用標準重組DNA方法來獲得抗體重鏈及輕鏈基因，將該等基因納入重組表現載體中並將該等載體引入宿主細胞中，例如彼等闡述於以下文獻中者：Molecular Cloning ; A Laboratory Manual，第2版(Sambrook、Fritsch及Maniatis (編輯), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M.等人編輯，Greene Publishing Associates, 1989)及美國專利第4,816,397號。

可使本揭示內容之抗體在原核或真核宿主細胞中表現。在某些實施例中，抗體之表現係在真核細胞(例如，哺乳動物宿主細胞)中表現，以最佳分泌經適當摺疊之免疫活性抗體。用於表現本揭示內容之重組抗體之例示性哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)(包括DHFR<sup>-</sup> CHO細胞，其闡述於Urlaub及Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中，其與DHFR可選標記(例如，如Kaufman及Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621中所述)一起使用)、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞、293細胞及SP2/0細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由將宿主細胞培養一段時間來產生抗體，該段時間足以使抗體在宿主細胞中表現或使抗體分泌至生長宿主細胞之培養基中。

亦可使用宿主細胞來產生完整抗體之部分，例如Fab片段或scFv分子。亦可使用重組DNA技術移除不必結合至TNF- $\alpha$ 之編碼輕鏈及重鏈中之一者或二者之DNA的一些或所有。本揭示內容之抗體亦涵蓋自該等經截短DNA分子表現之分子。

對於本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體之重組表現，可用本揭示內容之兩個表現載體共轉染宿主細胞，第一載體編碼源自重鏈之多肽且第二載體編碼源自輕鏈之多肽。通常，兩個載體各自含有單獨可選標記。

或者，可使用編碼重鏈及輕鏈兩種多肽之單一載體。

在產生編碼D2E7或具有與D2E7之CDR序列相關之CDR序列的抗TNF- $\alpha$ 抗體之一或多個部分的核酸後，可向編碼序列中引入其他改變或突變，以(例如)產生編碼具有不同CDR序列之抗體、與Fc受體之親和性降低之抗體或不同亞類之抗體的核酸。

在藉由重組表現產生本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體後，藉由業內已知之任何方法對其進行回收並純化，對於純化免疫球蛋白分子藉由(例如)層析(例如，離子交換、親和性，具體而言在蛋白質A或蛋白質G選擇後針對TNF- $\alpha$ 藉由親和性，及篩分管柱層析)、離心、差異溶解性，或藉由任何其他標準技術用於純化蛋白質。此外，本發明之抗TNF- $\alpha$ 抗體或其片段可稠合至本文所述或原本業內已知促進純化之異源多肽序列。

抗TNF- $\alpha$ 抗體在分離後可(若需要)藉由(例如)高效液相層析(例如，參見Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work及Burdon編輯，Elsevier, 1980))或藉由在Superdex™ 75管柱上凝膠過濾層析(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)得以進一步純化。

## 治療用途

本發明之TNF- $\alpha$ 抗體可用於治療各種免疫及自體免疫病狀以及發炎疾病之病症或症狀。

可經本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體治療之TNF- $\alpha$ 相關之病狀及疾病包括(但不限於)以下：

- 急性及慢性免疫及自體免疫病狀，例如全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、甲狀腺炎、移植物抗宿主病、硬皮病、糖尿病、葛雷夫斯氏病(Grave's disease)及諸如此類；

- 感染，包括(但不限於)敗血症症候群、惡病質、因急性或慢性

細菌感染引起之循環衰竭及休克、急性及慢性寄生蟲及/或細菌、病毒或真菌感染病，例如AIDS (包括後遺症，例如惡病質、自體免疫病症、AIDS癡呆綜合症及感染)；

■ 發炎疾病，例如慢性發炎病狀及血管發炎病狀，包括慢性發炎病狀(例如結節病、慢性發炎腸病、潰瘍性結腸炎及克羅恩氏病狀(Crohn's pathology))及血管發炎病狀(例如但不限於，彌漫性血管內凝血、動脈粥樣硬化及川崎氏病狀(Kawasaki's pathology))；

■ 神經變性疾病，包括(但不限於)脫髓鞘疾病，例如多發性硬化症及急性橫貫性脊髓炎；錐體外及小腦病症，例如皮層脊髓系統損傷；基底神經節病症或小腦病症；多動運動障礙，例如亨庭頓氏舞蹈症(Huntington's Chorea)及老年舞蹈症(senile chorea)、藥物誘導之運動障礙，例如彼等由阻斷CNS、多巴胺(dopamine)受體之藥物誘導者；運動機能減退性運動障礙，例如帕金森氏病(Parkinson's disease)；進行性上眼神經核麻痺症、小腦及脊髓小腦病症，例如小腦之結構損傷；脊髓小腦變性(脊髓性共濟失調、弗裏德賴希共濟失調症(Friedreich's ataxia)、小腦皮層變性、多系統變性(Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager及Machado-Joseph)；及全身性病症(雷夫蘇姆疾病(Refsum's disease)、無 $\beta$ 脂蛋白血症、共濟失調症、血管擴張症、及線粒體多系統病症)；脫髓鞘病症，例如多發性硬化症、急性橫貫性脊髓炎；運動單元病症，例如神經性肌萎縮(前角細胞變性，例如肌萎縮性側索硬化、幼兒脊髓性肌萎縮及青少年脊髓性肌萎縮)；阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)；中年唐氏症候群(Down's Syndrome)；彌漫性路易體疾病(Diffuse Lewy body disease)；路易體型老年性癡呆、韋尼克-科爾薩科夫症候群(Wernicke-Korsakoff syndrome)；長期酗酒；克羅伊茨費爾特-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)；亞急性硬化性泛腦炎、Hallerorden-Spatz疾病及拳擊手癡

呆或其任何子集；

■ 惡性病狀，包括TNF- $\alpha$ 分泌腫瘤或涉及TNF- $\alpha$ 之其他惡性腫瘤，例如但不限於白血病(急性、慢性髓細胞性、慢性淋巴細胞性及/或骨髓發育不良症候群)；淋巴瘤(何傑金氏(Hodgkin's)及非何傑金氏(non-Hodgkin's)淋巴瘤，例如惡性淋巴瘤(伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)或蕈樣真菌病(Mycosis fungoide))，及

■ 酒精誘導之肝炎。

在某些具體實施例中，本揭示內容之抗體用於治療阿達木單抗經批准之任何適應症，例如類風濕性關節炎(RA)(包括成人之中度至嚴重RA)、多關節幼年型特發性關節炎(JIA)(包括4歲及更大患者之中度至嚴重JIA)、牛皮癬性關節炎(PsA)(包括成人之PsA)、關節黏連性脊椎炎(AS)(包括成人之AS)、克羅恩氏病(CD)(包括成人之中等或嚴重CD)、牛皮癬(例如慢性斑塊狀牛皮癬(Ps)(包括成人之中度至嚴重慢性斑塊狀牛皮癬))及軸心型脊椎關節炎(axSpA)(包括無結構損害之X射線證據之成人患者之嚴重axSpA)。

因此，本發明提供治療有需要患者之上述疾病中任一者的方法，該等方法包含：向患者投與本揭示之抗TNF- $\alpha$ 抗體。視情況例如在1天、2天、3天、5天、1週、2週或1個月後重複該投與。重複投與可為相同劑量或不同劑量。投與可重複1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次或更多次。舉例而言，根據特定劑量方案，患者接受抗TNF- $\alpha$ 療法延長時間，例如6個月、1年或更長時間。在某些實施例中，投與至患者之抗TNF- $\alpha$ 抗體之量係治療有效量。如本文所用，「治療有效」量之TNF- $\alpha$ 抗體可以單一劑量或在治療方案之過程中(例如在1週、2週、3週、1個月、3個月、6個月、1年或更長時間之過程中)投與。典型劑量將視患者及疾病之嚴重程度而定，但通常在10 mg至160 mg範圍內(例如，10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、



30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、60 mg、80 mg、100 mg、120 mg、140 mg或160 mg)。在特定實施例中，本揭示提供包含抗TNF- $\alpha$ 抗體之醫藥組合物或治療本文所揭示之一或多種病症之方法，劑量範圍包括上述值之任一者。治療方案，其中本揭示之抗TNF- $\alpha$ 抗體將視患者之年齡、體重及疾病狀況而定。治療方案可繼續2週至無限期。在特定實施例中，治療方案繼續2週至6個月、3個月至5年、6個月至1或2年、8個月至18個月或諸如此類。投與本揭示之抗TNF- $\alpha$ 抗體之患者較佳係人類。在某些態樣中，人類係小兒患者。在其他態樣中，人類係成人患者。

本揭示之抗TNF- $\alpha$ 抗體可與至少另一治療劑(「第二治療劑」)組合投與。抗TNF- $\alpha$ 抗體與第二治療劑可並行(同時或依序)或分開投與。

在某些態樣中，第二治療劑係抗風濕藥物、抗發炎藥劑、化學治療劑、放射性治療劑、免疫抑制劑或細胞毒性藥物。

抗風濕藥物包括(但不限於)金諾芬(auranofin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、氯喹(chloroquine)、D-青黴胺(D-penicillamine)、硫代蘋果酸金鈉羥基氯喹(gold sodium thiomalate hydroxychloroquine)、硫代苯酸金鈉(Myocrisin)及柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、胺甲蝶呤。

抗發炎藥劑包括(但不限於)地塞米松(dexamethasone)、頗得斯安(pentasa)、美沙拉嗪(mesalazine)、阿腸克(asacol)、磷酸可待因(codeine phosphate)、貝諾酯(benorylate)、芬布芬(fenbufen)、消痛靈(naprosyn)、雙氯芬酸(diclofenac)、依託度酸(etodolac)及吲哚美辛(indomethacin)、阿司匹林(aspirin)及布洛芬(ibuprofen)。

化學治療劑包括(但不限於)放射性分子、毒素(亦稱作細胞毒素或細胞毒性劑，其包括對細胞之存活力有害之任何試劑)、含有化學治療化合物之試劑及脂質體或其他囊泡。適宜化學治療劑之實例包括

(但不限於) 1-去氫甾甾酮、5-氟尿嘧啶 氮烯咪胺、6-巯基嘌呤、6-鳥嘌呤、放線菌素D、阿黴素(adriamycin)、阿地介白素(aldesleukin)、烷基化劑、別嘌呤醇鈉(allopurinol sodium)、六甲蜜胺(altretamine)、胺磷汀(amifostine)、阿那曲唑(anastrozole)、氮苄黴素(AMC))、抗有絲分裂劑、順二氯二胺鉑 (II) (DDP)順鉑)、二胺基二氯鉑、蔥環抗生素、抗生素、抗代謝物類、天冬醯胺酶、活BCG (膀胱內)、倍氯米松(betamethasone)磷酸鈉及乙酸倍氯米松、比卡魯胺(bicalutamide)、硫酸博來黴素、白消安、甲醯四氫葉酸鈣(calcium leucovorin)、卡奇黴素、卡培他濱(capecitabine)、卡鉑(carboplatin)、洛莫司汀(CCNU)、卡莫司汀(BSNU)、氮芥苯丁酸、順鉑、克拉屈濱(Cladribine)、秋水仙鹼(Colchicin)、偶聯雌激素、環磷醯胺、Cyclophosphamide、阿糖胞苷、阿糖胞苷、松胞菌素B (cytochalasin B)、環磷醯胺(Cytosan)、達卡巴嗪(Dacarbazine)、放線菌素D(Dactinomycin)、放線菌素D (dactinomycin) (先前稱作放線菌素)、柔紅黴素(daunirubicin HCL)、檸檬酸柔紅黴素(daunorubicin citrate)、地尼白介素2 (denileukin diftitox)、右雷佐生(Dexrazoxane)、二溴甘露醇、二羥基炭疽菌素二酮、多西他賽(Docetaxel)、甲磺酸多拉司瓊(dolasetron mesylate)、多柔比星HCL、屈大麻酚(dronabinol)、埃希氏大腸桿菌(E. coli) L-天冬醯胺酶、依米丁(emetine)、阿法依伯汀(epoetin- $\alpha$ )、歐文氏菌(Erwinia) L-天冬醯胺酶)、酯化雌激素、雌二醇(estradiol)、雌莫司汀磷酸鈉(estramustine phosphate sodium)、溴化乙錠(ethidium bromide)、乙炔雌二醇(ethinyl estradiol)、依替膦酸鹽(etidronate)、依託泊苷嗜橙菌因子、磷酸依託泊苷、非格司亭(filgrastim)、氟尿苷(floxuridine)、氟康唑(fluconazole)、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate)、氟尿嘧啶、氟他胺(flutamide)、醛葉酸(folinic acid)、吉西他濱(gemcitabine) HCL、

糖皮質激素、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、短桿菌肽D (gramicidin D)、格拉司瓊(granisetron) HCL、羥基脲(hydroxyurea)、伊達比星(idarubicin) HCL、異環磷醯胺(ifosfamide)、干擾素 $\alpha$ -2b、伊立替康(irinotecan) HCL、來曲唑(letrozole)、甲醯四氫葉酸鈣(leucovorin calcium)、乙酸柳菩林(leuprolide acetate)、左旋咪唑(levamisole) HCL、利多卡因、洛莫司汀、類美坦生、雙氯乙基甲胺 HCL、乙酸甲羥孕酮(medroxyprogesterone acetate)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、美法侖HCL、巯基嘌呤、美司鈉(mesna)、胺甲蝶呤、甲基羥固酮、光輝黴素、絲裂黴素C、米托坦(mitotane)、米托蒽醌、尼魯特米(nilutamide)、乙酸奧曲肽(octreotide acetate)、昂丹司瓊(ondansetron) HCL、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、帕米膦酸二鈉(pamidronate disodium)、噴司他汀(pentostatin)、毛果芸香鹼(pilocarpine) HCL、(plimycin)、具有卡莫司汀植入物之聚苯丙生20 (polifeprosan 20)、卟菲爾鈉(porfimer sodium)、普魯卡因、丙卡巴肼(procarbazine) HCL、普萘洛爾、利妥昔單抗(rituximab)、沙格司亭(sargramostim)、鏈脲黴素、他莫昔芬(tamoxifen)、紫杉醇、替尼泊苷(teniposide)、替托泊苷、睪內酯(testolactone)、四卡因、苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、烏嘌呤、塞替派、托泊替康(topotecan) HCL、檸檬酸托瑞米芬(toremifene citrate)、D2E7、維甲酸(tretinoin)、戊柔比星(valrubicin)、硫酸長春鹼、硫酸長春新鹼及酒石酸長春瑞濱(vinorelbine tartrate)。

在本揭示內容之再一些態樣中，第二治療劑係除本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體外之TNF- $\alpha$ 拮抗劑。該等TNF- $\alpha$ 拮抗劑之實例包括(但不限於)可溶性TNF- $\alpha$ 受體；依那西普(etanercept) (ENBREL；Immunex)或其片段、衍生物或類似物；英夫利昔單抗(infliximab) (REMICADE；Centacor)或其衍生物、類似物或抗原結合片段；IL-

10，已知其經由干擾素- $\gamma$ 活化之巨噬細胞阻斷TNF- $\alpha$ 產生(Oswald等人，1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8676-8680)、TNFR-IgG (Ashkenazi等人，1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539)；鼠類產物TBP-1 (Serono/Yeda)；疫苗CytoTAb (Protherics)；反義分子104838 (ISIS)；肽RDP-58 (SangStat)；沙利竇邁(thalidomide) (Celgene)；CDC-801 (Celgene)；DPC-333 (Dupont)；VX-745 (Vertex)；AGIX-4207 (AtheroGenics)；ITF-2357 (Italfarmaco)；NPI-13021-31 (Nereus)；SCIO-469 (Scios)；TACE靶向劑(Immunix/AHP)；CLX-120500 (Calyx)；Thiazolopyrim (Dynavax)；金諾芬(Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals)；奎納克林(quinacrine)(二氯水合米帕林(mepacrine dichlorohydrate))；替尼達普(tenidap) (Enablex)；黑色素(Melanin) (Large Scale Biological)；及Uriach之抗p38 MAPK藥劑。

可與抗TNF- $\alpha$ 抗體組合使用之額外第二治療劑及與該等第二治療劑之組合療法可用的特定適應症揭示於WO 2004/004633中，其全部內容皆以引用方式併入本文中。

### 醫藥組合物及醫藥投與

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可納入適於投與患者之醫藥組合物中。通常，醫藥組合物包含抗TNF- $\alpha$ 抗體及醫藥上可接受之載劑。本文所用之「醫藥上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、塗覆劑、抗細菌及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑及生理上相容之類似試劑。醫藥上可接受之載劑之實例包括以下中之一或多者以及其組合：水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及諸如此類。在許多情形下，組合物中較佳包括等滲劑(例如，糖、多元醇(例如甘露醇)、山梨醇或氯化鈉)。醫藥上可接受之載劑可進一步包含少量輔助性物質，例如潤濕劑或乳化劑、防腐劑或緩衝液，其可增強抗體或

抗體部分之存架壽命或有效性。

本發明組合物可呈多種形式。該等形式包括(例如)液體、半固體及固體劑型，例如液體溶液(例如，可注射及可輸注溶液)、分散液或懸浮液及粉劑。較佳形式端視預期投與模式及治療應用而定。典型較佳組合物係呈可注射或可輸注溶液形式。較佳投與模式係非經腸(例如，靜脈內、皮下、腹膜內、肌內)。在較佳實施例中，抗TNF- $\alpha$ 抗體係藉由靜脈內輸注或注射投與。在另一較佳實施例中，抗TNF- $\alpha$ 抗體係藉由肌內或皮下注射投與。

本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體可提供於醫藥套組中。醫藥套組係包含本揭示內容之抗TNF- $\alpha$ 抗體(例如，呈凍乾形式或呈水溶液形式)及視情況以下中之一或多者之包裝：第二治療劑，例如如上文所述；用於投與抗TNF- $\alpha$ 抗體之裝置，例如筆、針及/或注射器；及用於懸浮抗體(若抗體呈凍乾形式)之醫藥級水或緩衝液。

在某些態樣中，抗TNF- $\alpha$ 抗體之每一單位劑量經單獨包裝，且套組可含有一或多個單位劑量(例如，2個單位劑量、3個單位劑量、4個單位劑量、5個單位劑量、8個單位劑量、10個單位劑量或更多)。在具體實施例中，一或多個單位劑量各自容納在注射器或筆中。典型單位劑量包含10 mg至160 mg抗TNF- $\alpha$ 抗體(例如，10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、60 mg、80 mg、100 mg、120 mg、140 mg或160 mg)。在具體實施例中，本發明提供包含由上述值中之任一者包括在內之範圍內之抗TNF- $\alpha$ 抗體的單位劑量。

另外，可包括其他添加劑，例如穩定劑、緩衝液(例如封阻緩衝液或溶胞緩衝液)及諸如此類。在具體實施例中，抗體及一或多種添加劑可以通常凍乾之乾粉形式提供(個別或組合)，其包括在溶解時可提供具有適當濃度之溶液的賦形劑。

## 實例

### 實例1：用於表現及細胞表面展示之載體。

D2E7 (阿達木單抗)之合成可變輕鏈( $V_L$ )及可變重鏈( $V_H$ )域係由市售基因合成供應商(DNA 2.0公司, Menlo Park, CA)構築。圖1顯示合成D2E7  $V_H$ 及 $V_L$ 片段之DNA序列、轉譯胺基酸序列、側接限制位點及CDR。互補決定區(CDR)由粗體下劃線文本指示。將合成D2E7  $V_H$ 及 $V_L$ 選殖至載體pYA206 (EB病毒(Epstein-Barr virus)衍生之附加型載體, 其用於在哺乳動物細胞表面上表現並展示抗體)中。pYA206係具有以下修飾之質粒pYA104之衍生物 (Akamatsu 等人, J. Immunol Methods, 2007年10月31日; 327(1-2):40-52): 1) 人類C  $\lambda$ 恆定域經人類C  $\kappa$ 恆定域替代, 2) 糖基化磷脂醯肌醇連接信號(GPI錨)經血小板源生長因子受體(PDGF-R)之跨膜域替代, 3) 獨特NotI及XhoI位點係在C  $\kappa$ 域之上游用於選殖具有C  $\kappa$ 之框架中之 $V_L$ 域, 及4) 獨特NgoMIV及SacI位點係在IgG<sub>1</sub>之上游用於選殖具有IgG<sub>1</sub>恆定區之框架中之 $V_H$ 域。

pCW600係質粒pYA206之衍生物, 其中CH基因經Fab替代。

用NgoMIV及SacI消化D2E7  $V_H$ 片段, 且用NotI及XhoI消化D2E7  $V_L$ 片段。將兩個片段選殖至質粒pYA206中以產生質粒pYA206-D2E7。圖4顯示pYA206-D2E7之結構。此質粒含有EBNA-1基因及艾伯斯坦巴爾病毒之oriP, 該艾伯斯坦巴爾病毒之oriP容許在哺乳動物細胞中以游離體形式複製。pUC複製起點及氨苄西林(ampicillin)抗性基因容許質粒在埃希氏大腸桿菌中繁殖。針對SV40啟動子控制下之嘌呤黴素抗性基因選擇哺乳動物細胞轉形體。CMV啟動子及內部核糖體進入位點(IRES)容許所展示抗體重鏈及輕鏈表現。所表現抗體經由稠合至IgG<sub>1</sub>恆定域之末端之PDGF-R跨膜域連接至細胞膜。

用NgoMIV及SacI消化D2E7  $V_H$ 片段, 用NotI及XhoI消化D2E7  $V_L$

片段，且將兩個片段選殖至質粒 pCW600 中以產生質粒 pCW600-D2E7。圖 4 顯示 pCW600-D2E7 之結構。此質粒含有 EBNA-1 基因及艾伯斯坦巴爾病毒之 oriP，該艾伯斯坦巴爾病毒之 oriP 容許在哺乳動物細胞中以游離體形式複製。pUC 複製起點及氨苄西林抗性基因容許質粒在埃希氏大腸桿菌中繁殖。針對 SV40 啟動子控制下之嘌呤黴素抗性基因選擇哺乳動物細胞轉形體。CMV 啟動子及內部核糖體進入位點 (IRES) 容許所展示 Fab 重鏈及輕鏈表現。所表現 Fab 經由稠合至 IgG<sub>1</sub> 恆定域之末端之 PDGF-R 跨膜域連接至細胞膜。

## 實例 2：D2E7 之表面展示及 FACS 滴定分析

用 pYA206-D2E7 轉形表現 EBNA-1 蛋白之 293c18 細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA)。將 293c18 細胞在補充有 10% 胎牛血清 (FBS) 及 0.25 mg/ml G418 之 DMEM 培養基中培養。將 0.125 µg pYA206-D2E7 或 pCW600-D2E7 質粒與作為載體質粒之 25 µg pUC19 加上 60 µl lipofectamine (Invitrogen, CA) 以 1:200 混合並將其添加至  $2 \times 10^7$  個 293c18 細胞中。200 倍過量載體質粒以確保每一細胞皆由至多含有質粒之單一 D2E7 轉形。48 小時後，藉由添加嘌呤黴素選擇轉形細胞，且隨後在 FACS 分析之前再培養 18 天。

用 Alexa Fluor 647 (Invitrogen, CA) 標記人類 TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN)。使 1 mg 人類 TNF- $\alpha$  與 84 µg Alexa Fluor 647 試劑於室溫下反應 30 分鐘，且隨後使用凝膠過濾管柱自未反應試劑純化。將經 pCW600-D2E7 轉染之 293c18 細胞用 1/200 稀釋之 PE 標記之抗人類 IgG (Southern Biotech) 及不同濃度之 Alexa Fluor 647 標記之 TNF- $\alpha$  在冰上雙重染色 1 小時，用 FACS 緩衝液 (磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 加上 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA)) 洗滌並在 FacsCalibur (BD) 上分析。利用介於 20 nM 至 0.26 nM 範圍內之 Alexa Fluor 647 標記之 TNF- $\alpha$  的濃度實施滴定曲線。每一曲線之中點 (此處發生半數最大結合) 定義抗體/抗

原複合物之 $EC_{50}$ 。野生型D2E7之結果示於圖5中。在此分析中，表面展示之D2E7 Fab以0.15 nM之 $EC_{50}$ 結合至TNF- $\alpha$ 。

使抗D2E7抗體1H11、5A1及10F8 (抗個體基因型，抗Id)與生物素偶聯。於室溫下使1 mg每一抗Id與43  $\mu$ g Sulfo-NHS-LC-生物素(Pierce)試劑反應2小時。藉由在微量離心過濾器中旋轉移除過量生物素。將經pCW600-D2E7轉染之293c18細胞用1/200稀釋之PE標記之抗人類IgG (Southern Biotech)雙重染色並生物素化抗Id 1小時，用FACS緩衝液(磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)加上0.5%牛血清白蛋白(BSA))洗滌，隨後用1/200稀釋之鏈黴抗生物素蛋白-APC染色。利用介於20 nM至0.26 nM範圍內之抗Id之濃度實施滴定曲線。每一曲線之中點(此處發生半數最大結合)定義抗Id/D2E7複合物之 $EC_{50}$ 。每一抗個體基因型之結果示於圖6中。在此分析中，表面展示之D2E7 Fab分別以0.77 nM、0.37 nM及1.28 nM之 $EC_{50}$ 結合至抗Id 1H11、5A1及10F8。

### 實例3：D2E7單一胺基酸突變體之庫之構築

靶向每一D2E7 CDR胺基酸位置(在圖1A中加下劃線，總共34個 $V_H$ 位置及27個 $V_L$ 位置)用於NNK隨機化。使用NNK編碼方案(其中N = A、C、G或T且K = G或T)，此乃因1) 編碼所有20種天然胺基酸僅需要32個密碼子，2) 32個密碼子中僅包括單一終止密碼子(TAG)，且3) 最大簡併性(編碼單一胺基酸之不同密碼子之數目)係3，而非完全64密碼子遺傳密碼中出現之最大6倍簡併性。

由合成基因之商業供應商(DNA 2.0, Menlo Park, CA)合成61個不同DNA片段，其各自在不同CDR位置處具有NNK簡併性。利用引子D2E7reampFwd (5'- CTCGAAAATAATAAAGGGAAAATCAG - 3') (SEQ ID NO:11)及D2E7reampRev (5'- TGGTAGTGTGGGGACTC -3') (SEQ ID NO:12)對該等片段進行PCR擴增。純化PCR產物，隨後用NgoMIV及SacI消化 $V_H$ 片段，並用NotI及XhoI消化 $V_L$ 片段。將所有片



段在瓊脂糖凝膠上運行，純化並亞選殖至攜帶相對野生型可變區片段之質粒pCW600-D2E7中。將所得質粒單獨轉形至埃希氏大腸桿菌Top 10細胞(Invitrogen, CA)中以形成61個不同DNA片段中之每一者之轉形體之子庫。實施轉形以使得可獲得為每一子庫中之可能密碼子之總數目之至少10倍的埃希氏大腸桿菌轉形體。彙集 $V_H$ 及 $V_L$ 之所得子庫以產生兩個最終庫 - 包含34個位置及1088個不同密碼子之D2E7  $V_H$ 庫，以及包含27個位置及總計864個不同密碼子之D2E7  $V_L$ 庫。

#### 實例4：用於TNF- $\alpha$ 結合之D2E7 $V_H$ 及 $V_L$ 點突變體Fab庫之FACS染色及4-路分選

用0.5  $\mu$ g庫質粒、100  $\mu$ g pUC19載體質粒及250  $\mu$ l lipofectamine將D2E7  $V_H$ 及 $V_L$ 庫轉染至293c18細胞中，2天後利用0.8  $\mu$ g/ml嘌呤黴素選擇，並在FACS分選之間再培養18天。將細胞用0.15奈莫耳濃度之Alexa Fluor 647-TNF- $\alpha$ 及1:200 PE標記之抗IgG (Southern Biotech)染色並在MoFlo FACS機(Dako North America公司，Carpinteria, CA)上進行分選。野生型D2E7及 $V_H$ 點突變庫之FACS分選概況示於圖7中。圖A顯示經野生型D2E7 Fab表現質粒pCW600轉形之細胞之FACS概況；x軸顯示利用PE-抗IgG染色且y軸顯示利用Alexa Fluor 647-TNF- $\alpha$ 染色。由於抗體在細胞群體中係異源表現，故FACS概況顯示個別數據點大致沿指向右上象限之對角線排列。

基於FACS閘將 $V_H$ 點突變庫之TNF- $\alpha$ 染色細胞分選成4個子群(圖7之圖B)。使用野生型抗體在類似FACS條件下之特徵來設定閘以分選較高親和性(H)群體(R4)、中性或「中等」親和性(M)群體(R5)、較低親和性(L)群體(R6)及IgG非表現(Z)群體(R3)中之細胞。x軸顯示抗IgG-PE染色且y軸顯示利用人類-TNF- $\alpha$ -AF647之染色。

#### 實例5：用於抗Id結合之D2E7 $V_H$ 及 $V_L$ 點突變體Fab庫之FACS染色及2-路分選

將表現D2E7之細胞用0.15奈莫耳濃度Alexa Fluor 647-TNF- $\alpha$ 共染色並以EC<sub>50</sub> (1H11爲0.77 nM, 5A1爲0.37 nM及10F8爲1.28 nM)生物素化抗個體基因型mAbs, 隨後於室溫下培育2小時。隨後將細胞洗滌並於4°C下與鏈黴抗生物素蛋白-APC及抗人類IgG  $\kappa$ -FITC一起培育1小時。洗滌細胞, 隨後在MoFlo FACS機(Dako North America公司, Carpinteria, CA)上分選。經1H11染色之野生型D2E7及V<sub>H</sub>庫之FACS分選概況示於圖8中。抗IgG-PE染色示於x軸上且抗Id1H11-APC染色示於y軸上。實施2路分選, 從而在「分選」(與抗個體基因型結合較低之細胞)及「表現」(對抗人類IgG  $\kappa$  FITC呈陽性之細胞)閘中收集最少200萬個細胞。

由於抗體在細胞群體中係異源表現, 故FACS概況顯示個別數據點大致沿指向右上象限之對角線排列。D2E7 WT及V<sub>H</sub>點突變庫之FACS概況分別示於圖8之圖A及B中。爲收集每一庫之含有庫中以其正確頻率表現之所有點突變的參考細胞群體, 利用平行於y軸之左邊緣拉出閘; 利用該等閘之分選收集所有IgG表現超出一定程度之細胞, 此與所展示抗體與抗Id之結合程度無關。該等閘及群體命名爲「表現閘」及「表現群體」(圖B「R4」)。利用大致平行於野生型群體之主對角線並在其正下方拉出之閘之頂部進行其他分選; 該等閘經設計以收集表現對抗個體基因型具有降低之結合親和性之抗體的細胞, 此與其IgG表現之整體程度無關。該等閘及群體稱作「分選閘」及「分選群體」(圖B「R3」)。在「分選」及「表現」閘二者中收集約2,000,000個細胞。

#### 實例6:「表現」及「分選」群體之大規模平行測序

自「表現」及「分選」細胞群體回收質粒並實施PCR擴增以製備適於大規模平行測序之短擴增子。使用PCR引子, 其緊鄰D2E7 V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>域之CDR1及CDR3區外退火。引子係: V<sub>H</sub>正向引子

D2E7\_VH\_CDR1\_ 5'-TTAGTTGTGCTGCATCAGGTTT-3' (SEQ ID NO:13) ; V<sub>H</sub> 反向引子 D2E7\_VH\_CDR3\_rev 5'-GGTCACCAGTGTTCCCTGAC-3' (SEQ ID NO:14) ; V<sub>L</sub> 正向引子 D2E7\_VL\_CDR1\_ 5'-GTAGGCGACAGGGTCACAAT-3' (SEQ ID NO:15) ; 及 V<sub>L</sub> 反向引子 D2E7\_VL\_CDR3\_rev 5'-AGTCCGTTTGATCTCGACCTT-3' (SEQ ID NO:16)。因此，每一擴增子含有完整CDR 1、CDR2及CDR3區用定位所有點突變並將其製成表格，但忽略許多框架1及4。隨後使用基因組測序儀FLX如由製造商引導對D2E7 V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>庫「分選」及「表現」擴增子進行測序。(454 Life Sciences, Branford, CT)。

使用電腦程式檢驗序列並將「表現」及「分選」群體中發現每一點突變之次數製成表格。電腦程式最初讀數並將每一密碼子製成表格。對於具有一個以上密碼子之胺基酸，該程式增加每一胺基酸一起之不同密碼子之出現，以整體概述每一子群中之該胺基酸變體的特徵。

對於用於評定與TNF- $\alpha$ 之結合的D2E7庫之4-路分選，針對每一密碼子變體給出富含比(ER)評分。ER表示H群體中發現變體之頻率與其整體頻率相比大或小多少。類似地，可計算M、L及Z群體中之每一者中之每一變體的富含比。預計H群體中富含較高親和性變體(ER>1)且L群體中缺乏較高親和性變體(ER<1)。相反地，預計H群體中缺乏較低親和性突變體(ER<1)且L群體中富含較低親和性突變體(ER>1)。可僅藉由查看H群體之富含比識別較高、較低及中性親和性變體。

在用於評定D2E7庫與抗個體基因型之結合的2-路FACS分析中，「分選」群體含有與抗個體基因型結合較低之變體。在此情形下，分選變體之較高ER表示與抗個體基因型之結合降低。

#### 實例7：具有期望性質之點突變體之識別

爲分析數據，針對對位置測序且以每1000個序列之頻率表現之次數標準化給定位置處發現突變之次數。隨後用分選群體中之突變之頻率除以所表現群體中之頻率以給出富含比(ER)，其指示與所表現群體相比分選群體中富含或缺乏突變及其程度。在分選群體中富含之突變與TNF- $\alpha$ 之結合將增強，而缺乏之突變之結合將降低。類似地，與抗個體基因型之結合降低之分選細胞對於特定抗個體基因型具有高富含比。

### 實例8：沉默野生型密碼子分析

在測定分選子群中富含抑或缺乏庫之變體時，在相同實驗條件下比較變體之特徵與野生型蛋白之特徵可係有用的。此可藉由遵循沉默WT密碼子之特徵容易地進行，該等沉默WT密碼子係編碼WT蛋白但含有由NNK隨機化產生之沉默密碼子變化的變體DNA序列。舉例而言，在野生型密碼子係GGG (甘胺酸)之庫位置處，NNK隨機化將產生GGT密碼子，其亦編碼甘胺酸，但在本文所述分選及統計分析方法中可如任何其他變體一般對其加以追蹤。端視起始密碼子而定，無論何處皆可在任一位置出現零至三個沉默野生型密碼子；在實踐中此確保在覆蓋50-65個不同位置之典型CDR庫中將可獲得數十個沉默野生型密碼子。可使用該等沉默野生型富含比之平均值確定實驗之中點；高於此中點，將發現親和性改良之變體；低於此中點，將發現親和性較低之變體；且在該中點附近將發現中性變體。圖9顯示沉默野生型密碼子分析之結果。有益突變(即，彼等具有與抗個體基因型1H11之降低結合及與TNF- $\alpha$ 之中性結合者)可具有高於0.25之1H11-ER (平均值+1SD)及介於1.21與1.59之間之TNF- $\alpha$ -ER (平均值 $\pm$ 1SD)。

### 實例9：單點FACS分析

爲預測CDR中可導致與抗個體基因型之結合降低之位置，用僅有

一個位置突變為32個可能之密碼子之子庫轉染平鋪於96孔板中之293c18細胞(圖10)。培養2天後，收穫細胞並用與PE偶聯之抗個體基因型(EC<sub>50</sub>)及TNF- $\alpha$ -647 (EC<sub>50</sub>)染色。FACS分析顯示具有與抗個體基因型之結合較低之大群體細胞之位置。圖11顯示，V<sub>H</sub>中之一些位置(加圓圈)可經突變以降低1H11結合，且無V<sub>L</sub>位置可導致類似效應。類似地，圖12顯示，V<sub>L</sub>鏈中某些位置之突變可降低與抗個體基因型5A1及10F8之結合。V<sub>H</sub>鏈中之突變不會降低與5A1及10F8之結合。

具有經預測對1H11結合重要之V<sub>H</sub>中的灰掉之位置之D2E7之Pymol模型示於圖13中。所預測表位顯示，儘管該等位置散佈在三個CDR之間，但其在模型中毗鄰並形成保形及不連續之表位。類似地，圖14顯示5A1及10F8結合中重要之V<sub>L</sub>中之位置形成保形或不連續表位。

為確認與抗個體基因型之結合降低，在細胞表面上表現單一突變體全長IgG，隨後用與AF647偶聯之抗個體基因型(EC<sub>50</sub>)及抗IgG-PE染色。為確認與靶之中性結合，用TNF- $\alpha$ -AF647 (EC<sub>50</sub>)及抗IgG-PE對細胞表面上之全長IgG染色。

V<sub>H</sub> CDR1-2 (Y32)自Y突變為K、R、S、T或V。圖15顯示突變體之單點FACS分析。利用抗個體基因型1H11之FACS染色確認所有變體之結合降低。TNF- $\alpha$ 染色顯示對於除T外之所有突變體中性結合，此與圖16中之此突變體之較低ER相關。圖16中所示之D2E7 V<sub>L</sub>之有益突變選擇為與1H11之結合降低(1H11-ER高於0.25)且與TNF- $\alpha$ 之結合中性(TNF- $\alpha$ -ER為1.21-1.60)者。不期望突變呈灰色。

圖17提供平均1H11富含比(以位置計)。具有高平均ER之D2E7 V<sub>H</sub>中之位置更可能具有胺基酸取代，從而產生與抗Id 1H11之結合降低之抗體。

圖18提供平均5A1富含比(以位置計)。具有高平均ER之D2E7 V<sub>L</sub>

中之位置更可能具有胺基酸取代，從而產生與抗個體基因型5A1之結合降低之抗體。

圖19提供平均10F8富含比(以位置計)。具有高平均ER之D2E7 V<sub>L</sub>中之位置更可能具有胺基酸取代，從而產生與抗個體基因型10F8之結合降低之抗體。

#### 實例10：D2E7橋接分析

研發D2E7橋接分析以可視化D2E7與自人類供體獲得之抗阿達木單抗抗體(ADAb)之結合。於4℃下將Immobilon高結合ELISA板用PBMS中之0.5 µg/ml野生型D2E7抗體塗佈過夜。第二天，用含有0.1% Tween-20之PBS (PBS/Tween)洗滌板。於室溫下將板用PBS中之1%人類AB血清(huAB/PBS)封阻1-2小時。在huAB/PBS中稀釋人類血清試樣(Bioreclamation, NY)並將其添加至ELISA板中。最後，添加生物素化野生型D2E7抗體至15 ng/ml之最終濃度。於4℃下將板培育過夜。第二天，在PBS/Tween中洗滌板。根據製造商之推薦在huAB/PBS中1:1000稀釋鏈黴抗生物素蛋白-HRPO (MABTECH)向板中添加100 µl/孔。將板於室溫下培育30分子，隨後用PBS/Tween洗滌一次並用蒸餾水洗滌兩次。添加TMB單組份(BioFX Laboratories)並使顏色顯影15分鐘。於650 nm下對板進行讀數。包括陽性對照(鼠類抗人類D2E7單株抗體)。

#### 實例11：用於驗證D2E7 V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>點突變體之抑制分析

在人類知情同意書下，篩選人類供體列表阿達木單抗而非胺甲蝶呤之市售血清試樣作為藥劑，用於使用實例10之橋接分析之抗阿達木單抗(「ADAb」)的存在。篩選顯示ADAb之證據之供體用於進一步研究。藉由使用下述陽性及陰性對照實施抑制分析來確認ADAb之特異性。所選供體之ADAb對D2E7之Fab片段具有特異性。

篩選識別為與D2E7相比與鼠類抗個體基因型抗體之結合降低之

變體抗體用於抑制D2E7橋接分析。由變體抗體抑制橋接分析顯示變體仍能夠由患者血清ADAb結合。因此，不干擾橋接分析之變體不與sADAb交叉反應且因此代表D2E7之抗體結合表位內之突變。

將Immobilon ELISA板用0.5 µg/ml野生型D2E7塗佈過夜，洗滌並封阻。在單獨96孔板中，將D2E7變體抗體在huAb/PBS中稀釋至10 µg/ml。以一式兩份測試每一變體。使用賀癌平(Herceptin)及DP10 (與D2E7無關之IgG<sub>1</sub>抗體)作為抗阿達木單抗抗體結合之陰性對照。使用野生型D2E7抗體作為抑制之陽性對照。亦分別使用DP10及D2E7 Fab片段作為陰性及陽性對照。將來自呈現對阿達木單抗之免疫反應之供體的血清在huAB/PBS中稀釋至1:25，且向含有變體及對照之孔中添加100 µl。供體血清之最終濃度係1:50。將100 µl稀釋血清及所添加之變體及對照轉移至D2E7塗佈板。立刻向板中添加100 µl存於huAB/PBS中之30 ng/ml生物素化D2E7。將板於4℃下培育過夜。第二天，洗滌板，並添加稀釋鏈黴抗生物素蛋白-HRPO。將板用PBS/Tween-40洗滌一次，並添加TMB單組份(BioFX Laboratories)並使顯色15分鐘。於650 nm下對板進行讀數。

包括無關抗體DP10作為所有測試中之對照且其對板上與D2E7之ADAb結合無影響。與DP10之ADAb結合的抑制%平均為88 +/- 12%。利用來自四個商業供體之ADAb陽性血清試樣實施抑制分析。結果對於所有四個供體大大重疊，V<sub>H</sub> CDR3之變化對ADAb結合之影響最大(圖20)。以兩種方式選擇較佳變體：圖21A顯示具有比所測試之所有變體之平均值高大於2個標準偏差之抑制百分比的所有變體之列表。圖21B顯示在四個供體之任一者中具有任何明顯活性之所有變體。所識別之最佳點突變係T100V，抑制%為53 +/- 10%。V95W次佳，平均值為47%。除V<sub>H</sub> CDR3外之最佳變體係具有2個變體胺基酸取代之V<sub>L</sub> R30，平均百分比為23%。

基於單一變體之數據產生組合變體。構築含有VH及VL二者之變化之組合，在一些情形下將取代納入變體VL中，該變體VL具有CDR-L1中之取代G28S及A34S (Kabat編號)，其對應於CDR-L1中之G5S + A11S組合，如WO 2010/121140中最初闡述。具有G5S + A11S取代之變體VL主體在本文中稱作VL-SS。使變體抗體表現並純化並在ADAb抑制分析及TNF- $\alpha$ 結合親和性分析中進行測試。對2個供體之ADAb結合之結果平均化。使用表面電漿共振測試(Biacore)評定結合。結果示於圖22中。變體Y32K/SS-R30T及Y32K/SS-R30I呈現ADA結合與保留抗TNF  $\alpha$ 親和性之最佳組合。

所有出版物、專利、專利申請案及本申請案中引用之其他文件之全部內容出於所有目的皆以引用方式併入本文中，其併入程度如同將每一個別出版物、專利、專利申請案或其他文件個別指明出於所有目的以引用方式併入一般。

儘管已闡釋並闡述各個具體實施例，但應瞭解，可進行各種改變而不背離本揭示內容之精神及範疇。

#### 【符號說明】

無



【序列表】

<110> 美商艾伯維生物醫療股份有限公司  
<120> 識別具有降低免疫原性之抗體之方法  
<130> 381493-721TW (118133)  
<140>  
<141>

<150> 61/703,170  
<151> 2012-09-19  
  
<160> 16  
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 363  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成多核苷酸

<400> 1  
gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcgg cctctggatt cacccttggat gattatgccatgcactgggt ccggcaagct 120  
ccagggaagg gccttggatg ggcttcagct atcaccttggatagtggttca catagactat 180  
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
ctgcaaatga acagcttgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagctcgc 300  
taccttagca ccgcgtcttc ccttgactat tggggccaag gtaccttggt caccgtctcg 360  
agt 363

<210> 2  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 2  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 15  
1 5 10  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 30  
20 25 30  
  
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 45  
35 40 45  
  
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val 60  
50 55 60  
  
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 80  
65 70 75 80  
  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 95  
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> 3  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成多核苷酸

<400> 3  
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctglagggga cagagtcacc 60  
atcacttgic gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggatca gcaaaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctccl gatctatgct gcatccactl tgcaatcagg ggtcccatct 180  
cggttcagtg gcagtggaic tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240  
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgig caccgtatac ttttggccag 300  
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 4  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 4  
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  
100 105

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

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 5  
Asp Tyr Ala Met His  
1 5

<210> 6  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 6  
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 7  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 7  
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 8  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 9  
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
1 5

<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 10  
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 11  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成引子

<400> 11  
ctcgaaaata ataaaggga aatcag 26

<210> 12  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成引子

<400> 12  
tggtagtgig gggactc 17

<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成引子

<400> 13  
ttagttgigc tgcaicaggt tt 22

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成引子

<400> 14  
ggtcaccagt gttccctgac 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成引子

<400> 15  
glaggcgaca gggtcacaat 20

<210> 16

<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之說明：合成引子

<400> 16  
agtcggttgg atctcgacct t 21

## 發明摘要

※ 申請案號：102134040

※ 申請日：102. 9. 18

※IPC 分類：

C12Q 1/02 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
C40B 20/04 (2006.01)  
C40B 30/04 (2006.01)  
C07K 16/24 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 17/06 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01)

## 【發明名稱】

識別具有降低免疫原性之抗體之方法

METHODS FOR IDENTIFYING ANTIBODIES WITH REDUCED  
IMMUNOGENICITY

## 【中文】

本揭示闡述識別與參考抗體相比具有降低免疫原性之該參考抗體變體的方法。本揭示進一步闡述與參考抗TNF- $\alpha$ 參考抗體相比具有降低免疫原性之該參考抗TNF- $\alpha$ 抗體的變體。

## 【英文】

The disclosure describes method of identifying a variant of a reference antibody with reduced immunogenicity as compared to the reference antibody. The disclosure further describes variants of a reference anti-TNF- $\alpha$  antibody having reduced immunogenicity as compared to the reference anti-TNF- $\alpha$  reference antibody.

圖式

公告本

D2E7(阿達木單抗，HUMIRA) V<sub>H</sub> (SEQ ID NO:2)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVEGR  
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS

D2E7 (阿達木單抗，HUMIRA) V<sub>L</sub> (SEQ ID NO:4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK

圖 1A

抗體鏈	CDR 編號	序列	SEQ ID NO.
重鏈	1	DYAMH	5
重鏈	2	AITWNSGHIDYADSVEG	6
重鏈	3	VSYLSTASSLDY	7
輕鏈	1	RASQGIRNYLA	8
輕鏈	2	AASTLQS	9
輕鏈	3	QRYNRAPYT	10

圖 1B

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT	120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT	180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT	240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG	300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG	360
AGT	363

D2E7 可變重鏈之核苷酸序列

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC	60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA	120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT	180
CGGTTCACTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT	240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG	300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A	321

D2E7 可變輕鏈之核苷酸序列

圖 1C



位置	Kabat	WT 胺 基酸	V <sub>L</sub> 中之有益突變
L1-1	24	R	
L1-2	25	A	
L1-3	26	S	
L1-4	27	Q	
L1-5	28	G	F <sup>ab</sup> , I <sup>ab</sup> , V <sup>b</sup> , W <sup>bc</sup> , Y <sup>ab</sup>
L1-6	29	I	
L1-7	30	R	I <sup>ab</sup> , T <sup>abc</sup> , V <sup>abc</sup>
L1-8	31	N	A <sup>abc</sup> , D <sup>ac</sup> , E <sup>ac</sup> , G <sup>abc</sup> , L <sup>abc</sup> , M <sup>abc</sup> , Q <sup>abc</sup> , R <sup>abc</sup> , T <sup>abc</sup>
L1-9	32	Y	
L1-10	33	L	
L1-11	34	A	
L2-1	50	A	I <sup>bc</sup> , T <sup>bc</sup> , V <sup>abc</sup>
L2-2	51	A	
L2-3	52	S	
L2-4	53	T	D <sup>bc</sup>
L2-5	54	L	
L2-6	55	Q	
L2-7	56	S	
L3-1	89	Q	
L3-2	90	R	G <sup>a</sup>
L3-3	91	Y	
L3-4	92	N	F <sup>abc</sup> , M <sup>ab</sup> , W <sup>abc</sup> , Y <sup>c</sup>
L3-5	93	R	L <sup>a</sup> , N <sup>a</sup> , W <sup>ab</sup> , Y <sup>a</sup>
L3-6	94	A	
L3-7	95	P	
L3-8	96	Y	
L3-9	97	T	Y <sup>c</sup>

圖 2

位置	kabat	WT 胺 基酸	V <sub>H</sub> 中之有益突變
H1-1	31	D	S <sup>d</sup>
H1-2	32	Y	A <sup>d</sup> , C <sup>d</sup> , K <sup>d</sup> , M <sup>d</sup> , R <sup>d</sup> , S <sup>d</sup> , V <sup>d</sup>
H1-3	33	A	
H1-4	34	M	
H1-5	35	H	C <sup>d</sup> , D <sup>d</sup> , E <sup>d</sup> , S <sup>d</sup> , T <sup>d</sup>
H2-1	50	A	
H2-2	51	I	
H2-3	52	T	A <sup>d</sup> , G <sup>d</sup> , N <sup>d</sup>
H2-4	52a	W	A <sup>d</sup> , F <sup>d</sup> , H <sup>d</sup> , L <sup>d</sup> , M <sup>d</sup> , V <sup>d</sup>
H2-5	53	N	G <sup>e</sup>
H2-6	54	S	D <sup>e</sup> , L <sup>e</sup>
H2-7	55	G	
H2-8	56	H	
H2-9	57	I	K <sup>ef</sup>
H2-10	58	D	L <sup>d</sup>
H2-11	59	Y	A <sup>ef</sup> , C <sup>ef</sup> , E <sup>ef</sup> , F <sup>ef</sup> , G <sup>ef</sup> , H <sup>ef</sup> , I <sup>ef</sup> , K <sup>ef</sup> , L <sup>ef</sup> , M <sup>e</sup> , N <sup>ef</sup> , Q <sup>e</sup> , R <sup>ef</sup> , S <sup>ef</sup> , V <sup>ef</sup> , W <sup>ef</sup>
H2-12	60	A	Y <sup>e</sup>
H2-13	61	D	N <sup>f</sup>
H2-14	62	S	
H2-15	63	V	D <sup>ef</sup> , L <sup>ef</sup> , M <sup>ef</sup> , Q <sup>ef</sup> , T <sup>ef</sup>
H2-16	64	E	F <sup>ef</sup> , H <sup>e</sup> , K <sup>ef</sup> , R <sup>ef</sup> , T <sup>ef</sup> , W <sup>ef</sup>
H2-17	65	G	A <sup>ef</sup> , C <sup>ef</sup> , E <sup>ef</sup> , H <sup>e</sup> , I <sup>ef</sup> , K <sup>ef</sup> , L <sup>ef</sup> , M <sup>ef</sup> , N <sup>ef</sup> , P <sup>ef</sup> , Q <sup>ef</sup> , R <sup>ef</sup> , S <sup>ef</sup> , T <sup>ef</sup> , Y <sup>ef</sup>

圖 3A

位置	kabat	WT 胺 基酸	V <sub>H</sub> 中之有益突變
H3-1	95	V	G <sup>d</sup> , R <sup>d</sup> , W <sup>d</sup>
H3-2	96	S	
H3-3	97	Y	
H3-4	98	L	T <sup>d</sup> , V <sup>d</sup>
H3-5	99	S	
H3-6	100	T	V <sup>d</sup>
H3-7	100a	A	
H3-8	100b	S	
H3-9	100c	S	K <sup>d</sup> , W <sup>e</sup> , Y <sup>e</sup>
H3-10	100d	L	
H3-11	101	D	V <sup>d</sup>
H3-12	102	Y	

圖 3B

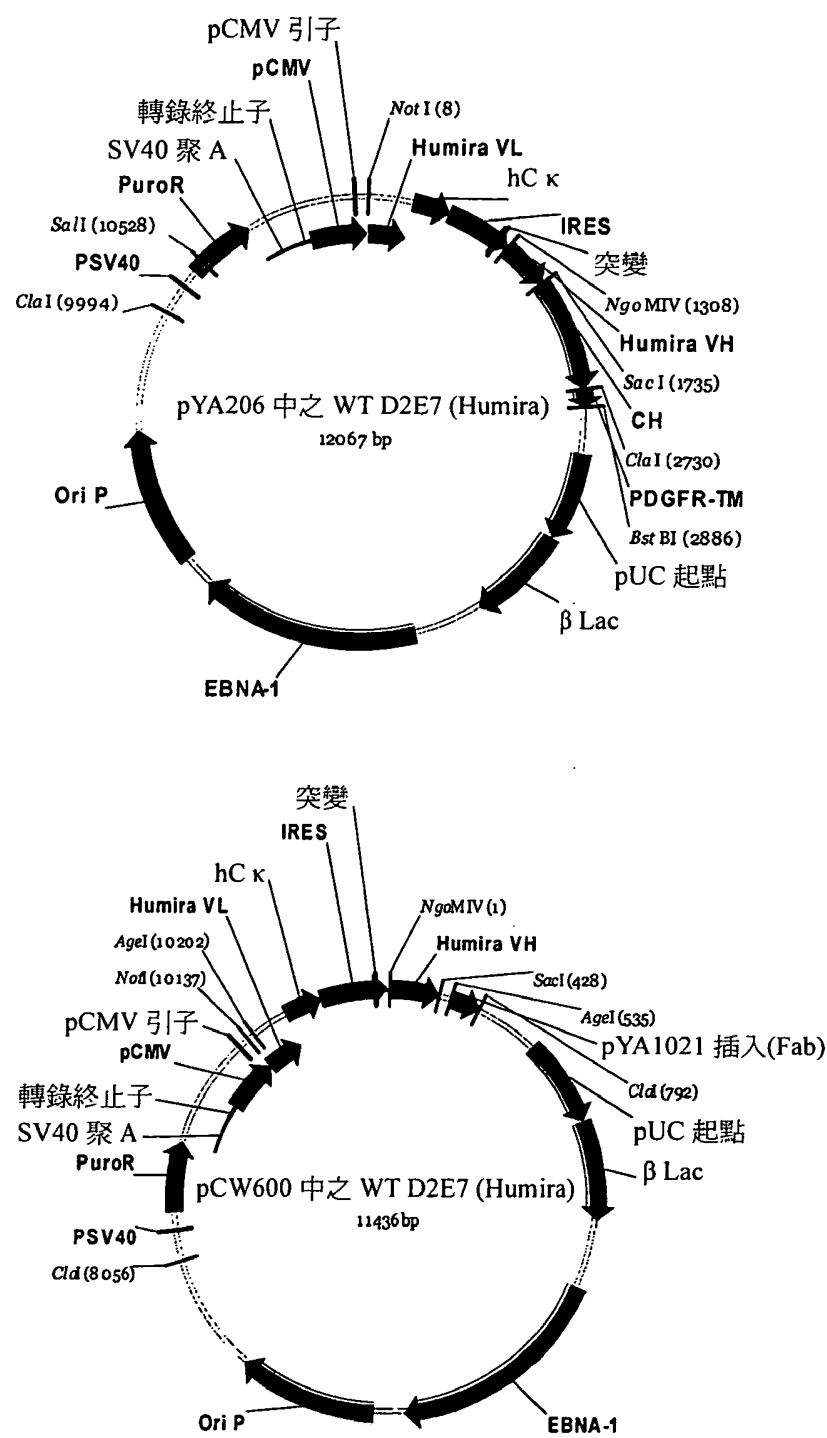


圖 4

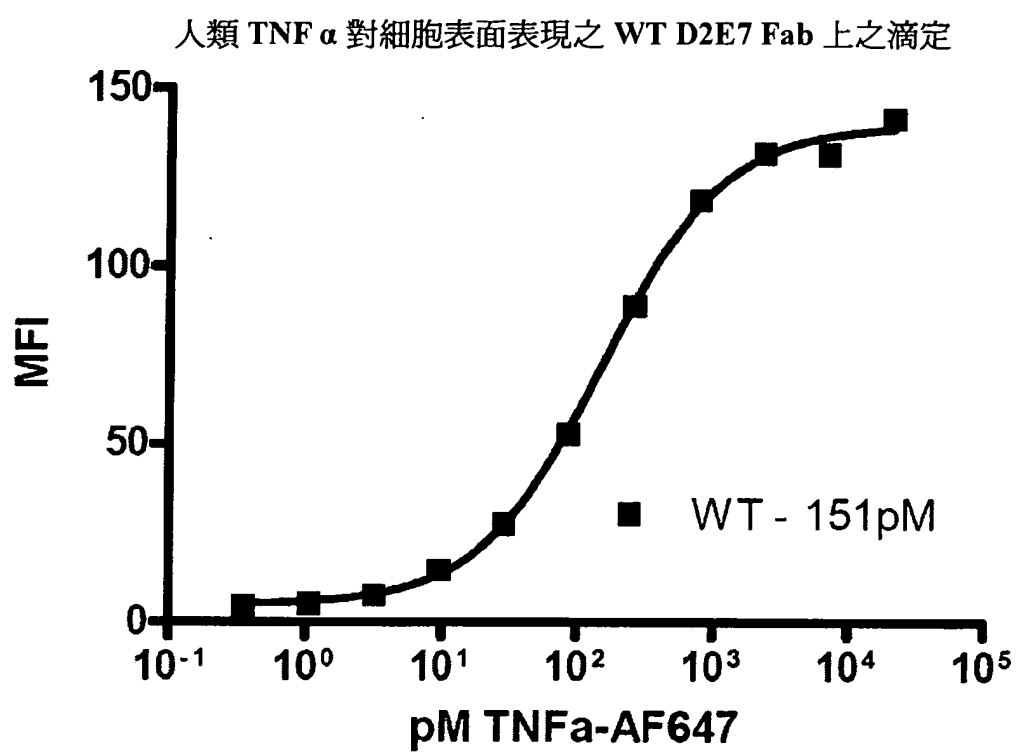


圖 5

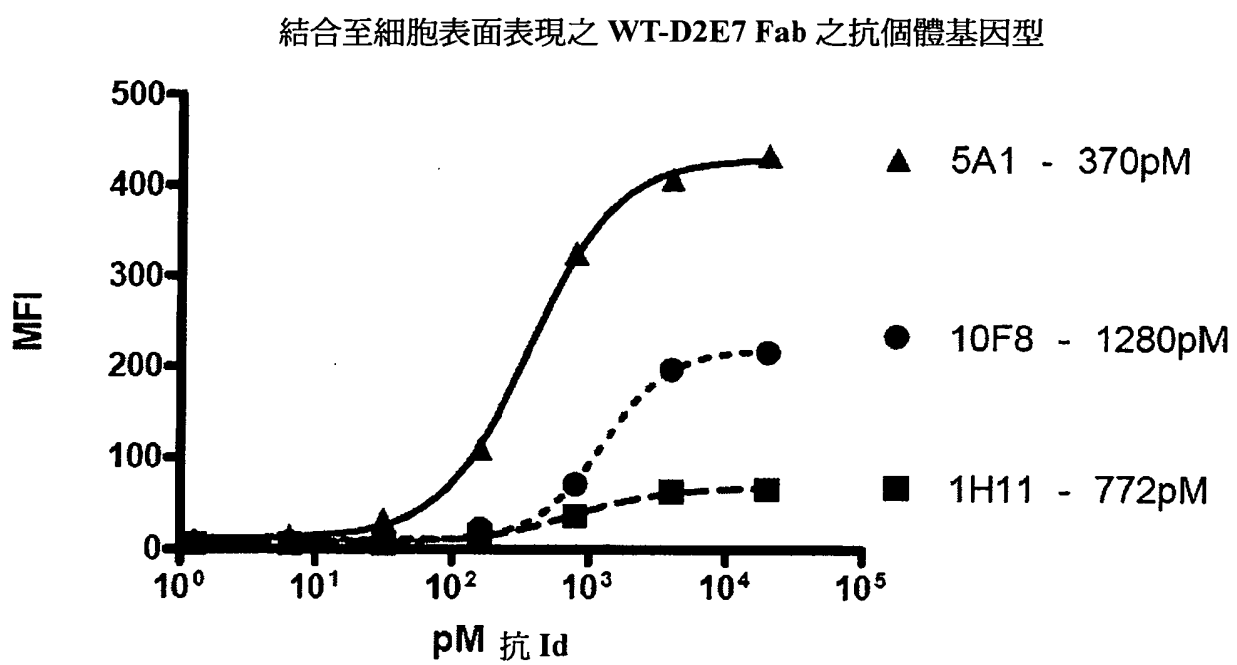


圖 6







WT-AA	WT	AA	突變體	CDR	位置		1H11 ER	TNF- $\alpha$ -ER
D	GAC	D	GAT	CDR-H1	1		0.29	1.47
A	GCC	A	GCG	CDR-H1	3		0.06	1.64
A	GCC	A	GCT	CDR-H1	3		0.4	1.33
H	CAC	H	CAT	CDR-H1	5		0.14	1.46
A	GCG	A	GCT	CDR-H2	1		0.3	1.08
I	ATC	I	ATT	CDR-H2	2		0.08	1.23
T	ACG	T	ACT	CDR-H2	3		0.44	1.36
N	AAC	N	AAT	CDR-H2	5		0.27	1.63
G	GGC	G	GGG	CDR-H2	7		0.16	1.46
G	GGC	G	GGT	CDR-H2	7		0.07	1.27
H	CAC	H	CAT	CDR-H2	8		0.19	1.38
I	ATA	I	ATT	CDR-H2	9		0.01	1.85
A	GCA	A	GCT	CDR-H2	12		0.02	1.47
A	GCA	A	GCG	CDR-H2	12		0.02	1.11
S	AGC	S	TCT	CDR-H2	14		0.01	1.57
S	AGC	S	TCG	CDR-H2	14		0	1.58
S	AGC	S	AGT	CDR-H2	14		0.07	1.14
V	GTG	V	GTT	CDR-H2	15		0.04	1.52
E	GAA	E	GAG	CDR-H2	16		0.13	1.72
G	GGA	G	GGT	CDR-H2	17		0.02	1.29
G	GGA	G	GGG	CDR-H2	17		0.02	1.44
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	2		0.12	1.27
L	CTC	L	CTT	CDR-H3	4		0.07	1.43
L	CTC	L	TTG	CDR-H3	4		0.02	1.43
L	CTC	L	CTG	CDR-H3	4		0.02	1.50
S	TCA	S	TCG	CDR-H3	5		0.2	1.45
S	TCA	S	TCT	CDR-H3	5		0.01	1.40
S	TCA	S	AGT	CDR-H3	5		0.04	1.39
T	ACA	T	ACT	CDR-H3	6		0.08	1.14
A	GCT	A	GCG	CDR-H3	7		0.27	1.22
S	TCC	S	AGT	CDR-H3	8		0	1.53
S	TCC	S	TCG	CDR-H3	8		0.02	1.53
S	TCC	S	TCT	CDR-H3	8		0.46	0.92
S	AGC	S	TCG	CDR-H3	9		0	1.63
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	9		0.14	1.19
L	CTA	L	TTG	CDR-H3	10		0	1.34
Y	TAC	Y	TAT	CDR-H3	12		0.34	1.34

	1H11	TNF- $\alpha$	與 TNF- $\alpha$ 之 中性結合
平均值	0.12	1.40	1.21-1.59
SD	0.13	0.19	

圖 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	VL CDR1-1 R24	VL CDR1-9 Y32	VL CDR2-6 Q55	VL CDR3-7 P95	VH CDR2-1 A50	VH CDR2-9 I57	VH CDR2-17 G65	VH CDR3-8 S100b
B	VL CDR1-2 A25	VL CDR1-10 L33	VL CDR2-7 S56	VL CDR3-8 Y96	VH CDR2-2 I51	VH CDR2-10 D58	VH CDR3-1 V95	VH CDR3-9 S100c
C	VL CDR1-3 S26	VL CDR1-11 A34	VL CDR3-1 Q89	VL CDR3-9 T97	VH CDR2-3 T52	VH CDR2-11 Y59	VH CDR3-2 S96	VH CDR3-10 L100d
D	VL CDR1-4 Q27	VL CDR2-1 A50	VL CDR3-2 R90	VH CDR1-1 D31	VH CDR2-4 W52a	VH CDR2-12 A60	VH CDR3-3 Y97	VH CDR3-11 D101
E	VL CDR1-5 G28	VL CDR2-2 A51	VL CDR3-3 Y91	VH CDR1-2 Y32	VH CDR2-5 N53	VH CDR2-13 D61	VH CDR3-4 L98	VH CDR3-12 Y102
F	VL CDR1-6 I29	VL CDR2-3 S52	VL CDR3-4 N92	VH CDR1-3 A33	VH CDR2-6 S54	VH CDR2-14 S62	VH CDR3-5 S99	
G	VL CDR1-7 R30	VL CDR2-4 T53	VL CDR3-5 R93	VH CDR1-4 M34	VH CDR2-7 G55	VH CDR2-15 V63	VH CDR3-6 T100	
H	VL CDR1-8 N31	VL CDR2-5 L54	VL CDR3-6 A94	VH CDR1-5 H35	VH CDR2-8 H56	VH CDR2-16 E64	VH CDR3-7 A100a	

圖 10





















變體	記法	37440	23709	90814	84111	平均值	SD
WT	WT	1.67	-1.16	0.00	-0.44	<b>0.02</b>	1.20
VL-SS	VL-SS	-2.90	3.79	0.35	-0.33	<b>0.23</b>	2.76
VL R30T	VL4	8.44	26.36	18.92	11.19	<b>16.23</b>	8.08
VH Y59I + VL-SS	VH16-SS	0.13	1.60	-0.66	-0.46	<b>0.15</b>	1.02
VH Y59R + VL-SS	VH20-SS	-1.23	2.82	-1.08	1.24	<b>0.44</b>	1.95
VH V63D + VL-SS	VH24-SS	-0.77	-0.37	-0.69	-0.54	<b>-0.59</b>	0.18
VL G28F	VL1	3.15	15.50	0.69	0.22	<b>4.89</b>	7.19
VL G28V	VL2	-5.29	10.13	-0.71	-0.07	<b>1.01</b>	6.51
VL G28Y	VL3	-1.46	8.33	-0.16	0.00	<b>1.68</b>	4.48
VL N31D	VL5	-0.46	13.13	0.56	1.32	<b>3.64</b>	6.37
VL N31L	VL6	3.77	10.88	1.19	1.68	<b>4.38</b>	4.48
VL N31T	VL7	3.43	8.70	1.04	0.88	<b>3.51</b>	3.65
VL A50T	VL9	1.77	15.45	0.01	-0.19	<b>4.26</b>	7.51
VL T53D	VL10	0.00	3.77	-1.25	-0.50	<b>0.51</b>	2.24
VL N92F	VL11	5.96	24.50	4.50	4.41	<b>9.85</b>	9.80
VL N92Y	VL12	7.62	22.66	6.17	6.19	<b>10.66</b>	8.03
VL R93L	VL13	2.14	17.92	1.19	1.92	<b>5.79</b>	8.09
VL R93N	VL14	1.79	15.93	1.22	1.48	<b>5.10</b>	7.22
VH D31S + VL-SS	VH1-SS	3.20	25.37	2.20	1.63	<b>8.10</b>	11.53
VH Y32A + VL-SS	VH2-SS	8.88	31.91	4.01	2.69	<b>11.87</b>	13.62
VH Y32R + VL-SS	VH3-SS	11.81	52.68	5.85	3.80	<b>18.54</b>	23.02
VH Y32S + VL-SS	VH4-SS	7.34	25.95	4.08	2.21	<b>9.90</b>	10.91
VH H35E + VL-SS	VH6-SS	0.99	20.58	0.07	0.23	<b>5.47</b>	10.08
VH H35T + VL-SS	VH7-SS	14.67	33.27	2.20	10.15	<b>15.07</b>	13.18
VH T52A + VL-SS	VH8-SS	-1.98	18.61	0.64	0.86	<b>4.53</b>	9.48
VH T52G + VL-SS	VH9-SS	2.32	24.96	1.61	1.36	<b>7.56</b>	11.60
VH I57K + VL-SS	VH10-SS	-2.69	8.43	-1.23	-0.42	<b>1.02</b>	5.03
VH Y59A + VL-SS	VH12-SS	-2.32	4.80	-1.31	-1.09	<b>0.02</b>	3.23
VH Y59C + VL-SS	VH13-SS	-4.39	4.37	-1.01	-0.49	<b>-0.38</b>	3.61
VH Y59F + VL-SS	VH14-SS	-1.51	7.70	-0.01	-0.23	<b>1.49</b>	4.19
VH Y59H + VL-SS	VH15-SS	-0.38	6.28	-0.49	-0.04	<b>1.34</b>	3.30
VH Y59L + VL-SS	VH18-SS	-0.74	5.37	-1.39	-0.48	<b>0.69</b>	3.14
VH Y59M + VL-SS	VH19-SS	0.58	2.92	-1.25	-0.53	<b>0.43</b>	1.82
VH Y59S + VL-SS	VH21-SS	-2.89	6.58	-1.41	-1.08	<b>0.30</b>	4.26
VH Y59V + VL-SS	VH22-SS	-1.52	4.05	-1.24	0.20	<b>0.37</b>	2.56
VH Y59W + VL-SS	VH23-SS	-1.16	8.76	1.03	-0.24	<b>2.10</b>	4.53
VH V63L + VL-SS	VH25-SS	-0.41	7.11	-0.45	-0.10	<b>1.54</b>	3.72
VH G65A + VL-SS	VH26-SS	-2.74	6.44	-1.32	-0.31	<b>0.52</b>	4.07
VH G65E + VL-SS	VH27-SS	-2.55	8.87	-0.38	-0.46	<b>1.37</b>	5.10
VH G65L + VL-SS	VH28-SS	-2.94	1.80	-1.25	-1.10	<b>-0.88</b>	1.97
VH G65M + VL-SS	VH29-SS	-2.30	3.73	-0.30	-1.12	<b>0.00</b>	2.62
VH G65Q + VL-SS	VH30-SS	-1.54	5.57	1.01	-0.46	<b>1.14</b>	3.13
VH G65R + VL-SS	VH31-SS	3.27	7.88	-0.47	-0.14	<b>2.63</b>	3.88

圖 20A

變體	記法	37440	23709	90814	84111	平均值	SD
VH G65S + VL-SS	VH32-SS	-1.77	5.59	-1.30	-0.46	<b>0.51</b>	3.43
VH V95R + VL-SS	VH33-SS	-1.47	9.95	-0.32	0.35	<b>2.13</b>	5.27
VH V95W + VL-SS	VH34-SS	26.86	59.72	63.70	37.73	<b>47.00</b>	17.63
VH L98T + VL-SS	VH35-SS	22.01	43.07	13.08	8.65	<b>21.70</b>	15.29
VH L98V + VL-SS	VH36-SS	9.75	45.57	6.23	3.32	<b>16.22</b>	19.75
VH T100V + VL-SS	VH37-SS	47.11	61.75	60.87	42.04	<b>52.94</b>	9.89
VH D101V + VL-SS	VH38-SS	0.93	13.57	-0.32	0.55	<b>3.68</b>	6.61
VH Y32K + VL-SS	VH39-SS	13.28	35.32	6.92	4.34	<b>14.97</b>	14.08
VH Y32V + VL-SS	VH40-SS	7.07	19.62	2.17	1.36	<b>7.56</b>	8.43
VH H35C + VL-SS	VH41-SS	2.04	24.36	0.94	0.77	<b>7.03</b>	11.57
VH H35S + VL-SS	VH42-SS	3.09	30.19	4.08	1.16	<b>9.63</b>	13.76
VH V95G + VL-SS	VH43-SS	29.10	53.62	18.01	13.00	<b>28.43</b>	18.09
G28I		5.05	15.84		-0.10	<b>6.93</b>	8.14
G28W		3.54	14.89		-0.05	<b>6.13</b>	7.80
R30I		18.99	44.28		8.46	<b>23.91</b>	18.41
R30V		19.04	40.09		10.16	<b>23.10</b>	15.37
N31E		10.69	29.20		3.37	<b>14.42</b>	13.31
N31G		6.16	19.35		1.03	<b>8.85</b>	9.45
V31R		5.80	13.38		0.78	<b>6.65</b>	6.35
A50V		2.15	15.98		-0.01	<b>6.04</b>	8.68
R93W		6.25	28.88		2.34	<b>12.49</b>	14.33
VH-Y32K		36.31	24.20			<b>30.26</b>	8.56
VH-Y32V		21.20	13.50			<b>17.35</b>	5.44
VH-H35C		12.70	19.40			<b>16.05</b>	4.74
VH-H35S		13.99	22.56			<b>18.28</b>	6.06
VH-V95G		34.70	38.58			<b>36.64</b>	2.75
DP10		99.82	84.18	95.33	71.54	<b>87.72</b>	12.63

圖 20B



VH	VL	ADAb 橋接	親和性倍數	親和性 pM
WT	WT	5	100	83 +/- 10
WT	SS	0.4	82	150
Y32K/T100V	SS	28	142	61
Y32K/V95G/T100V	SS	24	122	71
Y32K	SS/R30T	45	55	130
Y32K	SS/R30I	48	50	149
V95G/T100V	SS	15	25	335
Y32M	SS	0	21	411
V95W	R30I	95	23	379
V95W	R30T	97	0	>10,000

圖 22

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（6）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

無



104年11月4日修(更)正本

第102134040號專利申請案

中文申請專利範圍替換本(104年11月4日)

## 申請專利範圍

公告本

1. 一種參考抗TNF- $\alpha$ 抗體或抗體之參考抗TNF- $\alpha$ 結合片段之變體，該參考抗體或結合片段包含具有對應於以下胺基酸序列的6個互補決定區(「CDR」)：SEQ ID NO:5 (CDR-H1)、SEQ ID NO:6 (CDR-H2)、SEQ ID NO:7 (CDR-H3)、SEQ ID NO:8 (CDR-L1)、SEQ ID NO:9 (CDR-L2)及SEQ ID NO:10 (CDR-H3)，其中該變體包含CDR-H1中之Y32K及CDR-L1中之R30T或R30I的取代，其中與該參考抗體或結合片段之CDR序列相比，該變體之6個CDR總共具有多至8個胺基酸取代。
2. 如請求項1之變體，其中該變體進一步包含CDR-L1中之G28S及A34S的取代。
3. 如請求項1或2之變體，其中該參考抗TNF- $\alpha$ 抗體或參考抗TNF- $\alpha$ 結合片段包含具有對應於SEQ ID NO:2之胺基酸序列的可變重鏈片段及具有對應於SEQ ID NO:4之胺基酸序列的可變輕鏈片段。
4. 一種核酸分子，其編碼如請求項1至3中任一項之變體。
5. 一種宿主細胞，其包含編碼如請求項1至3中任一項之變體的核酸分子。
6. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至3中任一項之變體及醫藥上可接受之載劑。
7. 一種如請求項1至3中任一項之變體的用途，其係用於製備治療患有免疫病症之人類患者的藥物。
8. 如請求項7之用途，其中該免疫病症係選自類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、斑塊狀牛皮癬及軸心型脊椎關節炎。