



(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 201422236 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：102139863

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 01 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2012/11/01 美國 61/721,364

2013/03/15 美國 61/794,231

(71)申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)

美國

(72)發明人：希德勒 麥克 SIEDLER, MICHAEL (DE)；庫瑪 維尼特 KUMAR, VINEET

(US)；恰瑞 瑞維 CHARI, RAVI (US)；薩魯傑 索娜 SALUJA, SONAL (IN)；

派提爾 凡希維希 PATIL, VISHWESH (IN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：76 項 圖式數：5 共 280 頁

(54)名稱

穩定雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質調配物

STABLE DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULIN PROTEIN FORMULATIONS

(57)摘要

本發明提供包含水性穩定雙重可變區域免疫球蛋白(AS-DVD-Ig)蛋白質的穩定水性調配物。本發明亦提供包含穩定凍乾雙重可變區域免疫球蛋白(LS-DVD-Ig)蛋白質的穩定凍乾調配物。

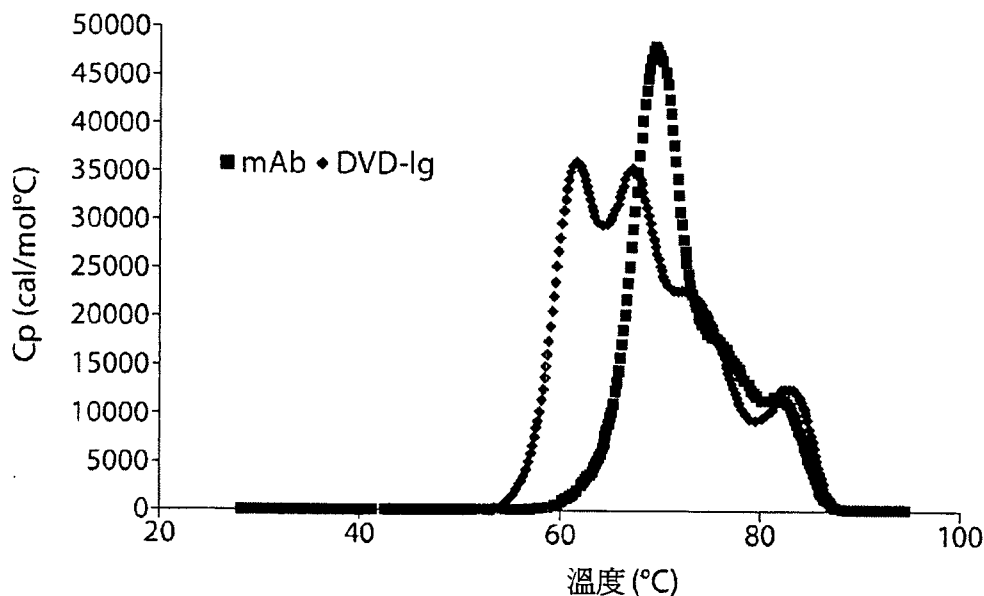


圖1



(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 201422236 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：102139863

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 01 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2012/11/01 美國 61/721,364

2013/03/15 美國 61/794,231

(71)申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)

美國

(72)發明人：希德勒 麥克 SIEDLER, MICHAEL (DE)；庫瑪 維尼特 KUMAR, VINEET

(US)；恰瑞 瑞維 CHARI, RAVI (US)；薩魯傑 索娜 SALUJA, SONAL (IN)；

派提爾 凡希維希 PATIL, VISHWESH (IN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：76 項 圖式數：5 共 280 頁

(54)名稱

穩定雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質調配物

STABLE DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULIN PROTEIN FORMULATIONS

(57)摘要

本發明提供包含水性穩定雙重可變區域免疫球蛋白(AS-DVD-Ig)蛋白質的穩定水性調配物。本發明亦提供包含穩定凍乾雙重可變區域免疫球蛋白(LS-DVD-Ig)蛋白質的穩定凍乾調配物。

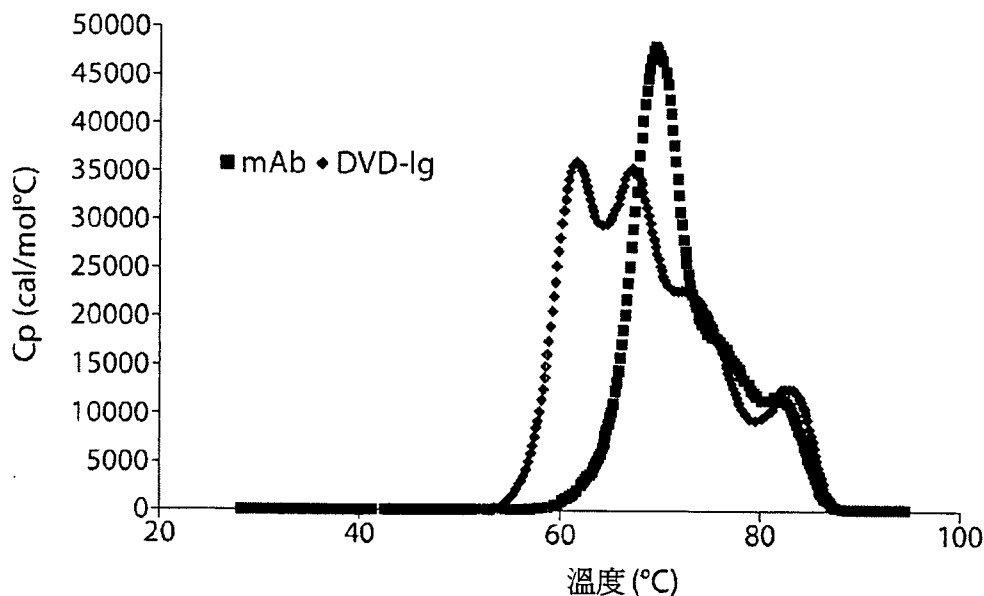


圖1

發明摘要

※ 申請案號：102139863

※ 申請日：102. 11. 1.

※IPC 分類：A61K 39/345 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

【發明名稱】

穩定雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質調配物

STABLE DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULIN

PROTEIN FORMULATIONS

○ 【中文】

本發明提供包含水性穩定雙重可變區域免疫球蛋白(AS-DVD-Ig)蛋白質的穩定水性調配物。本發明亦提供包含穩定凍乾雙重可變區域免疫球蛋白(LS-DVD-Ig)蛋白質的穩定凍乾調配物。

【英文】

The disclosure provides stable aqueous formulations comprising an Aqueous Stable Dual Variable Domain Immunoglobulin (AS-DVD-Ig) protein. The disclosure also provides stable lyophilized formulations comprising a Lyophilized Stable Dual Variable Domain Immunoglobulin (LS-DVD-Ig) protein.

○

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）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）

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】

穩定雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質調配物

STABLE DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULIN
PROTEIN FORMULATIONS

相關申請案

本申請案主張2012年11月1日申請之美國臨時申請案第61/721364號之優先權。本申請案亦主張2013年3月15日申請之美國臨時申請案第61/794231號之優先權。此兩個優先權申請案之內容以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

蛋白質醫藥調配物之基本原則為必須克服某些不穩定性，例如化學不穩定性及物理不穩定性。化學不穩定性常使得蛋白質經由鍵形成或分裂而被修飾。與化學不穩定性有關之問題實例包括脫醯胺、外消旋、水解、氧化、 β 消除及二硫鍵交換。儘管物理不穩定性未使得蛋白質發生共價變化，但是其恰好有問題且難以克服。物理不穩定性涉及蛋白質之高級結構(次級結構及更高級結構)變化，可引起變性、吸附至表面、聚集及/或沈澱(Manning等人 (1989) Pharm. Res. 6:903)。就治療性蛋白質而言，化學及物理不穩定性會給調配用於遞送至患者之蛋白質帶來重大挑戰。聚集常被認為是最常見的物理不穩定性類型。舉例而言，暴露於疏水性界面藉由蛋白質分子在界面處排列、蛋白質展開及疏水性殘基最大程度地暴露於空氣以及引發聚集而助長物理不穩定性。

高度濃縮蛋白質調配物，尤其是呈液體形式之高度濃縮蛋白質調配物，通常合乎治療性目的之需要，因為其允許以較小體積給藥，且提供皮下遞送之可能性。然而，開發高蛋白濃度調配物面臨諸多挑戰。舉例而言，高蛋白濃度常常導致蛋白質聚集、不溶性及降解增強(評論參見Shire等人 (2004) J. Pharm. Sci. 93:1390)。

迄今為止，大部分獲准治療性蛋白質為抗體。然而，開發商業上可行的抗體醫藥調配物並非易事，儘管抗體通常具有相同結構(參見Wang等人 (2007) J. Pharm. Sci. 96:1)。濃度依賴性聚集被認為是調配抗體之最大挑戰之一(參見Shire等人 (2004) J. Pharm. Sci. 93:1390)。

雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-IgTM)蛋白質為多價結合蛋白，其經工程改造而將兩種單株抗體之功能及特異性組合融入一個分子實體(參見Wu等人，美國專利第7,612,181號)。鑒於DVD-Ig蛋白質具有多價性質，因此此等分子作為治療劑擁有巨大前景。然而，DVD-Ig蛋白質因其大小(約200 kDa)及複雜性比抗體大得多而在調配上面臨新的挑戰。

【發明內容】

儘管大部分雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-IgTM)蛋白質在水性調配物中傾向於不穩定(例如聚集)，但DVD-Ig蛋白質之子組可穩定地加以調配。呈水性狀態之一些DVD-Ig蛋白質受困於某些問題，諸如DVD-Ig蛋白質單體之聚集及/或片段化。不能預料的是，DVD-Ig蛋白質之子組可在水性狀態下，甚至在高濃度下穩定地加以調配。此等穩定DVD-Ig蛋白質在本文中稱為水性穩定雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質或「AS-DVD-Ig」蛋白質。

在某些實施例中，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質之穩定水性調配物，包括高濃度AS-DVD-Ig調配物。AS-DVD-Ig蛋白質為DVD-Ig

蛋白質之子群，其特徵為其在儲存期間能在50 mg/ml或大於50 mg/ml之濃度下保持穩定(例如在水性調配物中在至少50 mg/ml之濃度下加速儲存(40°C)後展現小於3%之聚集度增加)。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質之特徵為，當以至少50 mg/ml之濃度在檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中調配，在40°C儲存14天後，具有小於10%之聚集度(藉由SEC測定)。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有6%或小於6%之聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少50 mg/ml之濃度儲存。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有5%或小於5%之聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少50 mg/ml之濃度儲存。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有4%或小於4%之聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少50 mg/ml之濃度儲存。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有3%或小於3%之聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少50 mg/ml之濃度儲存。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有2%或小於2%之聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少50 mg/ml之濃度儲存。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有1%或小於1%之聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少50 mg/ml之濃度儲存。本發明之調配物中可包括之AS-DVD-Ig蛋白質之實例包括(但不限於)對IL4及IL13；IL1 α 及IL1 β ；TNF α 及IL17；及DLL4及VEGF具有結合特異性之AS-DVD-Ig蛋白質。

在某些實施例中，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質、緩衝液、多元醇及界面活性劑的水性調配物。舉例而言，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液、界面活性劑及多元醇的水性調配物，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，調配物包含約1至約250 mg/ml、約10至約230 mg/ml、約20至約210 mg/ml、約30至約190 mg/ml、約40至約170 mg/ml、約50至約150 mg/ml、約60至約130 mg/ml、約70至約110 mg/ml或約80至約105 mg/ml之AS-DVD-Ig。在某些實施例中，多元醇為山梨糖醇，例如濃度約20至約60 mg/ml之山梨糖醇、約25至約55 mg/ml、約30至約50 mg/ml或約35至約45 mg/ml之山梨糖醇。在某些實施例中，多元醇為蔗糖，例如濃度約60至約100 mg/ml、約65至約95 mg/ml、約70至約90 mg/ml或約75至約85 mg/ml。在某些實施例中，多元醇為甘露糖醇且濃度為例如約10至約100 mg/ml，或約20至約80 mg/ml，約20至約70 mg/ml，約30至約60 mg/ml，或約30至約50 mg/ml。在某些實施例中，界面活性劑為聚山梨醇酯，例如濃度為0.001%至1%、0.005%至0.05%、0.01%至0.05%、或約0.1%。

在某些實施例中，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質、緩衝液及界面活性劑之水性調配物。舉例而言，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液及界面活性劑的水性調配物，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，調配物包含約1至約250 mg/ml、約10至約230 mg/ml、約20至約210 mg/ml、約30至約190 mg/ml、約40至約170 mg/ml、約50至約150 mg/ml、約60至約130 mg/ml、約70至約110 mg/ml或約80至約105 mg/ml之AS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，界面活性劑為聚山梨醇酯，例如濃度為約0.001%至約1%、約0.005%至約0.05%、約0.01%至約0.05%，或約0.1%。

在某些實施例中，本發明包括包含AS-DVD-Ig蛋白質、緩衝液及多元醇之水性調配物。舉例而言，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液及多元醇的水性調配物，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，調配物包含約1至約250 mg/ml、約10至約230 mg/ml、約20至約210 mg/ml、約30至約190 mg/ml、約40至約170 mg/ml、約50至約150 mg/ml、約60至約130 mg/ml、約70至約110 mg/ml或約80至約105 mg/ml之AS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，多元醇為山梨糖醇，例如濃度約20至約60 mg/ml之山梨糖醇、約25至約55 mg/ml、約30至約50 mg/ml或約35至約45 mg/ml之山梨糖醇。在某些實施例中，多元醇為蔗糖，例如濃度約60至約100 mg/ml、約65至約95 mg/ml、約70至約90 mg/ml或約75至約85 mg/ml。在某些實施例中，多元醇為甘露糖醇且濃度為例如約10至約100 mg/ml，或約20至約80 mg/ml，約20至約70 mg/ml，約30至約60 mg/ml，或約30至約50 mg/ml。

在另一實施例中，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質及緩衝液之水性調配物。舉例而言，本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質及具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液的水性調配物，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，調配物包含約1至約250 mg/ml、約10至約230 mg/ml、約20至約210 mg/ml、約30至約190 mg/ml、約40至約170 mg/ml、約50至約150 mg/ml、約60至約130 mg/ml、約70至約110 mg/ml或約80至約105 mg/ml之AS-DVD-Ig蛋白質。

在某些實施例中，本發明提供包含DVD-Ig蛋白質、多元醇、組胺酸緩衝液及聚山梨醇酯之調配物，其中該調配物具有約5至約7之pH值，且其中DVD-Ig蛋白質之特徵為，在40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有15%或小於15%之聚集度，其中DVD-Ig蛋白質於

檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少60 mg/ml之濃度調配而成。此等調配物可呈凍乾或水性狀態，在40℃儲存14天之後，如藉由SEC所測定，DVD-Ig蛋白質經鑑別具有15%或小於15%之聚集度，其中DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少60 mg/ml之濃度調配而成。在某些實施例中，本發明提供包含DVD-Ig蛋白質、多元醇、組胺酸緩衝液及聚山梨醇酯之調配物，其中該調配物具有約5至約7之pH值，且其中DVD-Ig蛋白質之特徵為，在40℃儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有6%或小於6%之聚集度，其中DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中以至少60 mg/ml之濃度調配而成。在某些實施例中，DVD-Ig蛋白質在水性或凍乾狀態下穩定。

本發明亦部分基於以下驚人發現：雖然大部分DVD-IgTM蛋白質在凍乾狀態下傾向於不穩定，但DVD-Ig蛋白質之子組能夠穩定調配成凍乾形式。此等穩定DVD-Ig蛋白質在本文中稱為穩定凍乾雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質或「LS-DVD-Ig」蛋白質。DVD-Ig蛋白質呈凍乾狀態之調配物受困於某些問題，諸如DVD-Ig蛋白質單體之聚集及/或片段化。不能預料的是，DVD-Ig蛋白質之子組可在凍乾狀態下，甚至在高濃度下穩定地加以調配。

在某些實施例中，本發明為包含穩定凍乾DVD免疫球蛋白(LS-DVD-Ig)蛋白質的凍乾調配物，其中該調配物經復原時，該調配物包含約1至約100 mg/ml之LS-DVD-Ig蛋白質、約10至約50 mM之緩衝液、多元醇、約0.01至約0.2 mg/ml之聚山梨醇酯，且具有約5至約7之pH值。

在某些實施例中，本發明提供凍乾調配物，其藉由將包含具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液、界面活性劑及多元醇的水性調配物凍乾而製得，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。

在某些實施例中，本發明提供在具有約4.5至約7.5之pH值的調配物中穩定的AS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物具有5至6.5之pH值。在某些實施例中，調配物具有約5.7至約6.3之pH值。在某些實施例中，本發明之調配物具有約5.5至約6.5之pH值。在某些實施例中，本發明之調配物具有5.8至約6.2之pH值，或6之pH值。

可用於本發明之水性調配物中之緩衝液之實例包括(但不限於)乙酸鹽、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、磷酸鹽及檸檬酸鹽。在某些實施例中，緩衝液於調配物中之莫耳濃度為約5至約50 mM。在某些實施例中，緩衝液莫耳濃度為約10 mM至約20 mM。

可用於本發明之調配物中之多元醇之實例包括(但不限於)山梨糖醇、甘露糖醇及蔗糖。在某些實施例中，多元醇為山梨糖醇。在某些實施例中，調配物中使用約30至約50 mg/ml之山梨糖醇。在某些實施例中，多元醇為蔗糖。在某些實施例中，調配物中使用約70至約90 mg/ml之蔗糖。在另一實施例中，多元醇為甘露糖醇。在某些實施例中，調配物中使用約30至約50 mg/ml之甘露糖醇。

可用於本發明調配物中之界面活性劑之實例包括(但不限於)聚山梨醇酯及泊洛沙姆(poloxamer)。在某些實施例中，界面活性劑為聚山梨醇酯，其實例為聚山梨醇酯80及聚山梨醇酯20。其他實例包括泊洛沙姆泊洛尼克F-68 (Pluronic F-68)、白蛋白、卵磷脂及環糊精。在某些實施例中，聚山梨醇酯具有約0.05 mg/ml至約2 mg/ml之濃度。在另一實施例中，聚山梨醇酯具有約0.01至約0.2 mg/ml之濃度。

本發明組合物之一個優點在於，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質可在高濃度下穩定調配成液體形式。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質具有約1至約200 mg/ml之濃度。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質具有約20至約100 mg/ml之濃度。在某些實施例中，調配物包含約1至約250

mg/ml、約10至約230 mg/ml、約20至約210 mg/ml、約30至約190 mg/ml、約40至約170 mg/ml、約50至約150 mg/ml、約60至約130 mg/ml、約70至約110 mg/ml或約80至約105 mg/ml之AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含含有VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的多肽鏈，其中VD1為第一可變區域，VD2為第二可變區域，C為恆定區域，X1表示胺基酸或多肽，X2表示Fc區且n為0或1。在某些實施例中，本發明之組合物及方法中所用的AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含四條多肽鏈，其中兩條多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域，VD2為第二重鏈可變區域，C為重鏈恆定區域，X1為連接子，限制條件為其不為CH1，且X2為Fc區；且兩條多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域，VD2為第二輕鏈可變區域，C為輕鏈恆定區域，X1為連接子，限制條件為其不為CH1，且X2不包含Fc區；且n為0或1；且其中該結合蛋白之該等四條多肽鏈形成四個功能性抗原結合位點。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含多肽鏈，其中該多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；且n為0或1。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含多肽鏈，其中該多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域；VD2為第二輕鏈可變區域；C為輕鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1或CL；X2不包含Fc區；且n為0或1。在另一實施例中，重鏈及/或輕鏈上之(X1)_n為(X1)₀及/或重鏈及/或輕鏈上之(X2)_n為(X2)₀。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含第一及第二多肽鏈，其中第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為第一連接子，限制條件為其不為CH2；X2為Fc區；n為0或1；且其中第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域；VD2為第二輕鏈可變區域；C為輕鏈恆定區域；X1為第二連接子，限制條件為其不為CH1或CL；X2不包含Fc區；且n為0或1。

在某些實施例中，第一多肽鏈之VD1及第二多肽鏈之VD1分別來自於不同的第一及第二親本抗體，或其結合部分。在某些實施例中，第一多肽鏈之VD2及第二多肽鏈之VD2分別來自於不同的第一及第二親本抗體，或其結合部分。在某些實施例中，第一及第二親本抗體結合相同目標或不同目標上的不同抗原決定基。在某些實施例中，第一親本抗體或其結合部分結合第一目標的效能不同於第二親本抗體或其結合部分結合第二目標的效能。在某些實施例中，第一親本抗體或其結合部分結合第一目標的親和力不同於第二親本抗體或其結合部分結合第二目標的親和力。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含兩條第一多肽鏈及兩條第二多肽鏈。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含第一及第二多肽鏈，各獨立地包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一可變區域；VD2為第二可變區域；C為恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1，其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。在另一實施例中，第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可

變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1；且其中第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域；VD2為第二輕鏈可變區域；C為輕鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2不包含Fc區；n為0或1，其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含第一及第二多肽鏈，各獨立地包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一可變區域；VD2為第二可變區域；C為恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1，且其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。在另一實施例中，第一多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1；且其中第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域；VD2為第二輕鏈可變區域；C為輕鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2不包含Fc區；n為0或1，其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

在某些實施例中，本發明之調配物包含DVD-Ig蛋白質，該DVD-Ig蛋白質包含如表62或表67中所列之重鏈或輕鏈胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之調配物包含DVD-Ig蛋白質，該DVD-Ig蛋白質包含如表58或表65中所列之重鏈或輕鏈可變區胺基酸序列 (SEQ ID NO: 28-75)。或者，本發明之調配物包含DVD-Ig蛋白質，該

DVD-Ig蛋白質包含如表58或表65中所列之重鏈或輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO: 28-75)中所列之CDR。

在某些實施例中，本發明之調配物包含抗TNF/IL-17 DVD-Ig，其重鏈及輕鏈序列分別具有如SEQ ID NO: 62及63所列之胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之調配物包含抗IL1 α /IL1 β DVD-Ig，其重鏈及輕鏈序列分別具有如SEQ ID NO: 66及67所列之胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明調配物中所用之DVD-Ig蛋白質結合以下目標組合(任一目標次序)中之一者：CD20/CD80、VEGF/Her2、TNF/RANKL、TNF/DKK、CD20/RANKL、DLL4/PLGF、TNF/SOST(S2)、IL-9(S2)/IgE、IL-12/IL-18、TNF/IL-17、TNF/PGE2、IL1 α /IL1 β ，或DLL4/VEGF。

本發明之水性及凍乾調配物之一個優點在於，不論呈水性及具有高濃度之AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質，其皆穩定。在某些實施例中，本發明之調配物具有低聚集度之AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約10%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約9%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約8%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約7%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約6%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約5%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，調配物包含小於約4%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在另一實施例中，調配物包含小於約3%的聚集AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。聚集度可例如藉由SEC分析來測

定。穩定性之其他實例提供於下文實例中。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質之特徵為，在約40°C下、在約5.0至約6.5（例如約5.5至約6.0）之pH值下、在約100 mg/ml濃度下以水性調配物儲存21天之後，DVD-Ig蛋白質中具有約10%或小於10%的單體相對(rel.)峰面積變化。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質之特徵為，在約5°C下、在約5.0至約6.5（例如約5.5至約6.0）之pH值下、在約100 mg/ml濃度下以水性調配物儲存21天之後，DVD-Ig蛋白質中具有約1%或小於1%單體相對峰面積變化。

在某些實施例中，在約5.0至約6.5（例如約5.5至約6.0）之pH值下、在約40°C下以水性調配物(以約100 mg/ml或大於100 mg/ml之濃度調配而成)加速儲存21天之後，LS-DVD-Ig蛋白質中觀測到超過約10%單體相對峰面積變化。

在某些實施例中，本發明之調配物為醫藥調配物，包括水性醫藥調配物或凍乾醫藥調配物。

本發明亦包括製備及使用AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質調配物的方法。在某些實施例中，調配物用於治療個體之病症。

本發明之另一實施例為鑑別AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質之方法。此等方法包括在包含DVD-Ig蛋白質、檸檬酸鹽/磷酸鹽緩衝液及高濃度DVD-Ig蛋白質(例如約50 mg/ml或大於50 mg/ml)之液體調配物加速儲存(例如在約40°C儲存14天)之後的聚集度測試(例如藉由SEC分析)。

【圖式簡單說明】

圖1顯示IgG1抗體(布雷單抗(Briakinumab))之DSC概況與DVD-Ig蛋白質(TNF/PGE2；DVD-B)之DSC概況比較的圖形說明，其分別顯示三區域展開相對於四區域展開的差異。所用DVD-Ig溶液之樣品組成爲1 mg/ml DVD-Ig蛋白質、1 mM離子強度組胺酸pH 6、1°C/分鐘掃

描速率。

圖2A顯示多種DVD-Ig蛋白質之血清穩定性之圖形說明。

圖2B顯示不同可變區域組合之域取向構思。

圖3顯示不同DVD-Ig蛋白質與高分子量(HMW)聚集物形成之藥物動力學參數之間之相關性的圖形說明。

圖4提供14種單株抗體及16種DVD-Ig蛋白質之熱力學比較的圖形說明，其顯示分子之解鏈溫度與各溫度下之分子數目(y軸)的關係。抗體之平均起始解鏈溫度為 $59.2^{\circ}\text{C} \pm 3.4^{\circ}\text{C}$ 。DVD-Ig蛋白質之平均起始解鏈溫度為 $53.6^{\circ}\text{C} \pm 3.6^{\circ}\text{C}$ 。

圖5以圖形描繪DVD-Ig蛋白質之莫耳橢圓率，如使用250 nm至320 nm波長之近UV-CD掃描所量測。

【實施方式】

I. 定義

術語「多價結合蛋白」用於表示包含兩個或兩個以上目標結合位點的結合蛋白。多價結合蛋白可經工程改造而具有三個或三個以上抗原結合位點，且通常不為天然存在之抗體。

術語「多特異性結合蛋白」係指能夠結合兩個或兩個以上相關或無關目標的結合蛋白。多價結合蛋白之一實例為雙重可變區域(DVD)結合蛋白，諸如DVD-IgTM。在某些實施例中，DVD結合蛋白包含兩個或兩個以上抗原結合位點且為四價或多價結合蛋白。DVD可為單特異性，亦即能夠結合一個目標，或多特異性，亦即能夠結合兩個或兩個以上目標。

術語「雙重可變區域免疫球蛋白」或「DVD-IgTM」或「DVD-Ig蛋白質」係指包含兩個重鏈DVD多肽及兩個輕鏈DVD多肽的DVD結合蛋白。DVD-Ig之每一半包含重鏈DVD多肽及輕鏈DVD多肽，及兩個目標結合位點。各結合位點包含重鏈可變區域及輕鏈可變區域，其

中總共6個CDR參與目標結合。DVD-Ig蛋白質中之各可變區域(VD)可獲自結合一或多種所要抗原或抗原決定基的一或多種「親本」單株抗體(mAb)。在某些實施例中，所得DVD-Ig分子均保持兩種親本mAb之活性。術語「DVD-Ig蛋白質」包涵下述術語AS-DVD-Ig蛋白質及LS-DVD-Ig蛋白質。

術語「穩定水性雙重可變區域免疫球蛋白」或「AS-DVD-Ig」或「AS-DVD-Ig蛋白質」係指DVD-Ig蛋白質之子組，其在指定溫度及時期(例如5°C或40°C維持14至21天)、在約1至約100 mg/ml (例如約1至10 mg/ml或約50至100 mg/ml)範圍內之濃度下及在約5.0至約6.5 (例如約5.5至約6.0)之pH值下經歷穩定性測試之後，其聚集度較低或其因物理降解所致之單體含量變化較小。可使用不同穩定性測試定義AS-DVD-Ig。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為一種DVD-Ig蛋白質，其在約5°C下、於經緩衝之水性調配物中、在約50 mg/ml至約100 mg/ml之濃度下及在約5.0至約6.5 (例如約5.5至約6.0)下儲存21天之後，如藉由SEC分析所測定，其具有約1%或小於1%單體相對峰面積變化。在某些實施例中，在約40°C下、於經緩衝之水性調配物中、在約50 mg/ml至約100 mg/ml之濃度下及在約5.0至約6.5 (例如約5.5至約6.0)下加速儲存21天之後，如藉由SEC分析所測定，AS-DVD-Ig蛋白質具有10%或小於10%單體相對(rel.)峰面積變化。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質之穩定性測試可藉由測試檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中具有50至100 mg/ml之DVD-Ig蛋白質濃度之溶液(pH值為5.0至6.5，例如約5.5至約6.0)之穩定性(例如單體損失)來進行。

術語「水性調配物」係指溶劑為水的液體溶液。在某些實施例中，術語「水性調配物」係指溶劑為水的液體調配物，其中該調配物未經預先凍乾(亦即並非由凍乾調配物復原產生)。

術語「穩定凍乾雙重可變區域免疫球蛋白」或「LS-DVD-Ig」或

「LS-DVD-Ig蛋白質」係指DVD-Ig蛋白質之子組，在液體狀態下，其具有較低聚集度或其單體變化程度(亦即單體損失)提高。可使用不同穩定性測試定義LS-DVD-Ig。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質以約1至100 mg/ml (例如約1至10 mg/ml或約50 mg/ml至100 mg/ml)調配成水性調配物、在約5.0至約6.5 (例如約5.5至約6.0)之pH值下、在約40°C加速儲存例如21天之後，其觀測到超過10%單體相對峰面積變化。DVD-Ig蛋白質可在含有檸檬酸鹽及磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液之水性調配物中測試。可根據此項技術中已知的方法(包括(但不限於) SEC)測定單體變化。在某些實施例中，加速儲存條件包括在約40°C下避光儲存DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在約40°C加速儲存14天之後，如藉由SEC分析所測定，其具有20%或小於20%單體相對峰面積變化，其中LS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中調配成濃度為至少50 mg/ml的水性調配物。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質之穩定性測試可藉由測試檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中具有約1至100 mg/ml (例如約1至10 mg/ml或約50 mg/ml至100 mg/ml)之DVD-Ig蛋白質濃度之溶液(pH值為約5.0至約6.5，例如約5.5至約6.0)之穩定性(例如單體損失)來進行。

術語「醫藥調配物」係指製劑所呈形式允許活性成分之生物活性具有有效性且因此可向個體投與用於治療性用途。在某些實施例中，本發明提供包含AS-DVD-Ig之水性醫藥調配物。在其他實施例中，本發明提供包含LS-DVD-Ig的凍乾醫藥調配物。

「穩定」調配物為儲存時DVD-Ig蛋白質基本上保持其物理穩定性及/或化學穩定性及/或生物活性的調配物。用於量測蛋白質穩定性之各種分析技術可於此項技術中獲得且評論於例如Peptide and Protein Drug Delivery, 第247頁-第301頁, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)及Jones (1993) Adv. Drug Delivery

Rev. 10: 29-90。在某些實施例中，DVD-Ig蛋白質之穩定性是根據溶液中單體蛋白質之百分比測定，其中蛋白質降解(例如片段化)及/或聚集的百分比較低。舉例而言，包含穩定DVD-Ig蛋白質的水性調配物可包括至少95%單體DVD-Ig蛋白質，例如AS-DVD-Ig蛋白質。或者，本發明之水性調配物可包括不超過5%的聚集及/或降解DVD-Ig蛋白質，例如AS-DVD-Ig蛋白質。

目測顏色及/或透明度時，或如藉由UV光散射或尺寸排阻層析法所量測，DVD-Ig蛋白質若實質上未顯示聚集、沈澱及/或變性跡象，則其在醫藥調配物中「保持物理穩定性」。在本發明之某些實施例中，穩定水性調配物為調配物中具有小於約10%聚集度及小於約5%AS-DVD-Ig蛋白質聚集度的調配物。

DVD-Ig蛋白質若在指定時間的化學穩定性使得該DVD-Ig蛋白質被認為仍保持如下文定義之生物活性，則其在醫藥調配物中「保持化學穩定性」。可藉由偵測及定量DVD-Ig之化學改變形式來評定化學穩定性。化學改變可包括尺寸修飾(例如修剪)，此可使用例如尺寸排阻層析法、SDS-PAGE及/或矩陣輔助雷射解吸電離/飛行時間質譜分析法(MALDI/TOF MS)加以評估。其他類型的化學改變包括電荷改變(例如作為脫醯胺作用之結果發生)，此可藉由例如離子交換層析法評估。

若醫藥調配物中之DVD-Ig蛋白質具有針對其預期目的之生物活性，則該蛋白質在醫藥調配物中「保持生物活性」。舉例而言，若DVD-Ig蛋白質於醫藥調配物中之生物活性為在製備醫藥調配物時所展現之生物活性的約30%、約20%或約10%(在分析之誤差內)以內(例如如抗原結合分析中所測定)，則DVD-Ig蛋白質保持生物活性。

如本文所用，術語「界面活性劑」係指具有兩性結構的有機物質；亦即，其由溶解性傾向相反之基團(通常為油溶性烴鏈及水溶性

離子基)組成。視表面活性部分之電荷而定，界面活性劑可分類為陰離子性、陽離子性及非離子性界面活性劑。界面活性劑常常作為濕潤劑、乳化劑、增溶劑及分散劑用於各種醫藥組合物及生物材料製劑。適合界面活性劑之實例包括(但不限於)月桂基硫酸鈉；聚山梨醇酯，諸如聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯、單月桂酸酯、單棕櫚酸酯、單硬脂酸酯或聚氧乙烯脫水山梨糖醇之另一酯(例如市售Tweens™，諸如Tween™ 20及Tween™ 80 (ICI Speciality Chemicals))；二辛基磺基丁二酸鈉(DOSS)；卵磷脂；硬脂醇；鯨蠟硬脂醇；膽固醇；聚氧乙烯蓖麻素油；聚氧乙烯脂肪酸甘油酯；泊洛沙姆(例如泊洛尼克F68™及F108™，其為環氧乙烷與環氧丙烷之嵌段共聚物)；聚氧乙烯蓖麻油衍生物或其混合物。在某些實施例中，本發明之調配物包含聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60或聚山梨醇酯80。

術語「張力調節劑」或「張力劑」係指可用於調整液體調配物之張力的化合物。張力調節劑之實例包括甘油、乳糖、甘露糖醇、葡萄糖、氯化鈉、硫酸鎂、氯化鎂、硫酸鈉、山梨糖醇、海藻糖、蔗糖、棉子糖、麥芽糖，及熟習此項技術者或一般技術者已知的其他張力調節劑。

術語「多元醇」係指具有多個羥基的物質，且包括糖(還原及非還原糖)、糖醇及糖酸。在某些實施例中，多元醇具有小於約600 kD(例如在約120 kD至約400 kD範圍內)的分子量。「還原糖」為含有游離醛或酮基且可還原金屬離子或與蛋白質中之賴胺酸及其他胺基共價反應的糖。「非還原糖」為缺乏游離醛或酮基且不被溫和氧化劑(諸如費林氏(Fehling's)或本迪克氏(Benedict's)溶液)氧化的糖。還原糖之實例為果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖及葡萄糖。非還原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖(melezitose)及棉子糖。甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、蘇糖醇、山梨

糖醇及甘油為糖醇之實例。就糖酸而言，其包括L-葡糖酸鹽及其金屬鹽。多元醇亦可充當張力劑。在本發明之某些實施例中，調配物之一種成分為濃度約10至約70 mg/ml之山梨糖醇。在本發明之一特定實施例中，山梨糖醇濃度為約30至約50 mg/ml。在某些實施例中，蔗糖濃度為約60至約100 mg/ml。在本發明之一特定實施例中，蔗糖濃度為約70至約90 mg/ml。

術語「緩衝液」係指藉由酸鹼結合物組分的作用抵抗pH值變化的緩衝溶液。本發明中所用之緩衝液具有約4.5至約7.5範圍內之pH值。將pH值控制在此範圍內之緩衝液之實例包括乙酸鹽(例如乙酸钠)、丁二酸鹽(諸如丁二酸钠)、葡糖酸鹽、甲硫胺酸、咪唑、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽、檸檬酸鹽及磷酸鹽、Tris，及其他有機酸緩衝液。在某些實施例中，本發明調配物中所用之緩衝液為組胺酸、甘胺酸、精胺酸、乙酸鹽、檸檬酸鹽及/或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。

「復原」調配物為藉由將凍乾蛋白質調配物溶解於稀釋劑中所製備且使得蛋白質分散於復原調配物中之調配物。復原調配物適於投與(例如非經腸投與)待用所關注蛋白質(例如LS-DVD-Ig)治療的患者。

本文中之所關注「稀釋劑」為醫藥學上可接受(對於向人類投與而言安全且無毒)且適用於製備液體調配物(諸如凍乾之後復原的調配物)的稀釋劑。例示性稀釋劑包括無菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH值緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝鹽水)、無菌鹽水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。在一替代性實施例中，稀釋劑可包括鹽之水溶液及/或緩衝液。

結合蛋白之「治療有效量」或「有效量」係指有效預防或治療可用抗體有效治療之病症的量。

術語「病症」係指受益於本發明調配物治療的任何病狀。此包

括慢性及急性病症或疾病，包括使個體易患所述病症的彼等病理學病狀。

術語「治療」係指治療性治療與預防性或防治性措施。需要治療之彼等患者包括已患該病症者以及欲預防該病症者。

術語「非經腸投與」(「parenteral administration」及「administered parenterally」)意謂除經腸投與及局部投與外的投與模式，一般藉由注射投與，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內及胸骨內注射及輸注。「全身性投與」及「周邊投與」一詞意謂化合物、藥物或其他材料除直接向中樞神經系統投與外的投與，以使得其進入患者全身且經歷代謝及其他類似過程，例如皮下投與。

術語「抗體」泛指保留Ig分子之基本目標結合特徵之免疫球蛋白(Ig)分子，其通常包含四條多肽鏈(兩條重鏈(H)及兩條輕鏈(L))或其任何功能性片段、突變體、變異體或衍生物。

在全長抗體中，各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個區域：CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個區域CL。VH及VL區可進一步細分成超變區，稱為互補決定區(CDR)，其中散置有更保守區域，稱為構架區(FR)。各VH及VL由三個CDR及四個FR組成，其自胺基末端至羧基末端依如下次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可具有任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)及類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類。

術語「Fc區」意謂免疫球蛋白重鏈之C末端區域，其可藉由木瓜蛋白酶消化完整抗體而產生。Fc區可為原生序列Fc區或變異序列Fc

區。免疫球蛋白Fc區通常包含兩個恆定區域：CH2區域及CH3區域，且視情況包含CH4區域。

術語「抗原結合部分」係指特異性結合至目標或抗原之結合蛋白的一或多個片段。此等實施例可為單特異性，或可為雙特異性、雙重特異性或多特異性(可特異性結合兩種或兩種以上不同抗原)。

結合蛋白之「功能性抗原結合位點」為能夠結合目標抗原的結合位點。功能性抗原結合位點之抗原結合親和力不一定與抗原結合位點所來源之親本抗體一樣強，但結合抗原的能力必須為可量測的(使用評估抗體結合至抗原的已知方法)。此外，多價結合蛋白之各功能性抗原結合位點之抗原結合親和力在定量上不必相同。

術語「連接子」表示包含兩個或兩個以上經肽鍵連接之胺基酸殘基的多肽，該等肽鍵用於連接一或多個抗原結合部分。此等連接子多肽在此項技術中已熟知(參見例如Holliger等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak等人 (1994) *Structure* 2:1121-1123)。

「免疫球蛋白恆定區域」係指重鏈或輕鏈恆定區域。人類重鏈及輕鏈(例如IgG)恆定區域胺基酸序列在此項技術中已知。

術語「單株抗體」係指獲自實質上均質抗體群體的抗體，亦即除可少量存在之可能天然存在之突變外，構成群體之個別抗體相同。單株抗體具有針對單一抗原的高度特異性。此外，與典型地包括針對不同抗原決定基之不同抗體的多株抗體製劑對比，各單株抗體是針對抗原上之單一抗原決定基。修飾語「單株」不應解釋為必需藉由任何特定方法產生抗體。

術語「人類抗體」包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。人類抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或定點突變誘發或藉

由活體內體細胞突變所引入的突變)。然而，術語「人類抗體」不欲包括CDR序列來源於其他哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系之CDR序列已移植至人類構架序列上的抗體。

術語「嵌合抗體」意謂包含來自一個物種之重鏈及輕鏈可變區序列及來自另一物種之恆定區序列的抗體，諸如具有鼠科重鏈及輕鏈可變區與人類恆定區相連接的抗體。

術語「CDR移植抗體」意謂包含來自一個物種之重鏈及輕鏈可變區序列，但其VH及/或VL之一或多個CDR區之序列經另一物種之CDR序列置換的抗體，諸如人類重鏈及輕鏈可變區中之一或多個鼠科CDR(例如CDR3)已經鼠科CDR序列置換的抗體。

術語「人類化抗體」意謂包含來自非人類物種(例如小鼠)之重鏈及輕鏈可變區序列，但VH及/或VL序列之至少一部分已改變而更「似人類」(亦即更類似於人類生殖系可變序列)的抗體。一種類型的人類化抗體包含非人類CDR序列及人類構架序列。

術語「CDR」意謂抗體可變序列內的互補決定區。重鏈及輕鏈之各可變區中存在三個CDR，對於各可變區而言均可指定為CDR1、CDR2及CDR3。如本文所用之術語「CDR組」係指存在於能夠結合目標之單一可變區中的一組三個CDR。此等CDR之確切界限已根據不同系統加以不同地定義。

術語「Kabat編號」、「Kabat定義」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。此等術語係指對可變性超過(亦即高變)抗體或其抗原結合部分之重鏈及輕鏈可變區中之其他胺基酸殘基之胺基酸殘基進行編號的系統(Kabat等人 (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391及Kabat等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美國健康及人類服務部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH Publication No. 91-3242)。對於重鏈可變區，高變區範圍對於

CDR1而言通常為胺基酸位置31至35，對於CDR2而言為胺基酸位置50至65，且對於CDR3而言為胺基酸位置95至102。對於輕鏈可變區，高變區範圍對於CDR1而言通常為胺基酸位置24至34，對於CDR2而言為胺基酸位置50至56，且對於CDR3而言為胺基酸位置89至97。

Chothia及同事(Chothia及Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917及Chothia等人(1989) *Nature* 342:877-883)發現，Kabat CDR內之某些子部分採用幾乎相同的肽主鏈構形，儘管在胺基酸序列層面上具有很大多樣性。此等子部分指定為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」及「H」分別表示輕鏈及重鏈區域。此等區域可稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊的界限。界定與Kabat CDR重疊之CDR的其他界限已描述於Padlan (1995) *FASEB J.* 9:133-139及MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262(5):732-45中。其他CDR界限定義可能不嚴格依循上述系統之一，但仍然與Kabat CDR重疊，雖然其可根據特定殘基或特定類殘基或甚至整個CDR不顯著影響抗原結合的預測或實驗結論加以縮短或延長。雖然實施例使用Kabat或Chothia所定義之CDR，但本文所用方法可利用根據任一此等系統所定義之CDR。

術語「構架」或「構架序列」係指可變區減去CDR的剩餘序列。因為CDR序列之確切定義可藉由不同系統確定，所以構架序列含義遵循相應不同的解釋。六個CDR (重鏈之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3，及輕鏈之CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3)亦將輕鏈及重鏈上之構架區在各鏈上劃分成四個區域(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位於FR1與FR2之間，CDR2位於FR2與FR3之間，且CDR3位於FR3與FR4之間。術語「活性」包括DVD-Ig蛋白質對於兩種或兩種以上抗原的活性，諸如結合特異性及結合親和力。

術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合至免疫球蛋白或T細胞受體的任何多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括依

化學活性表面分類之分子，諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且在某些實施例中，可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。在某些實施例中，抗原決定基為由抗體或多特異性結合蛋白結合的抗原區域。

術語「表面電漿子共振」或「SPR」係指允許例如使用BIAcore系統(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden及Piscataway, N.J.)偵測生物感測基質內之蛋白質濃度變化來分析即時生物特異性相互作用的光學現象。更多描述參見Jonsson等人 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson等人 (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Jonsson等人 (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; 及Jonsson等人 (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

術語「 K_{on} 」係指如此項技術中所知，結合蛋白與抗原締合形成結合蛋白/抗原複合物的締合速率常數。

術語「 K_{off} 」係指如此項技術中所知，結合蛋白自結合蛋白/抗原複合物中解離的解離速率常數。

術語「 K_d 」係指如此項技術中所知，特定抗體-抗原相互作用之解離常數。

如本文所用，提及結合蛋白與第二化學物質相互作用時，術語「特異性結合」意謂相互作用依賴於化學物質上存在特定結構(例如抗原決定子或抗原決定基)；例如DVD-Ig蛋白質識別且結合至特定蛋白質結構，而非一般蛋白質。若DVD-Ig蛋白質對於抗原決定基「A」具有特異性，則含有所標記「A」及DVD-Ig蛋白質的反應物中存在含有抗原決定基A (或未標記之自由A)的分子將使結合至DVD-Ig蛋白質之所標記A的量減少。

II. 用於本發明調配物中的雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-Ig)蛋白質

本發明係關於DVD-Ig蛋白質(尤其是鑑別為AS-DVD-Ig蛋白質或

LS-DVD-Ig蛋白質(下文更詳細地描述)之DVD-Ig蛋白質)之調配物及其用途。

A. 一般DVD-Ig蛋白質結構

在某些實施例中，本發明之調配物及方法中所用的DVD-Ig蛋白質包含多肽鏈，其中該多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一可變區域，VD2為第二可變區域，C為恆定區域，X1表示胺基酸或多肽，X2表示Fc區且n為0或1。

在某些實施例中，DVD-Ig蛋白質含有兩條多肽鏈，其中第一多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域，VD2為第二重鏈可變區域，C為重鏈恆定區域，X1為連接子，限制條件為其不為CH1，且X2為Fc區；且第二多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域，VD2為第二輕鏈可變區域，C為輕鏈恆定區域，X1為連接子，限制條件為其不為CH1，且X2不包含Fc區；且n為0或1；且其中該結合蛋白之該兩條多肽鏈形成兩個功能性抗原結合位點。

在某些實施例中，DVD-Ig蛋白質含有四條多肽鏈，其中兩條多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域，VD2為第二重鏈可變區域，C為重鏈恆定區域，X1為連接子，限制條件為其不為CH1，且X2為Fc區；且兩條多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域，VD2為第二輕鏈可變區域，C為輕鏈恆定區域，X1為連接子，限制條件為其不為CH1，且X2不包含Fc區；且n為0或1；且其中該結合蛋白之該等四條多肽鏈形成四個功能性抗原結合位點。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含多肽鏈，其中該多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為

連接子，限制條件爲其不爲CH1；X2爲Fc區；且n爲0或1。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含多肽鏈，其中該多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1爲第一輕鏈可變區域；VD2爲第二輕鏈可變區域；C爲輕鏈恆定區域；X1爲連接子，限制條件爲其不爲CH1或CL；X2不包含Fc區；且n爲0或1。在另一實施例中，重鏈及/或輕鏈上之(X1)_n爲(X1)₀及/或重鏈及/或輕鏈上之(X2)_n爲(X2)₀。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含第一及第二多肽鏈，其中第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1爲第一重鏈可變區域；VD2爲第二重鏈可變區域；C爲重鏈恆定區域；X1爲第一連接子，限制條件爲其不爲CH2；X2爲Fc區；n爲0或1；且其中第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1爲第一輕鏈可變區域；VD2爲第二輕鏈可變區域；C爲輕鏈恆定區域；X1爲第二連接子，限制條件爲其不爲CH1或CL；X2不包含Fc區；且n爲0或1。在某些實施例中，第一多肽鏈之VD1及第二多肽鏈之VD1分別來自於不同的第一及第二親本抗體，或其結合部分。在某些實施例中，第一多肽鏈之VD2及第二多肽鏈之VD2分別來自於不同的第一及第二親本抗體，或其結合部分。在某些實施例中，第一及第二親本抗體結合相同目標或不同目標上的不同抗原決定基。在某些實施例中，第一親本抗體或其結合部分結合第一目標的效能不同於第二親本抗體或其結合部分結合第二目標的效能。在某些實施例中，第一親本抗體或其結合部分結合第一目標的親和力不同於第二親本抗體或其結合部分結合第二目標的親和力。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含兩條第一多肽鏈及兩條第二多肽鏈。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含第一及第二多肽鏈，各獨立地包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一可變區域；VD2為第二可變區域；C為恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1，其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。在另一實施例中，第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1；且其中第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域；VD2為第二輕鏈可變區域；C為輕鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2不包含Fc區；n為0或1，其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質包含第一及第二多肽鏈，各獨立地包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一可變區域；VD2為第二可變區域；C為恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1，且其中第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。在另一實施例中，第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變區域；VD2為第二重鏈可變區域；C為重鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2為Fc區；n為0或1；且其中第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變區域；VD2為第二輕鏈可變區域；C為輕鏈恆定區域；X1為連接子，限制條件為其不為CH1；X2不包含Fc區；n為0或1，其中第一及第二多

肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

DVD-Ig蛋白質之實例描述於美國專利第7,612,181號中，該專利以引用的方式併入本文中。

可用於本發明之方法及組合物中之DVD-Ig蛋白質之實例描述於下文中，包括表58及表65。可用於本發明之方法及組合物中之DVD-Ig蛋白質之其他實例描述於SEQ ID NO: 28至75。

B. 產生DVD-Ig蛋白質

DVD-Ig蛋白質之可變區域可獲自親本抗體，包括能夠結合所關注目標的多株抗體及單株抗體。此等抗體可為天然存在之抗體或可藉由重組技術產生。可用於產生DVD-Ig蛋白質之抗體實例包括嵌合抗體、人類抗體及人類化抗體。單株抗體可使用此項技術中已知的多種技術製備，包括例如使用融合瘤、重組及噬菌體呈現技術，或其任何組合。亦可藉由用所關注抗原使包含一些或所有人類免疫球蛋白基因座的非人類動物(諸如XENOMOUSE™轉殖基因小鼠、經工程改造而包含人類免疫球蛋白基因座之較大片段且在小鼠抗體產生方面存在缺陷的小鼠品系)免疫來產生單株抗體。產生DVD-Ig蛋白質之方法描述於美國專利第7,612,181號中，該專利之教示內容以引用的方式併入本文中。本發明之組合物及方法中所用的DVD-Ig蛋白質可由能夠結合特定目標且此項技術中熟知的抗體產生。此等抗體包括(但不限於)抗TNF抗體(美國專利第6,258,562號)、抗IL-12及/或抗IL-12p40抗體(美國專利第6,914,128號)；抗IL-18抗體(美國專利公開案第20050147610號)，以及抗C5、抗CBL、抗CD147、抗gp120、抗VLA4、抗CD11a、抗CD18、抗VEGF、抗CD40L、抗Id、抗ICAM-1、抗CXCL13、抗CD2、抗EGFR、抗TGF- β 2、抗E-選擇素、抗Fact VII、抗Her2/neu、抗F gp、抗CD11/18、抗CD14、抗ICAM-3、抗CD80、抗CD4、抗

CD3、抗CD23、抗 $\beta 2$ -整合素、抗 $\alpha 4\beta 7$ 、抗CD52、抗HLA DR、抗CD22、抗CD20、抗MIF、抗CD64 (FcR)、抗TCR $\alpha\beta$ 、抗CD2、抗Hep B、抗CA 125、抗EpCAM、抗gp120、抗CMV、抗gpIIbIIIa、抗IgE、抗CD25、抗CD33、抗HLA、抗VNR整合素、抗IL-1 α 、抗IL-1 β 、抗IL-1受體、抗IL-2受體、抗IL-4、抗IL4受體、抗IL5、抗IL-5受體、抗IL-6、抗IL-8、抗IL-9、抗IL-13、抗IL-13受體、抗IL-17及抗IL-23抗體(參見Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731-6及Clark「Antibodies for Therapeutic Applications,」 Department of Pathology, Cambridge University, UK (2000), 在 Department of Pathology, Cambridge University網站M. Clark之主頁線上公開)。

親本單株抗體亦可選自獲准用於臨床試驗中或針對臨床使用開發之各種治療性抗體。此等治療性抗體包括(但不限於)：利妥昔單抗(rituzimab) (RITUXANTM Biogen Idec, Genentech/Roche) (參見例如美國專利第5,736,137號)，獲准治療非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之嵌合抗CD20抗體；奧法木單抗(ofatumumab) (HUMAX-CD20TM Genmab, GlaxoSmithKlein) (描述於美國專利5,500,362中)，獲准治療氟達拉濱(fludarabine)及阿來組單抗(alemtuzumab)難治之慢性淋巴細胞性白血病的抗CD20抗體；AME-133v (Mentrik Biotech)，抗CD20抗體；維妥珠單抗(veltuzumab) (hA20) (Immunomedics)，抗CD20抗體；HumaLYM (Intracel)；PRO70769 (Genentech/Roche) (PCT/US2003/040426)，抗CD20抗體；曲妥珠單抗(trastuzumab) (HERCEPTINTM Genentech/Roche) (描述於美國專利第5,677,171號)，獲准治療乳癌之人類化抗Her2/neu抗體；帕妥珠單抗(pertuzumab) (rhuMab-2C4, OMNITARGTM Genentech/Roche) (描述於美國專利第4,753,894號)；西妥昔單抗(cetuximab) (ERBITUXTM Imclone) (描述於美國專利第4,943,533號；PCT WO 96/40210)，獲准治療結腸直腸癌

及頭頸癌之嵌合抗EGFR抗體；盤尼圖單抗(panitumumab) (ABX-EGF VECTIBIX® Amgen) (描述於美國專利第6,235,883號)，獲准治療結腸直腸癌之抗EGFR抗體；紫蘆木單抗(zalutumumab) (HUMAX-EGFR™ Genmab) (描述於美國專利申請案第10/172,317號)，抗EGFR抗體；EMD55900 (Mab 425 Merck)，抗EGFR抗體；EMD62000及EMD72000 (Mab 425 Merck)，抗EGFR抗體(描述於美國專利第5,558,864號；Murthy等人 (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-60; Rodeck等人 (1987) J. Cell. Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough等人 (1991) Protein Eng. 4(7):773-83)；ICR62 (Institute of Cancer Research)，抗EGFR抗體(描述於PCT公開案第WO 95/20045號；Modjtahedi等人 (1993) J. Cell. Biophys. 22(1-3):129-46；Modjtahedi等人 (1993) Br. J. Cancer 67(2):247-53；Modjtahedi等人 (1996) Br. J. Cancer 73(2):228-35；Modjtahedi等人 (2003) Int. J. Cancer 105(2):273-80)；尼妥珠單抗(nimotuzumab) (TheraCIM hR3, THERALOC® YM Biosciences, Oncoscience AG) (描述於美國專利第5,891,996號；美國專利第6,506,883號；Mateo等人 (1997) Immunotechnol. 3(1):71-81)，抗EGFR抗體；ABT-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth等人 (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(2):639-44)，抗EGFR抗體；KSB-102 (KS Biomedix)；MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT公開案第WO 0162931A2號)，抗EGFRvIII抗體；SC100 (Scancell) (PCT公開案第WO 01/88138號)，抗EGFR抗體；阿來組單抗(CAMPATH™ Genzyme/Sanofi)，獲准治療B細胞慢性淋巴細胞性白血病的抗CD52抗體；莫羅單抗-CD3 (muromonab-CD3) (Orthoclone OKT3™ Johnson and Johnson)，獲准治療器官移植排斥反應之抗CD3抗體；替坦異貝莫單抗(ibritumomab tiuxetan) (ZEVALIN™ Spectrum Pharmaceuticals)，獲准治療非霍奇金

氏淋巴瘤的抗CD20抗體；吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin) (hP67.6 MYLOTARGTM Pfizer)，抗CD33抗體與卡奇黴素(calicheamicin)之結合物；阿法賽特(alefacept) (AMEVIVETM Astellas Pharma)，抗CD2 LFA-3 Fc融合物；阿昔單抗(abciximab) (REOPROTM Centocor Ortho Biotech Products, Lilly)，獲准作為經皮冠狀動脈介入術之佐劑預防心臟缺血的嵌合人類-小鼠抗糖蛋白IIb/IIIa受體及抗玻璃蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 受體抗體；巴利昔單抗(basiliximab) (SIMULECTTM Novartis)，獲准治療器官移植排斥反應之抗CF25抗體；帕利珠單抗(palivizumab) (SYNAGISTM Medimmune)，獲准治療RSV感染之針對RSV之F蛋白之A抗原性位點的抗體；英利昔單抗(infliximab) (REMICADETM Janssen Biotech)，獲准治療克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、關節炎、僵直性脊椎炎、牛皮癬性關節炎及斑塊狀牛皮癬的抗TNF α 抗體；阿達木單抗(adalimumab) (HUMIRATM AbbVie)，獲准治療類風濕性關節炎、幼年型特異性關節炎、牛皮癬性關節炎、僵直性脊椎炎、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、斑塊狀牛皮癬之抗TNF α 抗體；CDP571 (HUMICADETM Celltech, Biogen IDEC)，抗TNF α 抗體；依那西普(etanercept) (ENBRELTM Amgen, Pfizer)，獲准治療類風濕性關節炎、幼年型特異性關節炎、牛皮癬性關節炎、僵直性脊椎炎、斑塊狀牛皮癬之抗TNF α Fc融合抗體；聚乙二醇化賽妥珠單抗(certolizumab pegol) (CIMZIA)UCB Pharma)，獲准治療類風濕性關節炎及克羅恩氏病的抗TNF α 抗體；優特克單抗(ustekinumab) (STELARA Janssen Biotech)，獲准治療斑塊狀牛皮癬之IL-12及 IL-23抗體之人類抗p40子單元；加利昔單抗(galilimomab) (ABX-CBL Abgenix)，小鼠抗CD147抗體；ABX-IL8 (Abgenix)，抗IL8抗體；ABX-MA1 (Abgenix)，抗MUC18抗體；派妥莫單抗(pemtumomab) (Theragyn, R1549, 90Y-muHMFGLAntisoma)，

小鼠抗MUC1-鉍90抗體結合物；Therex (R1550 Antisoma)，抗MUC1抗體；AngioMab (muBC-1, AS1405 Antisoma) f；HuBC-1 (Antisoma)；硫鉬(Thioplantin) (AS1407 Antisoma)；那他珠單抗(natalizumab) (TYSABRI® Biogen Idec, Elan)，獲准治療多發性硬化症及克羅恩氏病的抗 $\alpha 4$ 整合素抗體；VLA-1 (Santarus)，人類化抗VLA-1抗體；LTBR mAb (Biogen Idec)，抗淋巴毒素 β 受體抗體；樂德木單抗(lerdelimumab) (CAT-152 Cambridge Antibody Technology/Abbott)，抗TGF- $\beta 2$ 抗體；布雷單抗(AbbVie)，抗IL-12及 23抗體；美替木單抗(metelimumab) (CAT-192 Cambridge Antibody Technology, Genzyme)，抗TGF $\beta 1$ 抗體；柏替木單抗(bertilimumab) (CAT - 213, iCO - 008 Cambridge Antibody Technology, iCo Therapeutics, Immune Pharmaceuticals)，抗嗜酸粒細胞趨化蛋白1抗體；貝利木單抗(belimumab) (BENLYSTA® GlaxoSmithKline)，獲准治療全身性紅斑性狼瘡症之抗B淋巴細胞刺激蛋白抗體；馬帕木單抗(HGS-ETR1 Cambridge Antibody Technology, Human Genome Sciences)，抗TRAIL-R1抗體；貝伐株單抗(bevacizumab) (AVASTIN™ Genentech/Roche)，獲准治療轉移性結腸直腸癌、非鱗狀非小細胞肺癌、神經膠母細胞瘤、轉移性腎細胞癌之抗-VEGF抗體；抗HER3/EGFR抗體(Genentech/Roche)；抗組織因子抗體(Genentech/Roche)；奧馬珠單抗(omalizumab) (XOLAIR™ Genentech/Roche, Novartis)，獲准治療嚴重過敏性哮喘的抗IgE抗體；依法利珠單抗(efalizumab) (RAPTIVA™ Genentech/Roche, Merck Serono)，抗CD11a抗體；MLN-02 (Millenium, Genentech/Roche)，抗 $\alpha 4\beta 7$ 整合素抗體；紫諾利單抗(zanolimumab) (HUMAX CD4™ Emergent BioSolutions)，抗CD4抗體；HUMAX-IL15™ (AMG-714 Genmab, Amgen)，抗IL15抗體；HuMax-IL8 (HUMAX-Inflam™, MDX-018 Genmab, Cormorant

Pharmaceuticals), 抗IL8抗體; HUMAXTM-癌症(Genmab, Medarex, Oxford GlycoSciences), 抗肝素酶I抗體; HUMAXTM-淋巴瘤(Genmab), 抗IL8抗體; HUMAXTM-TAC (Genmab), 抗IL-2R α , CD25抗體; 達拉木單抗(daratumumab) (HuMax[®]-CD38, Genmab, Janssen Biotech), 抗CD38抗體; 托拉珠單抗(toralizumab) (IDEC-131 Biogen Idec), 抗CD40L抗體; 克萊利單抗(clenolimimab) (IDEC-151 Biogen Idec), 抗CD4抗體; 格拉希單抗(glaiximab) (IDEC-114 Biogen Idec), 抗CD80抗體; 魯昔單抗(lumilixmab) (IDEC-152 Biogen Idec), 抗CD23; 抗巨噬細胞遷移因子(MIF)抗體(Biogen Idec, Taisho Pharmaceutical); 米妥莫單抗(mitumomab) (BEC2 Imclone), 小鼠抗個體基因型抗體; IMC-1C11 (Imclone), 嵌合抗VEGFR2抗體; DC101 (Imclone)鼠科抗VEGFR2抗體; 抗VE鈣黏附蛋白抗體(Imclone); 拉貝珠單抗(labetuzumab) (CEA-CIDETM Immunomedics), 抗癌胚抗原抗體; 依帕珠單抗(epratuzumab) (LYMPHOCIDETM Immunomedics), 抗CD22抗體; 釷(⁹⁰Y)替曲薩坦塔卡珠單抗(yttrium (⁹⁰Y) tacatuzumab tetraxetan) (AFP-Cide[®] Immunomedics), 抗甲胎蛋白抗體; 米拉珠單抗(milatumumab) (MyelomaCide[®] Immunomedics), 抗CF74抗體; LeukoCide[®] (Immunomedics); ProstaCide[®] (Immunomedics); 艾匹木單抗(ipilimumab) (YervoyTM, MDX-010 Bristol-Myers Squibb), 獲准治療黑色素瘤之抗CTLA4抗體; 艾拉木單抗(iratumumab) (MDX-060 Medarex), 抗CD30抗體; MDX-070 (Medarex), 抗前列腺特異性膜抗原; OSIDEMTM (IDM-1 Medarex, Immuno-Designed Molecules), 抗Her2抗體; HUMAXTM -CD4, Medarex及Genmab開發之抗CD4抗體; HuMax-IL15, Medarex及Genmab開發之抗IL15抗體; 果利木單抗(golimumab) (SIMPONITM Janssen Biotech), 獲准治療類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、僵直性脊椎炎之抗TNF α 抗體; 優特克單抗

(ustekinumab) (STELARA[®], CNTO 1275 Janssen Biotech), 獲准治療斑塊狀牛皮癬之抗IL-12抗體; MOR101及MOR102 (MorphoSys)抗細胞間黏附分子1 (ICAM-1) (CD54)抗體; MOR201 (MorphoSys), 抗纖維母細胞生長因子受體3抗體; 維斯珠單抗(visilizumab) (NUVION[™] PDL BioPharma), 抗CD3抗體; 馮利珠單抗(fontolizumab) (HUZAF[™] PDL BioPharma), 抗INF γ 抗體; 沃羅希單抗(volociximab) (M200 PDL BioPharma, Biogen Idec), 抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體; SMART[®] IL-12 (PDL BioPharma), 抗IL-12; ING-1 (Xoma), 抗Ep-CAM抗體; 奧馬珠單抗(omalizumab) (XOLAIR[™] Genentech/Roche, Novartis), 獲准治療過敏性哮喘的抗IgE抗體; MLN01 (Xoma), 抗 β 整合素抗體; 及妥希珠單抗(tocilizumab) (ACTEMRA[™] Genentech/Roche), 獲准治療類風濕性關節炎及全身性幼年型特異性關節炎的抗IL6抗體。

C. 建構DVD-Ig蛋白質

DVD-Ig蛋白質係由兩個重鏈DVD多肽與兩個輕鏈DVD多肽組合而形成。雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-Ig)重鏈包含直接或藉由連接子、隨後之恆定區域CH1及Fc區串聯連接的兩個重鏈可變區域(VH)。雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-Ig)輕鏈經設計而使得來自兩種親本mAb之兩個輕鏈可變區域(VL)直接或經由連接子、隨後之輕鏈恆定區域(CL)串聯連接(參見美國專利第7,612,181號之圖1A, 該專利以引用的方式併入本文中)。產生DVD-Ig蛋白質之方法亦描述於美國專利第7,612,181號中, 該專利以引用的方式併入本文中。

DVD-Ig蛋白質之可變區域可使用重組DNA技術自藉由上述任一種方法產生之親本抗體獲得。在某些實施例中, 可變區域為CDR移植或人類化重鏈或輕鏈可變區域。在某些實施例中, 可變區域為人類重鏈或輕鏈可變區域。

連接子序列可為單一胺基酸或多肽序列。可用於連接可變區域

之連接子序列的實例包括(但不限於) AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:1) ; AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:2) ; AKTTPKLGG (SEQ ID NO:3) ; SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:4) ; SAKTTP (SEQ ID NO:5) ; RADAAP (SEQ ID NO:6) ; RADAAPTVS (SEQ ID NO:7) ; RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:8) ; RADAAAA(G_{4s}).₄ (SEQ ID NO:9) ; SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:10) ; ADAAP (SEQ ID NO:11) ; ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:12) ; TVAAP (SEQ ID NO:13) ; TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:14) ; QPKAAP (SEQ ID NO:15) ; QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:16) ; AKTTPP (SEQ ID NO:17) ; AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO:18) ; AKTTAP (SEQ ID NO:19) ; AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:20) ; ASTKGP (SEQ ID NO:21) ; ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:22) ; GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:23) ; GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:24) ; GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:25) ; GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:26) ; 及GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 27)。連接子之其他實例描述於美國專利公開案第20100226923號中，該案以引用的方式併入本文中。連接子序列之選擇可根據若干抗體Fab分子之晶體結構分析來確定。Fab或抗體分子結構中之可變區域與CH1/CL恆定區域之間存在天然可撓性鍵聯。此天然鍵聯包含約10至12個胺基酸殘基，其中4至6個殘基來自V區域之C末端且4至6個殘基來自CL或CH1區域之N末端。分別使用CL或CH1之N末端5至6個胺基酸殘基或11至12個胺基酸殘基作為DVD-Ig蛋白質之輕鏈及重鏈中之連接子，產生本發明之DVD-Ig蛋白質。CL或CH1區域之N末端殘基(尤其是開頭5至6個胺基酸殘基)採用不含強二級結構的環構形，且因此可充當兩個可變區域之間的可撓性連接子。CL或CH1區域之N末端殘基為可變區域之天然延長部分，因為其為Ig序列之一部分，且因此使可能來源於連接子或

接合點之免疫原性降至最低。連接子之其他實例描述於表65中(參見加下劃線之胺基酸)。

其他連接子序列可包括CL或CH1區域之任何長度之序列，而非CL/CH1區域之所有殘基；例如CL或CH1區域之開頭5至12個胺基酸殘基；輕鏈連接子可來自C κ 或C λ ；且重鏈連接子可來源於任何同型CH1，包括C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ 及C μ 。連接子序列亦可來源於其他蛋白質，諸如Ig樣蛋白質(例如TCR、FcR、KIR)；基於G/S之序列(例如G4S重複單元)；來源於鉸鏈區之序列；及來自蛋白質之其他天然序列。

在某些實施例中，使用重組DNA技術將恆定區域連接至兩個所連接可變區域。舉例而言，包含所連接重鏈可變區域的序列連接至重鏈恆定區域且包含所連接輕鏈可變區域的序列連接至輕鏈恆定區域。在某些實施例中，恆定區域分別為人類重鏈恆定區域及人類輕鏈恆定區域。在某些實施例中，DVD-Ig重鏈進一步連接至Fc區。Fc區可包含原生Fc區序列或變異Fc區序列。在某些實施例中，Fc區為人類Fc區。舉例而言，Fc區包含來自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD之Fc區。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質為雙重特異性四價結合蛋白。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合CD20及CD80。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合VEGF及HER2。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合TNF及RANKL。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合TNF及DKK。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合CD20及RANKL。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合DLL4及

PLGF。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合DLL4及VEGF。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合TNF及SOST。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合IL-9及IgE。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合IL-12及IL-18。IL-12及IL-18 DVD-Ig蛋白質之實例描述於美國專利第7,612,181號中。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合TNF及IL-17。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合TNF及PGE2。PGE2 DVD-Ig蛋白質之實例提供於美國專利公開案第20100074900號中。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合IL-1 α 及IL-1 β 。IL-1 α 及IL-1 β DVD-Ig蛋白質之實例描述於美國專利第7,612,181號中。在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用的DVD-Ig蛋白質結合IL-4及IL-13。IL-4及IL-13 DVD-Ig蛋白質之實例描述於美國公開案第20100226923號中。上述專利及專利申請案中所述之DVD-Ig蛋白質之胺基酸及核酸序列以引用的方式併入本文中。可用於本發明之方法及組合物中之DVD-Ig蛋白質之胺基酸序列描述於SEQ ID NO: 28-75中。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合CD20/CD80，且包含與SEQ ID NO: 30及31中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗CD20/CD80 DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 30及31中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗CD20/CD80 DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 30及31中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合CD80/CD20，且包含與SEQ ID NO: 32及33中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗CD80/CD20

DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 32及33中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗CD80/CD20 DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 32及33中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合VEGF/HER2，且包含與SEQ ID NO: 34及35中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF/HER2-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 34及35中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF/HER2 DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 34及35中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合HER2/VEGF，且包含與SEQ ID NO: 36及37中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗HER2/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 36及37中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗HER2/VEGF DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 36及37中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/RANKL，且包含與SEQ ID NO: 38及39中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/RANKL-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 38及39中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/RANKL DVD-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 38及39中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合RANKL/TNF，且包含與SEQ ID NO: 40及41中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗RANKL/TNF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 40及41中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗RANKL/TNF DVD-Ig蛋白質包含

與SEQ ID NO: 40及41中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/DKK，且包含與SEQ ID NO: 42及43中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/DKK-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 42及43中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/DKK-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 42及43中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合DKK/TNF，且包含與SEQ ID NO: 44及45中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DKK/TNF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 44及45中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DKK/TNF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 44及45中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合CD20/RANKL，且包含與SEQ ID NO: 46及47中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗CD20/RANKL-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 46及47中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗CD20/RANKL-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 46及47中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合RANKL/CD20，且包含與SEQ ID NO: 48及49中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗RANKL/CD20-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 48及49中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗RANKL/CD20-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 48及49中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸

序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合DLL4/PLGF，且包含與SEQ ID NO: 50及51中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/PLGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 50及51中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/PLGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 50及51中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合PLGF/DLL4，且包含與SEQ ID NO: 52及53中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗PLGF/DLL4-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 52及53中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗PLGF/DLL4-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 52及53中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/SOST (S2)，且包含與SEQ ID NO: 54及55中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/SOST (S2)-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 54及55中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/SOST (S2)-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 54及55中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合SOST (S2)/TNF，且包含與SEQ ID NO: 56及57中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗SOST (S2)/TNF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 56及57中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗SOST (S2)/TNF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 56及57中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合IL-9 (S2)/IgE，且包含與SEQ ID NO: 58及59中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL-9 (S2)/IgE-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 58及59中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL-9 (S2)/IgE-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 58及59中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合IgE/IL-9 (S2)，且包含與SEQ ID NO: 60及61中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IgE/IL-9 (S2)-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 60及61中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IgE/IL-9 (S2)-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 60及61中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/IL-17，且包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/IL-17-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/IL-17-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/PGE2，且包含與SEQ ID NO: 64及65中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/PGE2-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 64及65中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/PGE2-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 64及65中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合IL-1 α /Ig-1 β ，且包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重

鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL-1 α /IL-1 β -Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL-1 α /IL-1 β -Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合DLL4/VEGF，且包含與SEQ ID NO: 28及29中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 28及29中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 28及29中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合DLL4/VEGF，且包含與SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合IL12/IL18，且包含與SEQ ID NO: 70及71中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL12/IL18-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 70及71中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL12/IL18-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 70及71中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

D. 表現DVD-Ig蛋白質

本發明之DVD-Ig蛋白質可藉由此項技術中已知的多種技術中之任一者產生。舉例而言，由宿主細胞表現，其中藉由標準技術將編碼DVD重鏈及DVD輕鏈的表現載體轉染至宿主細胞中。術語「轉染」

之各種形式欲涵蓋常用於將外源性DNA引入原核或真核宿主細胞中的多種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-聚葡萄糖轉染及其類似技術。

用於表現本發明之重組抗體的哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(包括dhfr-CHO細胞，描述於Urlaub及Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220，其使用DHFR選擇性標記，例如如Kaufman及Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621所述)及DG44或DUXB11細胞(Urlaub等人 (1986) *Som. Cell Molec. Genet.* 12:555; Haynes等人 (1983) *Nuc. Acid. Res.* 11:687-706; Lau等人 (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:1469-1475)；NS0骨髓瘤細胞；猴腎細胞株(例如CVI及COS，諸如COS 7細胞)；SP2細胞；人類胚腎(HEK)細胞，諸如HEK-293細胞；中國倉鼠纖維母細胞(例如R1610)；人類宮頸癌(例如HELA)；鼠科纖維母細胞(例如BALBc/3T3)；鼠科骨髓瘤(P3x63-Ag3.653；NS0；SP2/O)；倉鼠腎細胞株(例如HAK)；鼠科L細胞(例如L-929)；人類淋巴細胞(例如RAJI)；人類腎細胞(例如293及293T)。宿主細胞株通常市場有售(例如購自BD Biosciences, Lexington, Ky.; Promega, Madison, Wis.; Life Technologies, Gaithersburg, Md.)或來自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va.))。

當將編碼DVD-Ig蛋白質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足以允許宿主細胞表現DVD-Ig蛋白質或允許DVD-Ig蛋白質分泌進入培養基(其中生長宿主細胞)的時段來產生DVD-Ig蛋白質。可使用標準蛋白質純化方法自培養基中回收DVD-Ig蛋白質。

在用於重組表現DVD-Ig蛋白質的例示性系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染法將編碼DVD-Ig重鏈與DVD-Ig輕鏈之重組表現載體引入

dhfr-CHO細胞中。在重組表現載體內，DVD-Ig重鏈與輕鏈cDNA各可操作地連接至CMV強化子/AdMLP啟動子調控元件以驅動cDNA高量轉錄。重組表現載體亦帶有編碼DHFR之cDNA，從而可使用甲胺喋呤選擇/擴增法選擇已經載體轉染的CHO細胞。培養所選轉型宿主細胞以允許表現DVD-Ig重鏈及輕鏈且自培養基中回收完整DVD-Ig蛋白質。利用標準分子生物學技術製備重組表現載體，轉染宿主細胞，針對轉型進行選擇，培養宿主細胞且自培養基中回收DVD-Ig蛋白質。再另外，本發明提供一種合成本發明之DVD-Ig蛋白質的方法，此藉由在適合培養基中培養本發明之宿主細胞直至合成本發明之DVD-Ig蛋白質。該方法可進一步包含自培養基中分離DVD-Ig蛋白質。DVD-Ig蛋白質之重要特徵為，其可使用與習知抗體類似的方式產生及純化。

E.鑑別水性穩定DVD-Ig (AS-DVD-Ig)蛋白質及穩定凍乾DVD-Ig (LS-DVD-Ig)蛋白質的方法

一個意外且驚人的發現為，某一子組之DVD-Ig蛋白質(稱為AS-DVD-Ig蛋白質及LS-DVD-Ig蛋白質)在水性調配物中，甚至在高濃度下穩定，而大部分DVD-Ig蛋白質不穩定且有聚集傾向。另外，雖然已發現大部分DVD-Ig蛋白質在凍乾狀態下不穩定，但某一子組之DVD-Ig蛋白質(稱為LS-DVD-Ig蛋白質)穩定且使用本發明之調配物可成功地凍乾。顯然，鑑別為AS-DVD-Ig蛋白質的DVD-Ig蛋白質亦為LS-DVD-Ig蛋白質。另外，非AS-DVD Ig蛋白質可為LS DVD-Ig蛋白質。兩個子群之間的差別是基於儲存之後的聚集度或單體含量，如下文分析法中所述。一般而言，聚集度提高表示單體含量降低。

因此，在某些實施例中，本發明包含區分AS-DVD-Ig蛋白質與非AS-DVD-Ig蛋白質的方法。本發明亦包含區分LS-DVD-Ig蛋白質與非LS-DVD-Ig蛋白質的方法。在另一替代中，本發明提供區分AS-DVD-

Ig蛋白質與LS-DVD-Ig蛋白質的方法。鑑別之後，AS-DVD-Ig蛋白質及LS-DVD-Ig蛋白質可成功地調配成本發明之組合物，而非AS-DVD-Ig蛋白質及非LS-DVD-Ig蛋白質在此等調配物中不能保持穩定且傾向於發生聚集及/或單體含量降低。一般而言，聚集度提高表示單體含量降低。

在某些實施例中，可利用冷凍/解凍(例如-80°C/30°C)測試鑑別DVD-Ig蛋白質為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。此方法依賴於具有高濃度DVD-Ig蛋白質(例如100 mg/ml)之溶液中高分子量(HMW)物質之百分比的測定。在一個實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質定義為，F/T循環之後，如藉由SEC所測定，顯示1%或小於1% HMW物質(聚集物)(例如0.5%或小於0.5%聚集物)的DVD-Ig蛋白質。F/T循環包括將DVD-Ig蛋白質溶液冷凍，將該溶液解凍，及使用例如SEC分析測試所解凍溶液之聚集度。

在某些實施例中，DVD-Ig蛋白質之展開溫度可用於確定DVD-Ig蛋白質是否為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。如圖4中所述，顯示展開溫度小於約45°C之DVD-Ig蛋白質通常不鑑定為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。在某些其他實施例中，顯示展開溫度約45至50°C之DVD-Ig蛋白質不可能為AS-DVD-Ig蛋白質，但可能為LS-DVD-Ig蛋白質。在某些其他實施例中，顯示展開溫度高於50°C之DVD-Ig蛋白質通常被認為是AS-DVD-Ig蛋白質及LS-DVD-Ig蛋白質。此項技術中已知測定DVD-Ig蛋白質展開溫度的測試(亦參見描述熱力學測試的實例1)且通常在約5至約7 (例如約5.5至約6.5)之pH值下進行。

為了測定DVD-Ig蛋白質是否為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig，可進行儲存測試。舉例而言，儲存測試可在5°C或40°C，在1至100 mg/ml (例如約1-10 mg/ml或約50-100 mg/ml)範圍內之DVD-Ig蛋白質

濃度下進行14至21天。

在大於周圍溫度的溫度(例如40°C)下測試常常稱為加速條件。在某些實施例中，加速儲存條件包括在40°C下避光儲存DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，測試是基於溶液在高溫(例如40°C)及高濃度(例如50 mg/ml)下如藉由SEC所測定的DVD-Ig蛋白質聚集度。舉例而言，可使用檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液將DVD-Ig蛋白質調配成濃度為至少約50 mg/ml (例如50至100 mg/ml)的水性調配物，且在加速條件下儲存。加速條件可包括高於室溫之溫度，例如約35至約45°C之儲存溫度，維持長時間，例如約10至約21天。在某些實施例中，用於篩選AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質的加速儲存條件為在40°C溫度下、在50 mg/ml或大於50 mg/ml之DVD-Ig蛋白質濃度(例如約60 mg/ml或50至100 mg/ml)下儲存14天。在50 mg/ml或大於50 mg/ml濃度(例如50至100 mg/ml)下進行加速儲存測試之後，可測試溶液中之DVD-Ig蛋白質聚集跡象或單體含量變化。

在某些實施例中，DVD-Ig蛋白質可於具有5.0至6.5之pH值(例如約6之pH值)及約50 mg/ml至約100 mg/ml之濃度的緩衝溶液(例如組胺酸或檸檬酸鹽/磷酸鹽緩衝液)中測試以確定其是否為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。

顯然，較低程度之DVD-Ig蛋白質濃度(例如1 mg/ml)亦可用於測試蛋白質，其中較低程度之聚集度預期為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig。舉例而言，AS-DVD-Ig蛋白質為在1 mg/ml之濃度下以水性調配物在約40°C儲存21天之後聚集度為3%或小於3%的DVD-Ig。

蛋白質聚集度可根據此項技術中已知的方法測定，包括(但不限於)尺寸排阻層析法(SEC)。一般而言，聚集度提高表示單體含量降低，其亦可使用SEC分析測定。

在某些實施例中，在1至100 mg/ml，較佳約1至約10 mg/ml或約

50 mg/ml至約100 mg/ml之濃度下加速儲存之後，如藉由尺寸排阻層析法(SEC)分析所測定，若溶液中之DVD-Ig蛋白質聚集度為10%或小於10%，則認為該DVD-Ig蛋白質是AS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，在1至100 mg/ml (例如約1至約10 mg/ml或約50 mg/ml至約100 mg/ml)之濃度下加速儲存之後，如藉由SEC分析所測定，若溶液中之DVD-Ig蛋白質聚集度為6%或小於6%，則認為該DVD-Ig蛋白質是AS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，在1至100 mg/ml (例如約1至約10 mg/ml或約50 mg/ml至約100 mg/ml)之濃度下加速儲存之後，如藉由SEC分析所測定，若DVD-Ig蛋白質具有小於10%，或者小於9%、小於8%、小於7%、小於6%、小於5%、小於4%、小於3%、小於2%或小於1%聚集度，則認為該DVD-Ig蛋白質是AS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40℃)加速儲存14天之後具有小於8%聚集度的DVD-Ig。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40℃)加速儲存14天之後具有6%或小於6%聚集度的DVD-Ig。在另一實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40℃)加速儲存14天之後具有小於5%聚集度的DVD-Ig。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為以100 mg/ml之濃度於水性調配物中在約40℃儲存21天之後，具有10%或小於10%聚集度的DVD-Ig，或以50 mg/ml或大於50 mg/ml之濃度調配成水性調配物時，在約40℃加速儲存14天之後，具有10%或小於10%聚集度的DVD-Ig。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為以100 mg/ml之濃度於水性調配物中在約40℃儲存21天之後，具有10%或小於10%聚集度的DVD-Ig蛋白質，或者以100 mg/ml之濃度於水性調配物中，在約5℃儲存21天之後，具有1%或小於1%聚集度的DVD-Ig。或者，AS-DVD-Ig蛋白質為在1 mg/ml之濃度下以水性調配物在約5℃儲存21天之後具有1.5%或小於1.5%聚集度的DVD-Ig蛋白質，或在1 mg/ml之濃度下以

水性調配物在約40°C儲存21天之後具有3%或小於3%聚集度的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為以超過50 mg/ml之濃度調配成水性調配物時，在約40°C加速儲存14天之後形成有小於10%聚集度的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40°C)加速儲存14天之後具有小於10%聚集度的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40°C)加速儲存14天之後具有小於8%聚集度的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40°C)加速儲存14天之後具有6%或小於6%聚集度的DVD-Ig蛋白質。在另一實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40°C)加速儲存14天之後具有小於5%聚集度的DVD-Ig蛋白質。聚集度可根據此項技術中已知的方法測定，包括(但不限於)尺寸排阻層析法(SEC)。在某些實施例中，加速儲存條件包括在約40°C下避光儲存DVD-Ig蛋白質。DVD-Ig蛋白質可在含有檸檬酸鹽及磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液之水性調配物中測試。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在約40°C加速儲存21天之後，如藉由SEC分析所測定，具有10%或小於10%聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中調配成濃度為至少50至100 mg/ml的水性調配物。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在約40°C加速儲存14天之後，如藉由SEC分析所測定，具有小於6%聚集度，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中調配成濃度為至少50 mg/ml的水性調配物。

雖然聚集度百分比可用於測定加速儲存之後是否存在聚集，但亦可使用DVD-Ig蛋白質溶液之單體含量。一般而言，聚集度百分比提高表示單體含量降低。或者，在40°C，在pH值約5.0至約6.5 (例如約5.5至約6.0)，以15 mM組胺酸中具有50 mg/ml或大於50 mg/ml濃度之DVD-Ig蛋白質之溶液儲存14天之後，若DVD-Ig蛋白質具有6%或小

於6%單體損失(藉由SEC測定)，或在40℃儲存7天之後具有3%或小於3%單體損失(藉由SEC測定)，則該蛋白質可認為是AS-DVD-Ig蛋白質。單體含量可在任何測試條件下使用，包括(但不限於)在40℃及/或在約5.0至約6.5(例如約5.5至約6.0)之pH值下儲存。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質為，在約40℃，在約100 mg/ml之濃度下以水性調配物儲存21天之後，其具有約10%或小於10%單體相對(rel.)峰面積變化的DVD-Ig蛋白質，或者在約5℃，在約100 mg/ml之濃度及約5.5至約6.5之pH值下以水性調配物儲存21天之後，其具有約1%或小於1%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。或者，AS-DVD-Ig蛋白質為，在約5℃，在約1 mg/ml之濃度下以水性調配物儲存21天之後，其具有約1.5%或小於1.5%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質，或在約40℃，在1 mg/ml之濃度及約5.5至約6.5之pH值下以水性調配物儲存21天之後，其具有約3%或小於3%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為，在超過約50 mg/ml之濃度及約5.5至約6.5之pH值下調配成水性調配物時，在約40℃加速儲存14天之後，其具有小於約10%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為，在超過60 mg/ml之濃度及5.5至6.5之pH值下調配成水性調配物時，(在例如約40℃)加速儲存14天之後，其具有小於8%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40℃)加速儲存14天之後，其具有6%或小於6%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。在另一實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質定義為(在例如約40℃)加速儲存14天之後，其具有小於5%單體相對峰面積變化DVD-Ig蛋白質。

在某些實施例中，在約40℃加速儲存21天之後，如藉由SEC分析所測定，AS-DVD-Ig蛋白質具有10%或小於10%單體相對峰面積變

化，其中AS-DVD-Ig蛋白質於約5.0至約6.5之pH值(例如約5.5至約6.0)之檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中調配成濃度為50至100 mg/ml的水性調配物。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在約40℃加速儲存14天之後，如藉由SEC分析所測定，其具有小於6%單體相對峰面積變化，其中AS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液中調配成濃度為至少50 mg/ml的水性調配物。

在另一替代例中，AS-DVD-Ig蛋白質是根據如藉由SEC所測定溶液在低溫(例如5℃)下及在高濃度(例如50 mg/ml)DVD-Ig下的穩定性聚集及/或單體含量來鑑別。舉例而言，含有50 mg/ml AS-DVD-Ig蛋白質於15 mM組胺酸中之溶液(約5.0至約6.5，例如約5.5至約6.0之pH值)在5℃儲存7天之後，其單體損失(藉由SEC測定)為1%或小於1% (藉由SEC測定)。在另一實例中，含有50 mg/ml AS-DVD-Ig蛋白質於15 mM組胺酸中之溶液(約5.0至約6.5，例如約5.5至約6.0之pH值)在5℃儲存14天之後，其單體損失為2%或小於2%。或者，AS-DVD-Ig蛋白質在100 mg/ml之濃度下以水性調配物在約5℃儲存21天之後具有1%或小於1%聚集度，或在1 mg/ml之濃度下以水性調配物在約5℃儲存21天之後具有1.5%或小於1.5%聚集度。在某些實施例中，在約5.0至約6.5(例如約5.5至約6.0)之pH值下測定單體損失。

在某些實施例中，本文中所述測試溶液條件亦含有0.02% (w/v) 疊氮化鈉作為抑菌劑。

在某些實施例中，如藉由尺寸排阻層析法(SEC)分析所測定，若溶液中之DVD-Ig蛋白質聚集度為15%或小於15%，則認為DVD-Ig蛋白質是LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，如藉由SEC分析所測定，若LS-DVD-Ig蛋白質具有15%或小於15%，或者小於14%、小於13%、小於12%、小於11%聚集度，則認為該LS-DVD-Ig蛋白質是LS-DVD-Ig蛋白質。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在超過100

mg/ml之濃度下，在約5.0至約6.5(例如約5.5至約6.0)之pH值下調配成水性調配物時，在約40℃加速儲存21天之後，其具有20%或小於20%單體相對峰面積變化。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在例如約40℃加速儲存14天之後，其具有小於18%單體相對峰面積變化。在另一實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在例如約40℃加速儲存14天之後，其具有小於13%單體相對峰面積變化。或者，LS-DVD-Ig蛋白質定義為，在4次冷凍解凍循環之後，具有1%或小於1%單體相對峰面積變化之DVD-Ig蛋白質。或者，LS-DVD-Ig蛋白質定義為，在約25℃，在1 mg/ml至100 mg/ml (例如約1至10 mg/ml或約50至100 mg/ml)之濃度下，在最穩定pH值下於水溶液中儲存7天之後，具有4%或小於4%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。或者，LS-DVD-Ig蛋白質定義為，在約5℃，在最穩定pH值下於水溶液中儲存7天之後，具有1%或小於1%單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。

在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質定義為以超過50 mg/ml之濃度調配成水性調配物時，在約40℃加速儲存例如14天之後形成小於15%聚集度。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在例如40℃加速儲存14天之後具有15%或小於15%聚集度。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在例如約40℃加速儲存14天之後具有小於14%聚集度。在另一實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在例如約40℃加速儲存14天之後具有小於13%聚集度。或者，LS-DVD-Ig蛋白質定義為在4次冷凍解凍循環之後具有1%或小於1%聚集度的DVD-Ig蛋白質。DVD-Ig蛋白質可在含有檸檬酸鹽及磷酸鹽緩衝液或組胺酸緩衝液之水性調配物中測試。在某些實施例中，LS-DVD-Ig蛋白質在約40℃加速儲存14天之後，如藉由SEC分析所測定，具有15%或小於15%聚集度，其中LS-DVD-Ig蛋白質於檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中調配成濃度為至少50 mg/ml的水性調配物。如上所述，聚集度可根據此項技術中已知的方法測定，包括

(但不限於) SEC。

顯然，本文所述用於確定DVD-Ig蛋白質是否為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質的分析不具排他性，此意謂，例如，AS-DVD-Ig特徵為在約5°C，在約50至約100 mg/ml之濃度下及在約5.5至約6.5之pH值下以水性緩衝調配物儲存21天之後，具有至少50°C之展開溫度且亦具有約1%或小於1%之單體相對峰面積變化。在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質在約40°C加速儲存21天之後，如藉由SEC分析所測定，具有10%或小於10%之單體相對峰面積變化，且具有至少50°C之展開溫度。

一旦DVD-Ig蛋白質根據上述測試鑑別為AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質，則AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質可穩定調配。下文實例4中描述AS-DVD-Ig蛋白質及LS-DVD-Ig蛋白質之進一步鑑別。

III. 本發明之水性穩定雙重可變區域免疫球蛋白(AS-DVD-Ig)調配物

本發明提供包含AS-DVD-Ig蛋白質的穩定水性調配物。與此項技術中公認之調配物相比，本發明描述之水性調配物的特性改良之處在於，AS-DVD-Ig蛋白質甚至在高濃度下亦可穩定調配。

因此，本發明至少部分基於以下發現：DVD-Ig蛋白質之子群可穩定地調配成具有約4.5至約7.5之pH值且含有緩衝液、界面活性劑及/或多元醇的水性調配物。此等「水性穩定DVD-Ig蛋白質」稱為AS-DVD-Ig蛋白質且可使用加速儲存分析鑑別，其中DVD-Ig蛋白質調配成濃度大於50 mg/ml (例如50 mg/ml至100 mg/ml)的液體形式(亦參見上文章節II.E.)。

在某些實施例中，本發明之水性調配物具有約4.5至約7.5之pH值。如實施例中所述，發現pH值對AS-DVD-Ig蛋白質於緩衝調配物中之穩定性有影響。在某些實施例中，含有AS-DVD-Ig蛋白質之調配物

之pH值範圍為約4.5至約7.5；或者，AS-DVD-Ig蛋白質調配物之pH值範圍為約5.0至約7.0；或者，pH值範圍可為約5至約6.5；或者調配物之pH值範圍可為約5.5至約6.5。在另一實施例中，pH值範圍為約5.8至約6.2。亦希望上述pH值的中間範圍(例如約5.6至約6.4)為本發明之一部分。亦希望包括使用上述值之任何組合作為上限/下限的值範圍，例如約5.5至約6.2之pH值範圍。在某些實施例中，本發明調配物之pH值為約6.0。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包括AS-DVD-Ig蛋白質及緩衝液。可用於本發明之調配物中之緩衝液實例包括(但不限於)乙酸鹽、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、磷酸鹽、Tris及檸檬酸鹽。本發明之調配物中所用緩衝液之莫耳濃度範圍可為約1至約50 mM。在某些實施例中，本發明之水性調配物具有莫耳濃度為約5至約50 mM之緩衝液。或者，緩衝液之莫耳濃度為約10 mM至約20 mM。

在本發明之某些實施例中，緩衝系統包含約1至約200 mM組胺酸(例如約2至約100 mM；約5至約70 mM；約5至約60 mM；約5至約50 mM；約10至約40 mM；約10至約30 mM；或約10至約20 mM)，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值，或約5.5至約6.5之pH值。在某些實施例中，本發明之緩衝系統包含約15 mM組胺酸，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。

在某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約40 mM)甘胺酸，其具有約4.5至約7.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約20 mM之甘胺酸。在一更特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約20 mM之甘胺酸及濃度為約20至約30 mg/ml (例如約26 mg/ml)之甘油，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值，或約5.5至約6.5之pH值。

在某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM乙酸鹽(例如約5至約50 mM、約2至約40 mM、約5至約30 mM；或約2至約15 mM)，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約2至約15 mM之乙酸鹽。

在本發明之某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM、約2至約40 mM、約5至約30 mM，或約2至約15 mM) 精胺酸，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約15 mM之精胺酸。

在本發明之另一實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM)檸檬酸鹽，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約15 mM之檸檬酸鹽。

在本發明之另一實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM)磷酸鹽，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約10 mM之磷酸鹽。在一實施例中，緩衝系統包含濃度為約10 mM之磷酸鹽及濃度為約125 mM之氯化鈉。

在某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM) Tris，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約2至約10 mM之Tris。

在另一實施例中，緩衝系統包含磷酸鹽及檸檬酸鹽，例如濃度為約1至約50 mM (例如約5至約50 mM、約5至約10 mM)之磷酸鹽(例如磷酸氫二鈉)及濃度為約1至約50 mM (例如約5至約10 mM)之檸檬酸

鹽(檸檬酸)。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約5 mM之磷酸鹽及濃度為約5 mM之檸檬酸鹽(檸檬酸)。在某些實施例中，緩衝系統包含濃度為約10 mM之磷酸鹽及濃度為約10 mM之檸檬酸鹽(檸檬酸)。

除緩衝液之外，可將多元醇添加至水性調配物中，以便例如增加穩定性。多元醇添加至調配物中的量可隨調配物之所要等張性而變。在某些實施例中，水性調配物具有等張性。

可用於本發明之水性調配物中之多元醇實例包括(但不限於)山梨糖醇、甘露糖醇及蔗糖、果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖及葡萄糖。非還原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖、棉子糖、甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、蘇糖醇、山梨糖醇及甘油。多元醇之添加量亦可隨多元醇之分子量而變。舉例而言，與二糖(例如海藻糖)相比，可添加較少量之單糖(例如甘露糖醇)。

在某些實施例中，諸如山梨糖醇之多元醇之濃度為約30至約50 mg/ml。在一個實施例中，組合物包含約20至約60 mg/ml、約25至約55 mg/ml、約30至約50 mg/ml、約35至約45 mg/ml山梨糖醇，且山梨糖醇範圍為例如約33至約48 mg/ml。

在某些實施例中，蔗糖具有約70至約90 mg/ml之濃度。在某些實施例中，組合物包含約60至約100 mg/ml、約65至約95 mg/ml、約70至約90 mg/ml、約75至約85 mg/ml蔗糖，且蔗糖範圍為例如約72至約84 mg/ml。

在某些實施例中，多元醇為甘露糖醇。在某些實施例中，組合物包含約10至約100 mg/ml，或約20至約80 mg/ml、約20至約70 mg/ml、約30至約60 mg/ml、約30至約50 mg/ml甘露糖醇，例如約10 mg/ml、約20 mg/ml、約30 mg/ml、約40 mg/ml、約50 mg/ml、約60

mg/ml、約70 mg/ml、約80 mg/ml、約90 mg/ml或約100 mg/ml。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包括AS-DVD-Ig、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液及多元醇，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。

除緩衝液之外，可向水性調配物中添加界面活性劑，以便例如提高穩定性。例示性界面活性劑包括非離子型清潔劑，諸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188)。在某些實施例中，界面活性劑之添加量應使得其降低所調配AS-DVD-Ig蛋白質之聚集度及/或使微粒在調配物中之形成降至最低及/或減少吸附。

在某些實施例中，水性調配物含有清潔劑聚山梨醇酯80或Tween 80。Tween 80為用於描述聚氧乙烯(20)脫水山梨糖醇單油酸酯的術語。在某些實施例中，調配物含有約0.001%至約1%聚山梨醇酯80，或約0.005%至約0.05%聚山梨醇酯80，例如約0.001%、約0.005%、約0.01%、約0.05%或約0.1%聚山梨醇酯80。在某些實施例中，在本發明之調配物中存在約0.01%聚山梨醇酯80。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包括AS-DVD-Ig、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液及界面活性劑，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，界面活性劑為聚山梨醇酯，例如聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。在某些實施例中，聚山梨醇酯具有約0.005%至約0.02%之濃度。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包括AS-DVD-Ig、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液、界面活性劑及多元醇，其中調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，調配物包括AS-DVD-Ig、緩衝液(例如組胺酸)、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)及糖醇(例如甘露糖醇或山梨糖醇)。在某些實施例中，調配物包括AS-DVD-

Ig、緩衝液(例如組胺酸)、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)及非還原糖(例如蔗糖)。

本發明之水性調配物之一個優點為高濃度之AS-DVD-Ig蛋白質可在水溶液中穩定維持。因此，在某些實施例中，本發明之調配物包含高蛋白質濃度，包括例如大於約10 mg/ml、大於約20 mg/ml、大於約30 mg/ml、大於約40 mg/ml、大於約50 mg/ml、大於約100 mg/ml、大於約110 mg/ml、大於約120 mg/ml、大於約130 mg/ml、大於約140 mg/ml、大於約150 mg/ml、大於約160 mg/ml、大於約170 mg/ml、大於約180 mg/ml、大於約190 mg/ml或大於約200 mg/ml之蛋白質濃度。

在本發明之各個實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質於水性調配物中的濃度為約0.1至250 mg/ml、約0.5至220 mg/ml、約1至210 mg/ml、約5至200 mg/ml、約10至195 mg/ml、約15至190 mg/ml、約20至185 mg/ml、約25至180 mg/ml、約30至175 mg/ml、約35至170 mg/ml、約40至165 mg/ml、約45至160 mg/ml、約50至155 mg/ml、約55至150 mg/ml、約60至145 mg/ml、約65至140 mg/ml、約70至135 mg/ml、約75至130 mg/ml、約80至125 mg/ml、約85至120 mg/ml、約90至H5 mg/ml、約95至110 mg/ml、約95至105 mg/ml或約100 mg/ml。亦希望上述濃度之中間範圍(例如約31至174 mg/ml)為本發明之一部分。舉例而言，希望包括使用上述值之任一組合作為上限及/或下限的值範圍。

與此項技術中公認之調配物相比，本發明描述具有改良之特性的水性調配物。舉例而言，本發明之調配物具有小於7%聚集度、小於6%聚集度或小於5%聚集度之AS-DVD-Ig蛋白質聚集度。

在某些實施例中，本發明之水性調配物中所用之AS-DVD-Ig蛋白質為抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質，其重鏈及輕鏈序列分別具有如SEQ

ID NO: 62及63所列之胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包含抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質(例如所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈CDR對應之胺基酸序列的抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質；或所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈可變區對應之胺基酸序列的抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質；或DVD-A)、組胺酸或乙酸鹽緩衝液，及蔗糖或山梨糖醇，其中調配物具有約5至約6之pH值且其中蛋白質濃度為約50 mg/ml或大於約50 mg/ml。在其他實施例中，水性調配物具有約5至約5.5範圍內(例如約5.2)之pH值。在另一實施例中，水性調配物包含界面活性劑，例如聚山梨醇酯。所述緩衝液、賦形劑及pH值之範圍描述於上文中。

在某些實施例中，AS-DVD-Ig蛋白質為抗IL1 α /IL-1 β DVD-Ig，包含抗IL1 α /IL1 β DVD-Ig蛋白質，其重鏈及輕鏈序列分別具有如SEQ ID NO: 66及67所列之胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包含抗IL1 α /IL1 β DVD-Ig蛋白質(例如所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 66及 67中所列之重鏈及輕鏈CDR對應之胺基酸序列的抗IL1 α /IL1 β DVD-Ig蛋白質；或所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈可變區對應之胺基酸序列的抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質；或DVD-C)、組胺酸緩衝液，及蔗糖或山梨糖醇，其中調配物具有約5至約6之pH值且其中蛋白質濃度為約50 mg/ml或大於約50 mg/ml。在其他實施例中，水性調配物具有約5至約5.5範圍內之pH值，例如約5.4。在另一實施例中，水性調配物包含界面活性劑，例如聚山梨醇酯。所述緩衝液、賦形劑及pH值之範圍描述於上文中。

在某些實施例中，本發明之水性調配物包含抗DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質(例如所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 28及29或SEQ ID

NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈CDR對應之胺基酸序列的抗DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質；或所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 28及29或SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈可變區對應之胺基酸序列的抗DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質)、組胺酸緩衝液及蔗糖或精胺酸，其中調配物具有約5至約6之pH值且其中蛋白質濃度為約20 mg/ml至約50 mg/ml。在其他實施例中，水性調配物具有約5.5至約6範圍內之pH值。在另一實施例中，水性調配物包含界面活性劑，例如聚山梨醇酯。所述緩衝液、賦形劑及pH值之範圍描述於上文中。

IV. 本發明之穩定凍乾雙重可變區域免疫球蛋白(LS-DVD-Ig)蛋白質調配物

本發明進一步提供包含LS-DVD-Ig蛋白質之穩定凍乾調配物。因此，本發明至少部分基於以下發現：DVD-Ig蛋白質之子群可穩定地調配成具有約4.5至約7.5之pH值且含有緩衝液、界面活性劑及/或多元醇的凍乾調配物。此等「穩定凍乾DVD-Ig蛋白質」或「LS-DVD-Ig蛋白質」可使用加速儲存分析(上文所述)加以鑑別，其中DVD-Ig蛋白質調配成濃度大於50 mg/ml之液體形式。

本發明之凍乾調配物之下述特徵可指凍乾之前的溶液，或復原調配物，例如其中提及液體濃度(mg/ml)。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，含有LS-DVD-Ig蛋白質之調配物之pH值範圍為約4.5至約7.5；或者，LS-DVD-Ig蛋白質調配物之pH值範圍為約5.0至約7.0；或者，pH值範圍可為約5至約6.5；或者調配物之pH值範圍可為約5.5至約6.5。在另一實施例中，pH值範圍為約5.8至約6.2。亦希望上述pH值的中間範圍(例如約5.6至約6.4)為本發明之一部分。亦希望包括使用上述值之任何組合作為上限/下限的值範圍，例如約5.5至約6.2之pH值範圍。在某些實施例中，本發明調配物之pH值為約6.0。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包括LS-DVD-Ig蛋白質及緩衝液。可用於本發明之調配物中之緩衝液之實例包括(但不限於)乙酸鹽、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、磷酸鹽、Tris及檸檬酸鹽。本發明之調配物中所用緩衝液之莫耳濃度範圍可為約1至約50 mM。在某些實施例中，本發明之水性調配物具有莫耳濃度為約5至約50 mM之緩衝液。或者，緩衝液之莫耳濃度為約10 mM至約20 mM。

在本發明之某些實施例中，緩衝系統包含約1至約200 mM組胺酸(例如約2至約100 mM；約5至約70 mM；約5至約60 mM；約5至約50 mM；約10至約40 mM；約10至約30 mM；或約10至約20 mM)，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值，或約5.5至約6.5之pH值。在某些實施例中，本發明之緩衝系統包含約15 mM組胺酸，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。

在某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約40 mM)甘胺酸，其具有約4.5至約7.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約20 mM之甘胺酸。在一更特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約20 mM之甘胺酸及濃度為約20至約30 mg/ml (例如約26 mg/ml)之甘油，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值，或約5.5至約6.5之pH值。

在某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM乙酸鹽(例如約5至約50 mM、約2至約40 mM、約5至約30 mM；或約2至約15 mM)，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約2至約15 mM之乙酸鹽。

在本發明之某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM、約2至約40 mM、約5至約30 mM；或約2至約15 mM)

精胺酸，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約15 mM之精胺酸。

在本發明之另一實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM)檸檬酸鹽，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約15 mM之檸檬酸鹽。

在本發明之另一實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM)磷酸鹽，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約10 mM之磷酸鹽。在一實施例中，緩衝系統包含濃度為約10 mM之磷酸鹽及濃度為約125 mM之氯化鈉。

在某些實施例中，緩衝系統包含約1至約50 mM (例如約5至約50 mM) Tris，其具有約4.5至約7.5之pH值，例如約5至約7之pH值或約5.5至約6.5之pH值。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約2至約10 mM之Tris。

在另一實施例中，緩衝系統包含磷酸鹽及檸檬酸鹽，例如濃度為約1至約50 mM (例如約5至約50 mM、約5至約10 mM)之磷酸鹽(例如磷酸氫二鈉)及濃度為約1至約50 mM (例如約5至約10 mM)之檸檬酸鹽(檸檬酸)。在一特定實施例中，緩衝系統包含濃度為約5 mM之磷酸鹽及濃度為約5 mM之檸檬酸鹽(檸檬酸)。在某些實施例中，緩衝系統包含濃度為約10 mM之磷酸鹽及濃度為約10 mM之檸檬酸鹽(檸檬酸)。

除緩衝液之外，可向水性調配物中添加多元醇，以便例如提高穩定性。多元醇添加至調配物中的量可隨調配物之所要等張性而變。在某些實施例中，凍乾調配物經復原而具有等張性。

可用於本發明之凍乾調配物中之多元醇之實例包括(但不限於)甘露糖醇、蔗糖、海藻糖及棉子糖。多元醇之添加量亦可隨多元醇之分子量而變。舉例而言，與二醣(例如海藻糖)相比，可添加較低量之單醣(例如甘露糖醇)。

在某些實施例中，諸如山梨糖醇之多元醇之濃度為約30至約50 mg/ml。在一個實施例中，組合物包含約20至約60 mg/ml、約25至約55 mg/ml、約30至約50 mg/ml、約35至約45 mg/ml山梨糖醇，且山梨糖醇範圍為例如約33至約48 mg/ml。

在某些實施例中，蔗糖具有約70至約90 mg/ml之濃度。在某些實施例中，組合物包含約60至約100 mg/ml、約65至約95 mg/ml、約70至約90 mg/ml、約75至約85 mg/ml蔗糖，且蔗糖範圍為例如約72至約84 mg/ml。

在某些實施例中，多元醇為甘露糖醇。在某些實施例中，組合物包含約10至約100 mg/ml，或約20至約80 mg/ml、約20至約70 mg/ml、約30至約60 mg/ml、約30至約50 mg/ml甘露糖醇，例如約10 mg/ml、約20 mg/ml、約30 mg/ml、約40 mg/ml、約50 mg/ml、約60 mg/ml、約70 mg/ml、約80 mg/ml、約90 mg/ml或約100 mg/ml。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包括AS-DVD-Ig、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液及多元醇，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。

除緩衝液之外，可向凍乾調配物中添加界面活性劑，以便例如提高穩定性。例示性界面活性劑包括非離子型洗滌劑，諸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188)。在某些實施例中，界面活性劑之添加量應使得其降低所調配LS-DVD-Ig蛋白質之聚集度及/或使微粒在調配物中之形成降至最低及/或減少吸附。

在某些實施例中，凍乾調配物含有洗滌劑聚山梨醇酯80或Tween 80。Tween 80為用於描述聚氧乙烯(20)脫水山梨糖醇單油酸酯的術語。在某些實施例中，調配物含有約0.001%至約0.1%聚山梨醇酯80，或約0.005%至約0.05%聚山梨醇酯80，例如約0.001%、約0.005%、約0.01%、約0.05%或約0.1%聚山梨醇酯80。在某些實施例中，在本發明之調配物中存在約0.01%聚山梨醇酯80。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包括LS-DVD-Ig、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液及界面活性劑，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，界面活性劑為聚山梨醇酯，例如聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。在某些實施例中，聚山梨醇酯具有約0.005%至約0.02%之濃度。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包括LS-DVD-Ig、具有約5至約50 mM莫耳濃度之緩衝液、界面活性劑及多元醇，其中調配物具有約4.5至約7.5之pH值。在某些實施例中，調配物包括LS-DVD-Ig、緩衝液(例如組胺酸)、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)及糖醇(例如甘露糖醇或山梨糖醇)。在某些實施例中，調配物包括LS-DVD-Ig、緩衝液(例如組胺酸)、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)及非還原糖(例如蔗糖)。

本文所述之凍乾調配物最初製成「凍乾前調配物」形式，「凍乾前調配物」為凍乾製程之前的調配物。存在於凍乾前調配物中之蛋白質之量考慮所要劑量體積、投與模式等來確定。舉例而言，LS-DVD-Ig蛋白質之起始濃度可為約2 mg/ml至約50 mg/ml。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/IL-17，且包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/IL-17-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基

酸序列。在某些實施例中，抗TNF/IL-17-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包含抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質(例如所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈CDR對應之胺基酸序列的抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質；或所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 62及63中所列之重鏈及輕鏈可變區對應之胺基酸序列的抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質；或DVD-A)、組胺酸或乙酸鹽緩衝液，及蔗糖或山梨糖醇，其中調配物具有約5至約6之pH值且其中在復原時，蛋白質濃度大於約50 mg/ml。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合IL1 α /IL-1 β 且包含含有分別如SEQ ID NO: 66及67中所列之胺基酸序列的重鏈及輕鏈序列。在某些實施例中，凍乾調配物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合IL-1 α /IL-1 β ，且包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL-1 α /IL-1 β -Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL-1 α /IL-1 β -Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包含抗IL1 α /IL1 β DVD-Ig蛋白質(例如所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈CDR對應之胺基酸序列的抗IL1 α /IL1 β DVD-Ig蛋白質；或所含重鏈及輕鏈包含與SEQ ID NO: 66及67中所列之重鏈及輕鏈可變區對應之胺基酸序列的抗TNF/IL-17 DVD-Ig蛋白質；或DVD-C)、組胺酸緩衝液、及蔗糖或山梨糖醇，其中調配物具有約5至約6之pH值且其中在復原時，蛋白質濃度大於約50 mg/ml。在某些實施例中，水性調配物具有約5至約5.5之pH值，例如約5.4。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物中所用之DVD-Ig蛋白質特異性結合TNF/PGE2，且包含與SEQ ID NO: 64及65中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/PGE2-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 64及65中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗TNF/PGE2-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 64及65中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包含特異性結合DLL4/VEGF之DVD-Ig蛋白質，且該蛋白質包含與SEQ ID NO: 28及29或SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 28及29或SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗DLL4/VEGF-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 28及29或SEQ ID NO: 72及73中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

在某些實施例中，本發明之凍乾調配物包含特異性結合IL12/IL18之DVD-Ig蛋白質，且該蛋白質包含與SEQ ID NO: 70及71中所列之重鏈及輕鏈CDR對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL12/IL18-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 70及71中所列之重鏈及輕鏈可變區對應的胺基酸序列。在某些實施例中，抗IL12/IL18-Ig蛋白質包含與SEQ ID NO: 70及71中所列之重鏈及輕鏈對應的胺基酸序列。

凍乾可根據此項技術中已知的方法進行。多種不同冷凍乾燥器可用於此目的，諸如Hull50TM (Hull, USA)或GT20.TM. (Leybold-Heraeus, Germany)冷凍乾燥器。冷凍乾燥是藉由將調配物冷凍且隨後在適於第一乾燥之溫度下使冷凍內含物中的冰昇華而達成。在此條件下，產物溫度低於調配物之共熔點或塌陷溫度。通常，在適合壓力(範圍通常為約50 毫托(mTorr)至250毫托)下，用於第一乾燥之儲存溫度範圍為約-30至25°C (限制條件為產物在第一乾燥期間保持冷凍狀

態)。乾燥所需時間主要由調配物、容納樣品之容器(例如玻璃小瓶)之尺寸及類型以及液體體積決定，時間範圍可為幾小時至數天(例如40至60小時)。亦可視情況視產物中之所要殘餘水分含量而定進行第二乾燥階段。進行第二乾燥之溫度的範圍為約0至40°C，此主要視容器之類型及尺寸以及所用蛋白質類型而定。舉例而言，冷凍乾燥之整個水移除階段期間的儲存溫度可為約15至30°C (例如約20°C)。第二乾燥所需之時間及壓力允許產生適合凍乾餅，此視例如溫度及其他參數而定。第二乾燥時間由產物中之所要殘餘水含量決定且通常需要至少約5小時(例如10至15小時)。壓力可與第一乾燥步驟期間所用之壓力相同。冷凍乾燥條件可視調配物及小瓶尺寸而變。

投與患者之前，凍乾調配物用醫藥學上可接受之稀釋劑復原，使得所復原調配物中之蛋白質濃度為至少約2 mg/ml，例如約2 mg/ml至約100 mg/ml，或者約10 mg/ml至約90 mg/ml，或者約30 mg/ml至約50 mg/ml。在所復原調配物打算皮下遞送的情況下，所復原調配物中之此等高蛋白質濃度尤其有用。然而，對於其他投與途徑，諸如靜脈內投與，可能需要較低所復原調配物中之蛋白質濃度(例如所復原調配物中約2至50 mg/ml，或約3至40 mg/ml蛋白質)。在某些實施例中，所復原調配物中之蛋白質濃度顯著高於凍乾前調配物中之蛋白質濃度。復原通常在約25°C之溫度下發生以確保完全水合作用，但需要時可使用其他溫度。復原所需之時間將視例如稀釋劑類型、賦形劑及蛋白質之量而定。例示性稀釋劑包括無菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH值緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝鹽水)、無菌鹽水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。稀釋劑視情況含有防腐劑。例示性防腐劑已描述於上文中，其中諸如苯甲醇或酚醇之芳族醇為較佳防腐劑。防腐劑之使用量是藉由評定與蛋白質及防腐劑功效測試相容之不同防腐劑濃度來確定。舉例而言，若防腐劑為芳族醇(諸如苯甲醇)，則其存在量

可為約 0.1% 至 2.0% 且較佳為約 0.5% 至 1.5%，但最佳為約 1.0% 至 1.2%。

V. 本發明之用途

本發明之調配物可治療性使用，亦即活體內使用，或用作活體外或原位用途之試劑。本發明之方法亦可用於製備具有有利於治療性用途之特性的基於水之調配物。水性調配物可用作治療個體病症的醫藥調配物。

本發明之調配物可用於治療適合以治療性蛋白質治療的任何病症。「病症」為受益於蛋白質治療的任何病狀。此包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易患所述病症的彼等病理學病狀。在抗 TNF DVD-Ig 情況下，可投與治療有效量之 DVD-Ig 蛋白質以治療自體免疫疾病，諸如類風濕性關節炎；腸病，諸如克羅恩氏病；脊椎關節病，諸如僵直性脊椎炎；或皮膚病，諸如牛皮癬。在抗 IL-12 DVD-Ig 情況下，可投與治療有效量之 DVD-Ig 蛋白質以治療神經障礙，諸如多發性硬化症；或皮膚病，諸如牛皮癬。可使用本發明調配物治療之病症之其他實例包括癌症，包括乳癌、白血病、淋巴瘤及結腸癌。

術語「個體」欲包括活有機體，例如原核生物及真核生物。個體實例包括哺乳動物，例如人類、犬、牛、馬、豬、綿羊、山羊、貓、小鼠、兔、大鼠及轉殖基因非人類動物。在本發明之特定實施例中，個體為人類。

術語「治療」係指治療性治療與預防性或防治性措施。需要治療之彼等患者包括已患該病症者以及欲預防該病症者。

水性調配物可向需要根據已知投與方法治療的哺乳動物，包括人類投與。投與方法之實例包括非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、大腸內、頸管內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包

腔內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、團式給藥、陰道、直腸、經面、舌下、鼻內及經皮。

蛋白質之適當劑量(「治療有效量」)將視以下而定：待治療之病狀、病狀之嚴重程度及過程、蛋白質是針對預防性還是治療性目的投與、先前療法、患者臨床病史及對蛋白質之反應、所用蛋白質類型及主治醫師之判斷。蛋白質一次性向患者投與或經一系列治療向患者投與且可在診斷後的任何時間向患者投與。蛋白質可作為唯一治療或連同適用於治療所述病狀之其他藥物或療法一起投與。

可改變活性成分AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質於本發明之醫藥調配物中的實際劑量水準，以便獲得使特定患者有效達成所要治療性反應的活性分量、組合物及投與模式，而對患者無毒性。

所選劑量水準視多種因素而定，包括調配物中存在之AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質之活性、投與途徑、投與時間、所用特定化合物之排泄速率、治療持續時間、其他藥物、與所用特定化合物組合使用之化合物及/或材料、所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史，及醫療技術中熟知的類似因素。

在本發明之某些實施例中，調配物中AS-DVD-Ig蛋白質之劑量為約1至約250 mg。在某些實施例中，調配物中AS-DVD-Ig蛋白質之劑量為約30至約140 mg、約40至約120 mg、約50至約110 mg、約60至約100 mg，或約70至約90 mg。在另一實施例中，組合物包括約1 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、110 mg、120 mg、130 mg、140 mg、150 mg、160 mg、170 mg、180 mg、190 mg、200 mg、210 mg、220 mg、230 mg、240 mg或250 mg之AS-DVD-Ig蛋白質劑量。

在本發明之某些實施例中，調配物中LS-DVD-Ig蛋白質之劑量

(復原時)為約1至約250 mg。在另一實施例中，調配物中LS-DVD-Ig之劑量為約30至約140 mg、約40至約120 mg、約50至約110 mg、約60至約100 mg，或約70至約90 mg。在另一實施例中，組合物包括約1 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、110 mg、120 mg、130 mg、140 mg、150 mg、160 mg、170 mg、180 mg、190 mg、200 mg、210 mg、220 mg、230 mg、240 mg或250 mg之LS-DVD-Ig劑量。

本發明之調配物克服調配物開發中已知的常見問題，包括通常與高濃度蛋白質(尤其複合蛋白質，諸如DVD-Ig蛋白質)有關之蛋白質聚集問題。因此，在某些實施例中，本發明之調配物提供可藉以向患者投與高含量之此新穎治療性蛋白質形式的新方式。

實例

本文呈現之實例描述含有雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-Ig)蛋白質的調配物，其具有出乎意外的穩定性特徵。實驗驚人之處在於，稱為水性穩定DVD-Ig (AS-DVD-Ig)蛋白質或穩定凍乾DVD-Ig (LS-DVD-Ig)蛋白質的某些DVD-Ig蛋白質分別在水性或凍乾調配物中穩定，而其他DVD-Ig蛋白質當以類似方式調配時顯示聚集及不穩定性。實驗舉例說明用於鑑別AS-DVD-Ig蛋白質及LS-DVD-Ig蛋白質的方法，以及其穩定調配物。

材料及方法

所進行之實驗中利用本文所述方法評定及監測DVD-Ig蛋白質於水性調配物及凍乾調配物中之穩定性。

一般方法

測試DVD-Ig蛋白質調配物之一般品質參數(例如pH值)、物理穩定性參數(例如透明度、顏色、顆粒污染及純度)，及化學穩定性參數(例如脫醯胺、氧化及一般化學穩定性)。例示性測試包括可見微粒污

染測試、亞可見(subvisible)顆粒之遮光顆粒計數測試，及純度測試，諸如尺寸排除高壓液相層析(本文中亦稱為尺寸排阻層析法(SEC))及離子交換層析(IEC)。

微粒污染(例如可見顆粒)藉由目測檢查確定。亞可見顆粒藉由遮光分析根據美國藥典(United States Pharmacopeia, USP)監測。藉由SEC評定調配物之物理化學穩定性，其可偵測片段及聚集物。進行SEC (用於偵測片段及水解)及IEC監測化學穩定性。

所測試之DVD-Ig蛋白質

本文提供之實例中所測試的DVD-Ig蛋白質列於表1中。表1中所述DVD-Ig蛋白質之序列提供於表58及65中(命名一致，例如DVD5對應於表65中之SEQ ID NO: 30及31)。

表1：雙重可變區域免疫球蛋白(DVD-Ig)蛋白質及其目標

DVD-Ig蛋白質名稱	目標
DVD 5	CD20/CD80
DVD 6	CD80/CD20
DVD 37	VEGF/HER2
DVD 38	HER2/VEGF
DVD 53	TNF/RANKL
DVD 54	RANKL/TNF
DVD 65	TNF/DKK
DVD 66	DKK/TNF
DVD 165	CD20/RANKL
DVD 166	RANKL/CD20
DVD 257	DLL4/PLGF
DVD 258	PLGF/DLL4
DVD 277	TNF/SOST (S2)
DVD 278	SOST(S2)/TNF
DVD 281	IL-9(S2)/IgE
DVD 282	IgE/IL-9(S2)
IL12IL18	IL-12/IL-18
DVD-A	TNF/IL-17
DVD-B	TNF/PGE2
DVD-C	IL-1 α /IL-1 β

純化之後得到的DVD-Ig蛋白質作為起始物質且為>95%單體形式。

陽離子交換HPLC法

使用陽離子交換HPLC (IEC形式)測定DVD-Ig蛋白質調配物之身分及純度。利用下文詳述之參數進行分析。

Dionex ProPac® WCX-10分析管柱(Dionex Corp., Sunnyvale, CA)與Dionex WCX-10G保護管柱(Dionex Corp., Sunnyvale, CA)組合，以210巴管柱壓力上限操作。移動相A由10 mM Na_2HPO_4 pH 6.0組成。此緩衝液是藉由將4.97 g無水磷酸氫二鈉溶解於約3300 ml Milli-Q水中，使用1 M磷酸將pH值調整至7.0，用Milli-Q水將緩衝液體積提高至3500 ml且經膜過濾器過濾溶液而產生。移動相B由10 mM Na_2HPO_4 、500 mM NaCl pH 6.0組成。此緩衝液是藉由將2.56 g無水磷酸氫二鈉溶解於約1500 ml Milli-Q水中，使用1 M磷酸將pH值調整至6.0，用Milli-Q水將緩衝液體積提高至1800 ml且經由膜過濾器過濾溶液而產生。陽離子交換HPLC方法概述於表2中。

表2：陽離子交換HPLC法之概述

項目	描述/操作條件	
保護管柱	ProPac WCX-10G, 4.0 × 50 mm	
管柱	ProPac WCX-10, 4.0 × 250 mm	
移動相A*	10 mM磷酸氫二鈉, pH 6.0	
移動相B*	10 mM磷酸氫二鈉/500 mM氯化鈉, pH 6.0	
梯度	二元梯度	
	時間(分鐘)	移動相B%
	0.01	15.0
	30.00	30.0
	32.00	100.0
	37.00	100.0
	39.00	15.0
	44.00	15.0
	44.10	Stop
流動速率	1.0毫升/分鐘	
偵測器波長	280 nm	
自動取樣器溫度	標稱4°C	
管柱烘箱溫度	35°C	
樣品載荷	100 µL/100 µg	
實驗時間	44.0分鐘	

對於IL12IL18及DVD 66 DVD-Ig蛋白質，所用移動相改變如下：

移動相A：10 mM MES，pH 5.6；及

移動相B：10 mM MES + 500 mM NaCl，pH 5.6。

對於IL1 α IL β ，所用移動相改變如下：

移動相A：20 mM磷酸鹽，pH 8.0；及

移動相B：20 mM磷酸鹽 + 500 mM NaCl，pH 8.0。

表3. 用於IL1 α IL β 之梯度

時間(分鐘)	B%
0	7
5	7
25	25
27	100
32	100
34	7
37	7

各種其他DVD-Ig蛋白質使用類似IEC形式。

尺寸排阻HPLC法

使用尺寸排阻HPLC法測定DVD-Ig蛋白質溶液之純度。如下文所概述進行分析。

TSK凝膠保護管柱(VWR Scientific, Bridgeport, NJ；目錄號08543，6.0 mm × 4.0 cm，7 μ m)與TSK凝膠G3000SW (VWR Scientific, Bridgeport, NJ；目錄號08541，7.8 mm × 30 cm，5 μ m)組合且以70巴之管柱壓力上限操作。移動相由100 mM Na₂HPO₄/200 mM Na₂SO₄，pH 7.0組成。此緩衝液是藉由將49.68 g無水磷酸氫二鈉及99.44 g無水硫酸鈉溶解於約3300 ml Milli-Q水中，使用1 M磷酸將pH值調整至7.0，用Milli-Q水將緩衝液體積提高至3500 ml且經由膜過濾器過濾溶液而產生。

實驗參數列舉如下：

流動速率：0.3毫升/分鐘；

注射體積(相當於20 µg樣品)：20 µl；

管柱溫度：室溫；

自動取樣器溫度：2至8°C；

操作時間：50分鐘；

溶離：等度梯度。

使用二極體陣列偵測器，使用214 nm波長(>0.1分鐘峰寬及8 nm帶寬)及360 nm參考波長(100 nm帶寬)進行偵測。

一式兩份注射測試樣品。藉由比較DVD-Ig蛋白質峰面積與樣品中所有214 nm吸收組分之總面積，排除緩衝液相關峰來測定純度。使用此方法自完整DVD-Ig蛋白質中解析出高分子量聚集物及抗體片段。

冷凍/解凍分析

使用重複冷凍/解凍分析來量測DVD-Ig蛋白質溶液穩定性。DVD-Ig蛋白質在-80°C冷凍且接著在水浴中在30°C解凍，且藉由SEC分析所得溶液之聚集度及/或藉由遮光分析來分析亞可見顆粒形成。

加速儲存及即時儲存穩定性研究

調配物之pH值及儲存溫度為在蛋白質液體及凍乾調配物之長期儲存期間影響蛋白質穩定性的兩個重要因素。為評定此等因素之影響，使蛋白質調配物在短期儲存期間暴露於高溫，例如40°C(加速儲存)，以便模擬長期儲存，且很快瞭解在較低溫度(例如2至8°C)下長期儲存之調配可行性。為評定即時儲存穩定性，亦將樣品保持於2至8°C。

遮光分析

進行遮光分析來量測聚集DVD-Ig蛋白質溶液之不溶微粒含量。遮光量測設備(顆粒計數器，注射器型，Klotz Bad Liebenzell, Germany，S20037系列)配備有層流空氣罩(Thermo Electron Corp.,

Asheville, NC ; 型號ULT2586-9-A40)以使量測期間的外來顆粒污染降至最低。遮光分析如下進行。在層流空氣流條件下將3.5 ml樣品置於5 ml圓底試管中。最初0.8 ml沖洗之後，根據製造商說明書，以n=3模式(每次單一量測0.8 ml)進行量測。

差示掃描熱量測定(DSC)

DSC分析之前，使用Slide-A-Lyzer卡匣(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)，使DVD-Ig蛋白質透析至適合緩衝系統中。此緩衝系統(例如5 mM磷酸鹽/5 mM檸檬酸鹽)亦用作DSC量測之參考物/空白對照。抗體是在1至2 mg/ml下分析。使用自動化VP-Capillary DSC系統(MicroCal, Piscataway, NJ)。藉由在25°C至95°C溫度範圍內應用1°C/分鐘掃描速率來研究分子展開情況。其他量測參數如下：擬合週期：16秒；預掃描等待時間：10分鐘；反饋模式：無。

空氣/液體界面搖振研究

搖振研究是在速度為150 rpm (每分鐘轉數)的HS 260 IKA搖振器(Wilmington, NC)上，在6R玻璃小瓶中，在1 mg/ml濃度下進行。以多個週期搖振之後，評估樣品之光學密度。類似地，亦對在多個時間點拉伸的樣品進行SEC。

PEG溶解度

溶解性研究使用PEG 3000。製備PEG 3000於水中之50% w/v溶液。將此溶液之小份等分試樣以0.5 mg/ml濃度添加至蛋白質於緩衝液中之儲備溶液中。記錄發生沈澱時第一個跡象所需的總體積。

實際溶解度

爲了評估實際溶解度，將DVD-Ig蛋白質濃縮且在5°C儲存隔夜。目測檢查溶液之沈澱物、相分離、混濁度等。檢查清液層(或兩個相)之所溶解濃度。

近UV-CD

在Jasco光譜儀(JASCO分析儀器, Easton, MD)上，在250 nm與320 nm之間，使用2 ml小瓶填充物，在1 mg/ml濃度下進行近UV-CD掃描。掃描速率為50奈米/分鐘且平均掃描3次。收集資料之前，藉由開燈使光譜儀平衡。

ATR-FTIR光譜法

在Bruker ATR-FTIR (Bruker Optics, Billerica, MA)上，使用10 μ l溶液，在1 mg/ml濃度下進行FTIR掃描。收集400至4000 cm^{-1} 之間的掃描，且校正面積且再求導，隨後使用Origin軟體 (OriginLab, Northampton, MA)進行曲線擬合。

光散射

使用173°之反向散射角度，在Malvern zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)上進行光散射研究。使用甲苯作為標準物且使用緩衝液(例如乙酸鹽、組胺酸及Tris)作為空白對照。使用自動化模式。

動態掃描螢光測定法(DSF)

使用DSF評定蛋白質展開傾向。該技術涉及向蛋白質樣品中添加染料Sypro Orange。此螢光染料對疏水表面敏感且在此環境下顯示螢光增強。接著加熱具有染料之樣品且監測隨溫度而變的螢光信號。隨著溫度升高，蛋白質開始展開且暴露其內部疏水性。此使染料結合至此區域及產生較大螢光信號。信號開始增強時之溫度為起始溫度(T_{on})。固有穩定性較低的蛋白質更傾向於展開且其 T_{on} 值低於固有穩定性較大的蛋白質。DSF亦為96孔形式快速篩選純系提供高通量工具且消除DSC中較大量樣品及較長操作時間之潛在侷限性。向27 μ l DVD-Ig蛋白質溶液中添加6 μ l 0.4 $\times$ SYPRO橙色染料(Invitrogen, Carlsbad, CA)。掃描速率為1°C/分鐘且掃描在25至75°C進行。

凍乾法

根據標準方法凍乾DVD-Ig蛋白質且研究所得凍乾物之穩定性。

樣品製備及凍乾

小瓶用經熱壓處理且經乾燥之Iyo塞子塞緊。隨後，小瓶用冷凍乾燥器進行凍乾。典型循環顯示於下表4中。樣品復原為100 mg/ml DVD-Ig蛋白質溶液。

表4：用於凍乾DVD-Ig蛋白質的典型冷凍乾燥循環

步驟		儲存溫度	時間/步驟	步驟時間	壓力
		[°C]	[hh:mm]	[min]	[mbar]
0	開始	20	0:00:00	0	1000
1	裝載	20	0:00:00	0	1000
2	冷凍I (勻變)	0	0:20:00	20	1000
3	冷凍I	0	2:10:00	130	1000
4	冷凍II (勻變)	-45	1:20:00	80	1000
5	冷凍II	-45	3:00:00	180	1000
6	調整真空	-45	1:00:00	60	0.066
7	一次乾燥I (勻變)	-25	1:00:00	60	0.066
8	一次乾燥I	-25	70:00:00	4200	0.066
9	二次乾燥II (勻變)	25	2:00:00	120	0.066
10	二次乾燥II	25	0:15:00	15	0.036
11	二次乾燥II	25	8:00:00	480	0.036
12	保持步驟(勻變)	5	0:30:00	30	0.036
13	保持步驟	5	0:00:00	0	0.036
14	排出N2氛圍	5	0:00:00	0	500
	總計			5375	

I. DVD-IG蛋白質穩定性

實例1至3表明，DVD-Ig蛋白質穩定性較低，例如更容易聚集，且因DVD-Ig蛋白質之結構複雜性增大而具有比抗體低的解鏈溫度。

實例1. DVD-Ig蛋白質與抗體之熱力學比較

進行實驗以測定DVD-Ig蛋白質之穩定性(與抗體相比)。對IgG1分子(單株抗體，mAb)及DVD-Ig進行差示掃描熱量測定(DSC)以確定兩種分子之熱力學特性的差異。特定而言，進行DSC來比較例示性抗體(布雷單抗，一種抗IL12單株抗體)之熱力學特性與DVD-Ig蛋白質(TNF/PGE2；DVD-B)之熱力學特性。調配物資訊及DSC條件提供於

下文實例2中。布雷單抗之DSC概況與TNF/PGE2 (DVD-B)之DSC概況的比較顯示，三區域展開相對於四區域展開存在差異(圖1)。由圖1亦瞭解，DVD-Ig蛋白質之熱展開開始時間早於抗體，此表明DVD-Ig分子之總體熱力學穩定性(或內在穩定性)低於抗體。應注意，雖然圖1中之DVD-Ig蛋白質(DVD-B)的DSC概況表示初始展開是在約50°C，但若結果來自其他穩定性測試，則此相同DVD-Ig蛋白質鑑定為LS-DVD-Ig蛋白質。

mAb之熱力學穩定性(例如展開起始點，如藉由動態掃描熱量測定所測定)通常比表1中所列之一組DVD-Ig蛋白質高約5°C。雖然一組DVD-Ig蛋白質之展開溫度與聚集傾向之間通常不直接相關，但可利用該等值篩選以評定指定DVD-Ig蛋白質組的穩定性。因此，可利用起始展開溫度鑑別AS-DVD-Ig蛋白質或LS-DVD-Ig蛋白質。如圖4中所述，總體分佈顯示，DVD-Ig蛋白質通常具有低於抗體的展開溫度。圖4提供16種不同DVD-Ig蛋白質及14種不同抗體的彙編結果。圖4所述之研究中進行的分析類似於上文及圖1中所述。

實例2. pH值對DVD-Ig蛋白質於溶液中之穩定性的影響

使用差示掃描熱量測定(DSC)評估調配於具有4、6或8之pH值之溶液中之DVD-Ig蛋白質的熱力學穩定性(內在穩定性)。所有調配物均具有5 mM檸檬酸鹽/5 mM磷酸鹽緩衝液中1 mg/ml之DVD-Ig蛋白質濃度。以1°C/分鐘之掃描速率進行加熱。顯示pH值對多種DVD-Ig蛋白質之穩定性之影響的結果提供於下表5中。表5中所述之Tm1至Tm4表示各種區域(例如CH1、CH2及CH3區域等)之熱解鏈/展開溫度。亦描述兩種抗體(阿達木單抗及布雷單抗)之穩定性用於比較。

表5：如藉由差示掃描熱量測定(DSC)所評定，pH值對具有pH 4、6或8之DVD-Ig蛋白質調配物之穩定性的影響

DVD-Ig	pH	Tm1℃	Tm2℃	Tm3℃	Tm4℃	起始℃
5	4	62.3	63.9	73.9	80.7	45
6	4	61.5	69.5	75.4	82.2	45
37	4	61.4	66.7	77.1	82.7	52
38	4	68.4	70.4	75.8	81.6	56
53	4	58.6	67.9	76.5	82.7	46
54	4	66	67.9	75.2	82.6	52.5
65	4	61.3	69	73.9	81.3	52.5
66	4	65.5	67.6	74.7	81.9	55
165	4	63	67.4	75.4	82.1	47.5
166	4	67.3	71.7	74.9	82.4	55
257	4	66.2	69.2	76.6	83.5	52.5
258	4	68.2	69.6	78.8	83.7	55
277	4	61.4	64.8	75.3	82.6	50
278	4	55.8	67.5	76.1	82.8	45
281	4	65.8	68.4	79.1	83.1	55
282	4	73.1	75	77.4	83.8	57.5
5	6	61.9	65.1	76	81.8	50
6	6	61.6	69.8	76.2	81.9	48
37	6	60.4	67.5	77.2	83.1	51
38	6	69.07	70.3	75.9	82	57.5
53	6	58.3	67.05	76.4	82	49
54	6	65.8	67.6	74.9	82	56
65	6	61.2	67.3	73.4	82.4	51.5
66	6	65.3	67.5	74.8	81.9	55
165	6	62.6	67.3	75.7	82.1	50
166	6	67.3	71	74	82	54
257	6	66.6	69.2	75.8	82.9	57
258	6	67.8	70	77.5	79.5	55
277	6	61.4	65.8	74.7	82.23	52.5
278	6	56.6	66.7	75.8	82.3	45
281	6	65.8	67.8	78.6	81.7	53
282	6	69.8	75	77.9	83.4	57
5	8	65.16	68.35	77	82.48	45
6	8	62	69.07	73.08	82.61	45
38	8	68.4	70.7	74.8	82.8	50
53	8	57.6	68.7	75	83	40
54	8	65.5	67.6	74.5	82.8	52.5
65	8	61	69.6	72.5	82.8	48
66	8	64.8	67.1	72.4	82.9	52.5
165	8	63.9	68.6	74.1	82.6	47.5
166	8	64.3	69.3	74	82.7	45
257	8	67.2	69.3	76.7	83.6	55
258	8	69.5	71.4	78.1	83.9	53
277	8	60.18	68.98	74.5	83	50
278	8	52.8	68.8	75.8	83.02	44
281	8	65.2	67.1	78.3	83.2	51
282	8	71.9	74.5	77.4	83.9	55
mAb						
阿達木單抗	6	72	76	84	NA	62

DVD-Ig	pH	Tm1℃	Tm2℃	Tm3℃	Tm4℃	起始℃
布雷單抗	6	69	76	83	NA	59

如表5中所示，DVD-Ig蛋白質通常具有大於約50℃之起始展開溫度，且解鏈溫度因此稍低於抗體及其他穩定蛋白質之解鏈溫度。實例2顯示布雷單抗及阿達木單抗之起始溫度在pH 6下為約60℃，而DVD-Ig蛋白質之平均值為約53℃。

資料亦顯示DVD-Ig蛋白質在pH 6及pH 8之解鏈溫度高於在pH 4之解鏈溫度。因此，pH值影響DVD-Ig蛋白質之物理化學穩定性，且在約pH 6，穩定性看似最佳。

為進一步評定長期儲存期間溶液pH值對DVD-Ig蛋白質調配物穩定性的影響，儲存之前(T0)或加速儲存3個月之後(T3m)，使用SEC分析DVD-Ig蛋白質調配物。評估在pH 4、pH 6或pH 8所調配之溶液中之DVD-Ig蛋白質(1 mg/ml DVD-Ig蛋白質在5 mM檸檬酸鹽/5 mM磷酸鹽緩衝液中，該緩衝液中存在80 mg/ml蔗糖)的儲存穩定性。對於加速儲存，將樣品填入無菌小瓶(各約500 µl)中且在40℃，在控制條件下儲存(在恆溫室中避光儲存)。使用SEC測定DVD-Ig蛋白質單體(Mon)聚集物(Agg)及片段(Frag)之百分比。

表6：pH值對1 mg/ml DVD-Ig蛋白質溶液在加速儲存之前及之後之穩定性的影響

DVD-Ig	pH	Mon/T0	Mon/T3m	Agg/T0	Agg/T3m	Frag/T0	Frag/T3m
5	4	91.14	57.51	5	0.79	3.85	41.6
6	4	97.38	62.46	2.29	4.11	0.31	33.4
38	4	94.9	56.52	3.58	22.02	1.5	21.44
53	4	97.61	28.11	0.99	53.94	1.38	17.93
54	4	96.57	53.89	1.93	15.2	1.48	30.89
65	4	94.46	50.35	1.33	26.21	4.21	23.42
66	4	97.99	58.39	0.9	17.72	1.1	23.87
165	4	96.2	68.38	2.25	3.18	1.53	28.42
166	4	97.09	66.3	0.76	0.66	2.14	30.55
258	4	98.61	45.42	0.46	30.56	0.91	24
277	4	97.05	61.26	1.55	11.48	1.38	27.23
278	4	98.33	45.58	0.9	28.13	0.76	26.27
5	6	90.46	81.75	7.02	3.04	2.51	12.77
6	6	97.02	85.44	2.78	2.71	0.18	11.82

38	6	95.31	87.89	3.48	5.48	1.2	6.61
53	6	97.75	86.68	1.02	6.21	1.22	7.08
54	6	96.48	88.03	2.07	5.37	1.43	6.59
65	6	94.89	87.13	0.89	5.78	4.21	7.06
66	6	97.99	88.93	0.9	5.13	1.09	5.91
165	6	96.21	86.31	2.24	5.84	1.53	7.82
166	6	98.6	89.37	1.39	0.92	0	7.38
258	6	98.98	84.76	0.2	9.41	0.81	5.81
277	6	97.48	83.96	1.48	5.11	1.03	10.91
278	6	98.65	79.81	0.78	9.52	0.56	10.65
5	8	90.21	67.86	7.26	4.51	2.51	22.75
6	8	97.36	76.33	2.44	8.89	0.18	14.76
38	8	95.09	80.11	3.47	9.37	1.42	10.5
53	8	97.81	79.63	0.96	9.82	1.22	10.53
54	8	96.69	81.13	1.93	9.44	1.37	9.41
65	8	93.12	79.5	1.27	9.88	5.59	10.59
66	8	97.69	81.37	0.99	9.17	1.31	9.44
165	8	96.57	71.02	2.03	18.85	1.39	10.11
166	8	97.23	79.76	0.76	1.92	1.99	11.3
258	8	98.67	84.22	0.24	5.91	1.07	9.84
277	8	97.06	70.08	1.72	16.13	1.2	13.78
278	8	98.18	43.34	0.98	45.59	0.83	11.04

表6中之結果顯示，DVD-Ig蛋白質最初可在pH 4至pH 8之pH值範圍內調配且新鮮製備之樣品在T0之初始值不顯示嚴重差異。然而，加速儲存之後，DVD-Ig蛋白質在pH 4及pH 8顯示明顯單體損失且聚集物或片段相應增多。

所測試DVD-Ig蛋白質之穩定性在約pH 6最高。與在pH 4或在pH 8相比，所測試之所有DVD-Ig蛋白質(包括DVD 5、DVD 6、DVD 38、DVD 53、DVD 54、DVD 65、DVD 66、DVD 165、DVD 166、DVD 258、DVD 277及DVD 278)在pH 6具有較大單體百分比及較低片段百分比。

所測試之十二種DVD-Ig蛋白質中有九種在pH 6顯示的聚集物百分比低於在pH 4顯示的聚集物百分比，且對於顯示相反模式之三種DVD-Ig蛋白質而言，聚集物在pH 6及pH 4之百分比的差異極小(差異小於2.7%)。此外，所測試之十二種DVD-Ig蛋白質中有十一種在pH 6顯示的聚集物百分比低於在pH 8顯示的聚集物百分比。因此，加速儲

存引起聚集物形成增加。然而，增加小於預期，在pH 6尤其如此。

溶液pH值對IL12IL18 DVD-Ig蛋白質調配物之儲存穩定性的影響

為評定儲存期間溶液pH值對DVD-Ig蛋白質調配物之穩定性的影響，儲存之前(T0)或在5℃、40℃或50℃儲存4天(4d)、7天(7d)或21天(21d)之後，使用SEC及IEC分析溶液pH值為4、6或8的DVD-Ig蛋白質調配物(參見表6、表7及表8)。所評估之溶液於10 mM檸檬酸鹽及10 mM磷酸鹽緩衝液中具有2 mg/ml之IL12-IL18 DVD-Ig濃度。將樣品填入無菌小瓶(各約500 µl)中且在控制條件下儲存(在恆溫室中避光儲存)。使用SEC測定DVD-Ig蛋白質單體、聚集物及片段之百分比(參見表7)且使用IEC評定主要、酸性及鹼性物質之數目。

表7：如使用SEC所量測，具有pH 4、6或8之IL12-IL18 DVD-Ig蛋白質調配物之儲存穩定性

	單體			聚集物			片段		
	pH 4	pH 6	pH 8	pH 4	pH 6	pH 8	pH 4	pH 6	pH 8
T0	97.64	97.61	97.84	1.35	1.36	1.23	1.01	1.03	0.94
在5℃儲存									
4d, 5℃	97.98	97.64	97.95	1.07	1.31	1.19	0.95	1.06	0.87
7d, 5℃	97.68	98.02	97.8	1.25	1.17	1.08	1.07	0.81	1.11
21d, 5℃	98.13	97.81	97.64	1.23	1.17	1.08	0.88	0.96	1.28
在40℃加速儲存									
4d, 40℃	97.21	97.32	96	0.56	1.4	1.68	2.24	1.28	2.32
7d, 40℃	96.15	97.32	94.57	0.71	1.35	1.96	3.15	1.33	3.48
21d, 40℃	91.99	96.39	91.31	1.16	1.49	3.15	6.85	2.12	5.54
在50℃加速儲存									
4d, 50℃	90.2	97.07	91.73	5.54	1.46	2.78	4.26	1.47	5.49
7d, 50℃	83.19	96.35	81.32	9.66	1.42	10.68	7.15	2.24	8.2
21d, 50℃	52.98	91.36	46.57	33.1	4.17	33.35	13.91	4.47	17.18

SEC資料顯示IL12IL18 DVD-Ig蛋白質調配物在pH 6最穩定。在pH 6，所儲存IL12IL18 DVD-Ig蛋白質調配物通常顯示>95%單體及<2%聚集物。甚至在50℃維持21天之加速儲存條件下，調配物保持>90%單體及<5%聚集物。IL12IL18 DVD-Ig調配物在pH 6比在pH 4及pH 8更穩定，在較長持續時間及較高溫度儲存條件(例如21天，50℃

條件)下尤其如此。根據此等結果，若在50℃儲存之後得到穩定性結果，則IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質被認為是AS-DVD-Ig蛋白質。

表8：如使用IEC所量測，具有pH 4、6或8之IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質調配物之儲存穩定性

	主要物質			酸性物質			鹼性物質		
	pH 4	pH 6	pH 8	pH 4	pH 6	pH 8	pH 4	pH 6	pH 8
T0	69.98	71.6	69.13	14.96	15.21	18.12	15.06	13.19	12.75
4d, 5℃	70.32	71	68.46	15.08	15.54	18.84	14.6	13.46	12.75
7d, 5℃	69.74	70.69	67.14	15.43	15.91	19.71	14.83	13.41	13.15
21d, 5℃	69.67	71.32	66.78	15.65	16.26	20.95	14.68	12.42	12.26
4d, 40℃	56.43	68.09	43.52	21.14	18.73	45.51	22.33	13.19	10.97
7d, 40℃	49.1	65.11	26.55	26.08	22.03	59.93	24.83	12.86	13.53
4d, 50℃	36.58	57.09	25.88	29.47	29.48	48.23	33.95	13.43	25.89

IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質調配物在pH 4、6及8的IEC資料顯示，化學降解與pH值及儲存溫度有關。觀測到在5℃儲存之樣品的化學穩定性最高。21天之後所偵測到之穩定性微小變化表明，IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質在此儲存溫度下穩定，對於商業生物治療劑而言，此被認為是常見的。雖然穩定性差異小，但觀測到調配物在pH 6的化學穩定性最高。在40℃及50℃之高儲存溫度下，化學穩定性之缺乏甚至更顯著。

實例3. DVD-Ig蛋白質比單株抗體更容易聚集

檢查搖振對抗體(相對於DVD-Ig蛋白質)聚集的影響。搖振為可引起分子聚集的應力。使用在6R小瓶中具有1 mg/ml蛋白質濃度的溶液(10 mM檸檬酸鹽/10 mM磷酸鹽之pH 6溶液)，對DVD-Ig蛋白質TNF/PGE2 (DVD-B)在搖振之後聚集的敏感性與單株抗體布雷單抗進行比較。將5 ml蛋白質溶液樣品填入6R小瓶且在HS 260 IKA搖振器(Wilmington, NC)上，以每分鐘150轉(rpm)之速度搖振不同時長(0、5、24、48或96小時)。檢查樣品在500 nm之光學密度，得到溶液混濁度之量測結果。較高混濁度表明聚集較大且穩定性較小。結果顯示於

表9中，揭露DVD-Ig蛋白質比單株抗體更容易聚集。

表9：搖振對TNF/PGE2 DVD-Ig蛋白質及布雷單抗之1 mg/ml溶液之OD₅₀₀的影響

時間(h)	在500 nM之光學密度(OD)	
	布雷單抗	TNF/PGE2 (DVD-B)
0	0	-0.0095
5	0.001	0.01175
24	0.01	0.0949
48	0.025	0.295
96	0.045	0.58

如顯示溶液混濁度之OD₅₀₀量測結果所指示，搖振使得DVD-Ig蛋白質相較於單株抗體形成更多亞可見及可見聚集物。因此，搖振48小時之後，DVD-Ig蛋白質更傾向於膠態不穩定性且穩定性因此比單株抗體低。DVD-Ig蛋白質之可見聚集物形成大於單株抗體表明，DVD-Ig蛋白質於溶液中針對剪應力的穩定性通常小於單株抗體。此外，此等結果表明，並非所有DVD-Ig蛋白質在pH 6均與單株抗體一樣穩定。

II. 用於鑑別水性穩定DVD-Ig蛋白質(AS-DVD-Ig)之分析

實例4. DVD-Ig蛋白質可以「水性穩定」或「水性非穩定」表徵

如上文所述，本發明者發現，調配物中DVD-Ig蛋白質在水性狀態下受困於某些問題，諸如DVD-Ig蛋白質單體之聚集及/或片段化。本發明者進行實驗且意外且不能預料地發現，DVD-Ig蛋白質之子組可在水性狀態下，甚至在高濃度下穩定地調配。以下實例描述SEC研究，其意外地顯示DVD-Ig蛋白質可以水性穩定(例如DVD-Ig蛋白質顯示低單體相對峰面積百分比變化)或水性非穩定(例如DVD-Ig蛋白質傾向於聚集及/或片段化)表徵。顯然，發現許多所測試DVD-Ig蛋白質為水性非穩定或非穩定凍乾型。由於高濃度下之DVD-Ig蛋白質之結構複雜性及顯著疏水性相互作用，因此未預期DVD-Ig蛋白質在高濃度下會穩定存在於調配物中。

為評定在蛋白質液體調配物之加速或長期儲存期間儲存溫度對蛋白質穩定性的影響，使多種DVD-Ig蛋白質在短期儲存期間暴露於高溫，以便很快瞭解在較低溫度(例如2至8℃)下長期儲存的調配可行性。

高濃度下儲存14天之穩定性篩選

儲存之前(T=0)或加速儲存14天之後(T=14天)，使用SEC分析濃度為60 mg/ml的DVD-Ig蛋白質調配物(表10)。評估DVD-Ig蛋白質溶液(60 mg/ml，10 mM檸檬酸鹽/10mM磷酸鹽緩衝液及80 mg/ml蔗糖)在40℃的儲存穩定性。所定義之儲存期之後，拉伸樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。簡言之，將樣品填入無菌小瓶(各約500 μ L)中且在40℃，在控制條件下儲存(在恆溫室中避光儲存)。在預定時間點，將所製備溶液之樣品拉伸以便根據樣品拉伸方案分析。使用SEC測定DVD-Ig蛋白質單體(Mon)、聚集物(Agg)及片段(Frag)之百分比，且結果呈現於表10中。

表10：DVD-Ig蛋白質溶液之高濃度對儲存穩定性的影響

DVD-Ig	Mon/T0	Mon/T14d	Agg/T0	Agg/T14d	Frag/T0	Frag/T14d
5	79.1	73.28	19.12	24.26	1.77	2.44
6	84.01	89.46	12.69	9.81	3.29	0.71
37	92.85	74.35	6.34	23.42	0.8	2.21
65	95.4	92.79	1.31	5.39	3.28	1.79
66	96.56	94.49	1.08	3.88	2.35	1.6
165	90.17	64.09	8.99	33.44	0.83	2.45
166	98.17	94.93	1.09	3.11	0.72	1.93
257	94.83	76.47	4.77	21.78	0.39	1.72
277	97.46	85.06	1.77	13.19	0.76	1.73
278	98.45	73.01	1.06	25.69	0.48	1.27
281	93.92	68.01	2.78	30.5	3.29	1.46
282	98.34	95.39	1.03	3.05	0.62	1.54

如表10中所示，本發明者意外地發現，所測試之DVD-Ig蛋白質之子組當在水性狀態下調配時穩定。加速儲存14天之後，所測試之十二種DVD-Ig蛋白質中有十種(DVD 5、DVD 6、DVD 37、DVD 65、

DVD 66、DVD 166、DVD 257、DVD 277、DVD 278及DVD 282)顯示小於26%聚集物形成且具有大於73%單體。所測試之DVD-Ig蛋白質中有五種(DVD 6、DVD 65、DVD 66、DVD 166及DVD 282)顯示小於10%之聚集物形成且其中有三種(DVD 66、DVD 166及DVD 282)顯示小於5%之聚集物形成。

如上所述，某些DVD-Ig蛋白質(「水性穩定DVD-Ig」蛋白質或「AS-DVD-Ig」蛋白質)甚至在高濃度(例如60 mg/ml或高於60 mg/ml之濃度)下調配時，在40°C加速儲存14天之後，保持穩定(例如如藉由SEC所測定，小於6%單體相對(rel.)峰面積變化或小於10%單體相對(rel.)峰面積變化)。如基於DVD-Ig蛋白質之一般結構及實例1至3中所述之穩定性研究所預計，大部分DVD-Ig蛋白質在加速儲存期間傾向於聚集(非AS-DVD-Ig蛋白質)。因此，在某些實施例中，當在40°C，在pH 6，在>50 mg/ml儲存14天形成10%或小於10%淨聚集物時，視為將AS-DVD-Ig蛋白質與非AS-DVD-Ig蛋白質分離的截止值，如上述非限制實例中所見，其中十二種所測試DVD-Ig蛋白質中有五種在此含量下顯示聚集物形成。在某些實施例中，當在40°C，在pH 6，在>50 mg/ml儲存14天形成6%或小於6%淨聚集物時，視為將AS-DVD-Ig蛋白質與非AS-DVD-Ig蛋白質分離的截止值，如上述非限制實例中所見，其中十二種所測試DVD-Ig蛋白質中有四種在此含量下顯示聚集物形成。

許多DVD-Ig蛋白質未顯示低聚集度，例如在5°C儲存21天之後1%或小於1%聚集度，或在40°C儲存21天之後10%或小於10%聚集度。舉例而言，在具有50 mg/ml之TNF/IL13 DVD-Ig蛋白質濃度之溶液在4°C或40°C儲存7天之後檢查單體損失的分析中，如藉由SEC所測定，許多DVD-Ig蛋白質顯示單體損失增大。在一些情況下，當單體含量在此等情況下增加(例如一些聚集物解離且形成反向單體且因此損失

明顯降低)時，單體損失量為負。第三實驗在4℃下測試具有50 mg/ml DVD-Ig蛋白質濃度之溶液中的TNF/SOST DVD-Ig蛋白質。如在關於TNF/IL13 DVD-Ig蛋白質的實驗中，許多DVD-Ig蛋白質顯示單體損失增大(藉由SEC測定)。

顯然，亦可利用上述分析辨別穩定凍乾DVD-免疫球蛋白(LS-DVD-Ig)蛋白質。當在40℃，在pH 6，在>50 mg/ml儲存14天形成15%或小於15%淨聚集物時，視為將AS-DVD-Ig蛋白質與非AS-DVD-Ig蛋白質分離的截止值。因此，上述分析中所測試之引起小於10%或小於6%聚集度或小於10%或小於6%單體相對(rel.)峰面積變化的DVD-Ig蛋白質被認為是AS-DVD-Ig蛋白質與LS-DVD-Ig蛋白質，且引起小於15%聚集度或小於15%單體相對(rel.)峰面積變化的DVD-Ig蛋白質被認為是LS-DVD-Ig蛋白質。AS-DVD-Ig蛋白質與LS-DVD-Ig蛋白質僅佔所測試之總體DVD-Ig蛋白質之一部分。

III.非AS-DVD-Ig蛋白質在調配物中之穩定性

以下實例提供的資料顯示與AS-DVD-Ig蛋白質(章節IV至VIII中所述)相比，非AS-DVD-Ig蛋白質(未通過聚集測試，亦即如上文實例4中所述，顯示超過例如6%聚集度)於調配物中之穩定性。

實例5：濃度對例示性非AS-DVD-Ig蛋白質之儲存穩定性的影響

為評定蛋白質濃度對長期儲存穩定性之影響，將濃度為1、2、5、10、25、50及75 mg/ml之例示性非AS-DVD-Ig蛋白質之調配物在40℃儲存14天。調配物具有pH 6且存在於單獨15 mM組胺酸緩衝液中。將樣品填入無菌小瓶(各約500 µl)中且在控制條件下儲存(在恆溫室中避光儲存)。使用SEC分析樣品以測定儲存之後的聚集物百分比。所得資料提供於表11中。

表11：在40℃儲存14天之後，如使用SEC所量測之DVD-B蛋白質的總聚集物百分比

DVD-B濃度	聚集物%
1 mg/ml	0
2 mg/ml	0.2
5 mg/ml	3.64
10 mg/ml	6.76
25 mg/ml	18.02
50 mg/ml	32.82
75 mg/ml	48.28

表11中資料表明，在測試條件下(亦即pH 6，15 mM組胺酸緩衝液)，DVD-B變得不穩定，亦即達到高濃度時，在40℃儲存14天之後形成高比例之聚集物。在25 mg/ml或大於25 mg/ml之濃度下，所形成之聚集物百分比超過18%。因此，如儲存期間聚集度增加所證明，DVD-B (非AS-DVD-Ig蛋白質)在組胺酸緩衝液中不穩定。

實例6：pH值、離子強度及濃度對例示性非AS-DVD-Ig蛋白質之儲存穩定性的影響

為評定pH值、離子強度及濃度對溶液中之DVD-Ig蛋白質之儲存穩定性的影響，在40℃及5℃評估DVD-B之多種調配物(5 mg/ml及100 mg/ml)。所定義之儲存期之後，拉伸樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。使用以下緩衝液：pH 4.5使用乙酸鹽，pH 6使用組胺酸且pH 8使用Tris。1 mM離子強度溶液使用2 mM濃度之緩衝液且20 mM及100 mM離子強度溶液使用10 mM濃度之緩衝液(使用氯化鈉進一步維持離子強度)。將樣品填入無菌小瓶中(各約500 µl)，且在控制條件下，在恆溫室中避光儲存。在5℃儲存3個月(5C，3m)或在40℃儲存21天(40C，21d)之後，使用SEC分析所製備溶液之樣品。使用SEC量測之淨聚集物數目呈現於表12中。表13及表14進一步顯示，添加不同穩定劑/賦形劑(例如蔗糖及Tween 80)未使得在所定義時間點之後剩餘之單體百分比顯著改良(結果使用上述方法獲得)。低濃度樣品在初始時間點之淨聚集度值之負值亦表示初始形成可逆聚集物。

表12：如SEC所量測，DVD-B蛋白質在多種調配物條件下儲存對聚集物形成量的影響

DVD-Ig蛋白質濃度及儲存條件	pH	所添加離子強度	聚集物(淨)
DVD-B，100 mg/ml，5℃，3m	4.5	1	49.51
		20	54.79
		100	56.64
		0	11.68
	6	1	6.6
		20	9.4
		100	7.85
	8	1	5.66
		20	8.08
		100	7.87
DVD-B，5 mg/ml，40℃，21d	6	0	-6.56
		1	-3.3
		20	10.79
		100	9.99
DVD-B，100 mg/ml，40℃，21d	6	0	73.37
		1	70.39
		20	77.39
		100	65.4

表13：多元醇及聚山梨醇酯對組胺酸緩衝液pH 6中之1 mg/ml DVD-B之穩定性幾乎無作用至無作用

	樣品編號	單體	聚集物	片段	AUC
組胺酸緩衝液					
T0		98.97	0.34	0.67	79787
T4，40℃	1	98.13	0.82	1.04	78552
	2	97.98	0.87	1.13	78622
	平均值	98.055	0.845	1.085	78587
T7，40℃	1	97.45	1.15	1.39	77836
	2	97.42	1.2	1.36	78137
	平均值	97.435	1.175	1.375	77986.5
T21，40℃	1	92.21	4.34	3.44	170875
	2	93.19	3.7	3.1	72149
	平均值	92.7	4.02	3.27	121512
T4，50℃	1	94.06	4.15	1.77	39698
	2	93.37	4.44	2.18	43002
	平均值	93.715	4.295	1.975	41350
T7，50℃	1	93.09	3.9	2.99	26451
	2	91.95	4.81	3.22	30158
	平均值	92.52	4.355	3.105	28304.5
30 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80					
T0		97.5	1.61	0.88	62902
T21，40℃	1	95.19	1.47	2.95	79362

	樣品編號	單體	聚集物	片段	AUC
	2	95.56	1.67	3.13	79445
	平均值	95.375	1.57	3.04	79403.5
T4, 50°C	1	94.94	3.38	1.66	80742
	2	94.98	3.3	1.62	79436
	平均值	94.96	3.34	1.64	80089
T7, 50°C	1	91.06	6.71	2.21	79672
	2	91.01	6.6	2.37	79820
	平均值	91.035	6.655	2.29	79746

向調配物中添加多元醇使得單體含量稍微提高且使得 1 mg/ml DVD-B之聚集度降低。

表14：聚山梨醇酯對組胺酸緩衝液pH 6中之100 mg/ml DVD-B之穩定性幾乎無作用至無作用

緩衝液：15 mM組胺酸				
	單體	聚集物	片段	AUC
T0	96.26	2.43	1.3	73681
T7 (小瓶1)	41.4	56.1	2.34	64692
T7 (小瓶2)	42.5	55.2	2.14	63246
T7 (平均值)	41.95	55.65	2.24	63969
T21(小瓶1)	37.2	60.03	2.76	52389
T21(小瓶2)	38.8	58.05	3.13	50722
T21(平均)	38	59.04	2.945	51555.5
緩衝液：15 mM組胺酸+ 0.02%Tween 80				
	單體	聚集物	片段	AUC
T0	96.22	2.43	1.33	72007
T7 (小瓶1)	42.9	54.8	2.2	65403
T7 (小瓶2)	47	50.8	2.09	58048
T7 (平均值)	44.95	52.8	2.145	61725.5
T21(小瓶1)	40.32	54.54	5.12	32321
T21(小瓶2)	38.38	55.9	5.7	30927
T21(平均值)	39.35	55.22	5.41	31624

向調配物中添加多元醇使得單體含量稍微提高且使得100 mg/ml DVD-B之聚集度降低。

表15：多元醇或界面活性劑不能使DVD-B (1 mg/ml)之穩定性改良

pH 6調配物	單體(%)			聚集度(%)			片段(%)		
	T0	1M	3M	T0	1M	3M	T0	1M	3M
15 mM磷酸鈉	96.45	90.03	80.83	1.41	5	9.09	2.12	4.95	10.06
15 mM檸檬酸鈉	96.51	90.72	85.3	1.44	5.3	6.57	2.04	3.97	8.11
15 mM丁二酸鈉	96.06	87.41	78.17	1.53	5.46	8.24	2.39	7.11	13.57
15 mM乙酸鈉	96.14	89.62	81.8	1.48	4.76	7.52	2.36	5.6	10.66

15 mM精胺酸	96.12	92.48	85.72	1.65	3.39	5.59	2.21	4.11	8.68
15 mM組胺酸	96.42	91.82	81.6	1.29	3.85	6.39	2.28	4.32	12
自緩衝液	96.03	88.79	81.44	1.57	3.91	4.18	2.38	7.29	14.37
UB 10 mg/ml甘露醇	95.86	90.18	84.08	2.01	5.74	8.09	2.11	4.07	7.81
UB 10 mg/ml山梨糖醇	96.49	89.36	84.09	1.38	6.56	7.68	2.11	4.07	8.21
UB 10 mg/ml蔗糖	96.12	90.03	84.26	1.58	5.92	7.62	2.28	4.03	8.11
UB 10 mg/ml海藻糖	96.34	89.97	84.31	1.5	5.98	7.59	2.14	4.03	8.09
UB 2.5%甘胺酸	96.43	87.22		1.42	8.59		2.13	4.17	
UB 15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	96.69	90.92	85.76	1.22	4.97	5.68	2	4.1	8.55
UB 20 mM NaCl	96.44	90.35	84.36	1.41	5.5	6.74	2.13	4.13	8.88
UB 200 mM NaCl	96.37	91.85	85.2	1.52	3.24	3.62	2.09	4.89	11.16

UB=檸檬酸鹽/磷酸鹽緩衝液

資料顯示雖然分析不同溶液條件，但DVD-B即使在pH 6下亦並非極穩定(參見例如表13)。此外，在pH 6，離子強度與淨聚集物形成不顯示一致關係。形成大量聚集物(甚至在5°C儲存條件下)指示不良穩定性。此外，添加多元醇及/或界面活性劑未使DVD-B聚集改良(參見表13、表14及表15)。

如上文實例1至3中所述，許多DVD-Ig蛋白質內在不穩定。然而，如實例4中所述，某些DVD-Ig蛋白質意外地具有穩定特徵。以下實例中所述之實驗表明，AS-DVD-Ig蛋白質出乎意料地可穩定調配，即使在高濃度下亦如此，不論胺基酸序列之差異。以下實例是與實例5及6進行對比，其顯示非AS-DVD-Ig蛋白質無法調配。

IV. AS-DVD-Ig蛋白質穩定存在於含有4.5至7.5範圍pH值之緩衝液的調配物中

實例7：緩衝液濃度對DVD-Ig蛋白質穩定性的作用

緩衝液(例如組胺酸)濃度為蛋白質液體調配物加速/長期儲存期間可影響蛋白質穩定性之重要因素之一。為評定影響，使蛋白質在短期儲存期間暴露於高溫及即時溫度以便很快瞭解在較低溫度(例如2至8°C)下長期儲存之穩定調配物。

評估DVD-Ig蛋白質溶液在40°C及5°C之儲存穩定性。所定義之儲

存期之後，拉伸樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。所評估之組胺酸濃度包括0 mM、5 mM、15 mM、50 mM及200 mM。

將樣品填入無菌小瓶(各約500 μ l)中且在控制條件下儲存(在恆溫室中避光儲存)。7天及21天之後，使用SEC及IEC分析所製備溶液之樣品。

表16：低濃度及高濃度之多種DVD-Ig蛋白質在多種組胺酸濃度下儲存對SEC的影響

T0									
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	1.89	97.21	0.88	N	0組胺酸	2.63	96.39	0.97	N
5 mM組胺酸	0.93	98.19	0.86	N	5 mM組胺酸	0.52	98.27	1.19	N
15 mM組胺酸	1.41	97.64	0.94	N	15 mM組胺酸	1.69	97.38	0.92	N
50 mM組胺酸	1.83	96.84	1.31	N	50 mM組胺酸	2.01	96.86	1.11	N
200 mM組胺酸	2.09	96.96	0.94	N	200 mM組胺酸	2.27	96.78	0.94	N
40C, 7d									
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段		DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	聚集物	單體	片段	
0組胺酸	1.55	96.4	2.03	N	0組胺酸	10.52	87.77	1.7	N
5 mM組胺酸	1.19	97.17	1.62	N	5 mM組胺酸	1.26	95.01	3.71	N
15 mM組胺酸	2.47	95.49	2.03	N	15 mM組胺酸	13.76	83.35	2.88	N
50 mM組胺酸	2.31	95.42	2.25	N	50 mM組胺酸	16.62	80.82	2.54	N
200 mM組胺酸	2.14	95.92	1.92	N	200 mM組胺酸	7.47	89.68	2.83	Y
40C, 21d									
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸					0組胺酸	15.77	82.2	2.02	Y
5 mM組胺酸	2.52	95.3	2.16	N	5 mM組胺酸	14.07	83.8	2.12	N
15 mM組胺酸	3.39	93.85	2.74	N	15 mM組胺酸	18.07	79.49	2.42	N

50 mM組胺酸	2.74	94.4	2.84	N	50 mM組胺酸	13.41	83.71	2.86	Y
200 mM組胺酸	1.9	94.91	3.18	N	200 mM組胺酸	8.35	87.66	3.97	Y
5C, 21d									
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	聚集物	單體	片段	
0組胺酸	1.24	97.62	1.12	N	0組胺酸	1.78	97.16	1.04	N
5 mM組胺酸	1	97.86	1.12	N	5 mM組胺酸	1.74	97.33	0.91	N
15 mM組胺酸	1.08	97.43	1.47	N	15 mM組胺酸	2.01	96.77	1.21	N
50 mM組胺酸	1.25	97.36	1.37	N	50 mM組胺酸	2.31	96.45	1.22	N
200 mM組胺酸	1.61	97.08	1.3	N	200 mM組胺酸				N
T0									
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	2.31	96.35	1.33	N	0組胺酸	3.05	95.18	1.75	N
5 mM組胺酸	1.82	96.64	1.52	N	5 mM組胺酸	2.55	95.84	1.6	N
15 mM組胺酸	1.83	96.53	1.63	N	15 mM組胺酸	2.2	96.1	1.68	N
50 mM組胺酸	1.87	96.67	1.44	N	50 mM組胺酸	1.8	96.54	1.64	N
200 mM組胺酸	2.17	96.14	1.68	N	200 mM組胺酸	1.7	96.49	1.8	N
40C, 7d									
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	2.41	92.11	5.47	N	0組胺酸	3.18	94.49	2.31	N
5 mM組胺酸	1.62	95.93	2.43	N	5 mM組胺酸	2.65	95.2	2.13	N
15 mM組胺酸	1.49	95.9	2.59	N	15 mM組胺酸	2.46	94.96	2.57	N
50 mM組胺酸	1.38	96.16	2.45	N	50 mM組胺酸	2.33	95.16	2.49	N
200 mM組胺酸	1.47	96.12	2.39	N	200 mM組胺酸	1.82	95.19	2.97	N
40C, 21d									
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	1.38	95.5	3.11	N	0組胺酸	3.45	93.64	2.89	N
5 mM組胺酸	1.5	95.39	3.1	N	5 mM組胺酸	2.8	94.27	2.91	N

15 mM組胺酸	1.26	96.01	2.71	N	15 mM組胺酸	2.55	94.56	2.87	N
50mM組胺酸	1.34	95.83	2.82	N	50mM組胺酸	2.26	94.9	2.83	N
200 mM組胺酸	1.38	95.72	2.88	N	200 mM組胺酸	2.84	93.29	3.86	N
5C, 21d									
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	2.08	96.12	1.78	N	0組胺酸	2.77	94.77	2.44	N
5 mM組胺酸	1.56	96.72	1.71	N	5 mM組胺酸	2.35	95.43	2.2	N
15 mM組胺酸	1.27	97.08	1.63	N	15 mM組胺酸	2.18	95.42	2.38	N
50 mM組胺酸	1.4	96.67	1.91	N	50 mM組胺酸	1.95	96.07	1.96	N
200 mM組胺酸	1.59	96.62	1.77	N	200 mM組胺酸	1.95	96.1	1.94	N
T0									
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	2.95	95.23	1.8	N	0組胺酸	3.48	94.22	2.29	N
5 mM組胺酸	1.92	96.28	1.79	N	5 mM組胺酸	4.64	93.26	2.09	N
15 mM組胺酸	2.16	95.71	2.12	N	15 mM組胺酸	4.33	93.53	2.12	N
50 mM組胺酸	2.07	96	1.91	N	50 mM組胺酸	3.93	94.2	1.88	N
200 mM組胺酸	2.46	95.65	1.87	N	200 mM組胺酸	3.55	94.48	1.96	N
40C, 7d									
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *
0組胺酸	2.88	93.82	3.29	N	0組胺酸	4.71	91.46	3.82	N
5 mM組胺酸	1.32	95.82	2.85	N	5 mM組胺酸	5.79	90.44	3.75	N
15 mM組胺酸	1.02	96.12	2.85	N	15 mM組胺酸	4.87	91.81	3.3	N
50 mM組胺酸	1.57	95.23	3.19	N	50 mM組胺酸	8.58	87.7	3.71	N
200 mM組胺酸	1.43	95.56	3	N	200 mM組胺酸	6.78	89.81	3.4	N
40C, 21d									
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *	IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱 *

0組胺酸	1.51	94.69	3.79	N	0組胺酸	5.18	91.21	3.6	N
5 mM組胺酸	1.08	95.87	3.04	N	5 mM組胺酸	6.76	89.67	3.56	N
15 mM組胺酸	1.07	95.85	3.06	N	15 mM組胺酸	5.7	91.19	3.09	N
50 mM組胺酸	1.2	95.56	3.32	N	50 mM組胺酸	12.87	83.35	3.76	N
200 mM組胺酸	1.42	95.42	3.15	N	200 mM組胺酸	7.21	89.88	2.89	N
5C, 21d									
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱*	IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml	聚集物	單體	片段	沈澱*
0組胺酸	1.71	96.03	2.24	N	0組胺酸	5.96	91.35	2.67	N
5 mM組胺酸	1.25	96.44	2.3	N	5 mM組胺酸	6.94	90.97	2.07	N
15 mM組胺酸	1.4	96.13	2.46	N	15 mM組胺酸	5.69	92.19	2.1	N
50 mM組胺酸	1.78	96.03	2.18	N	50 mM組胺酸	10.07	88.13	1.78	N
200 mM組胺酸	2.1	95.7	2.19	N	200 mM組胺酸	1.32	95.56	3.11	N

*沈澱指示是否觀測到不溶性可見聚集物(是或否)

表17：低濃度及高濃度之多種DVD-Ig蛋白質在多種組胺酸濃度下儲存對IEC的影響

T0							
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	酸性物質	主要物質	鹼性物質	DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	酸性物質	主要物質	鹼性物質
0組胺酸	15.66	49.3	35.02	0組胺酸	19.71	50.72	29.55
5 mM組胺酸	13.15	50.9	35.93	5 mM組胺酸	19.11	50.8	30.08
15 mM組胺酸	15.11	46.74	38.13	15 mM組胺酸	18.58	44.52	36.88
50 mM組胺酸	13.27	52.38	34.33	50 mM組胺酸	15.69	52.06	32.24
200 mM組胺酸	14.55	52.01	33.42	200 mM組胺酸	16.79	45.36	37.84
40C, 7d							
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	酸性物質	主要物質	鹼性物質	DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	酸性物質	主要物質	鹼性物質
0組胺酸	24.97	40.98	34.03	0組胺酸	21.7	43.6	34.68
5 mM組胺酸	22.21	44.35	33.43	5 mM組胺酸	28.31	43.99	27.69
15 mM組胺酸	19.79	44.91	35.29	15 mM組胺酸	21.21	41.34	37.44
50 mM組胺酸	18.19	46.11	35.68	50 mM組胺酸	18.42	42.84	38.73
200 mM組胺酸	18.08	48.08	33.83	200 mM組胺酸	16.71	42.09	41.19
5C, 21d							
DVD-A, pH 5.2, 1 mg/ml	酸性物質	主要物質	鹼性物質	DVD-A, pH 5.2, 75 mg/ml	酸性物質	主要物質	鹼性物質

0組胺酸	15.66	46.47	37.86	0組胺酸	16.41	48.16	35.41
5 mM組胺酸	18.76	49.37	31.85	5 mM組胺酸	16.19	49.44	34.36
15 mM組胺酸	14.34	52.8	32.85	15 mM組胺酸	16.91	45.77	37.3
50 mM組胺酸	15.06	50.33	34.59	50 mM組胺酸	17.17	47.45	35.37
200 mM組胺酸	14.49	48.8	36.7	200 mM組胺酸	15.77	46.18	38.03
T0							
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml				DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml			
0組胺酸	26.28	59.4	14.3	0組胺酸	24.53	66.44	9.01
5 mM組胺酸	23.01	69.42	7.56	5 mM組胺酸	24.17	65.96	9.86
15 mM組胺酸	22.05	67.79	10.14	15 mM組胺酸	23.67	67.77	8.55
50 mM組胺酸	21.9	69.09	9	50 mM組胺酸	22.71	67.65	9.63
200 mM組胺酸	20.99	70.74	8.26	200 mM組胺酸			
40C, 7d							
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml				DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml			
0組胺酸	34.05	55.74	10.2	0組胺酸	28.68	61.69	9.61
5 mM組胺酸	31.26	59.07	9.65	5 mM組胺酸	29.05	61.57	9.37
15 mM組胺酸	27.8	61.86	10.33	15 mM組胺酸	29.2	61.25	9.54
50 mM組胺酸	25.97	59.33	14.49	50 mM組胺酸	27.43	61.86	10.69
200 mM組胺酸	26.35	62.28	11.36	200 mM組胺酸	28.04	59.58	12.37
5C, 21d							
DVD-C, pH 5.4, 1 mg/ml				DVD-C, pH 5.4, 100 mg/ml			
0組胺酸	25.05	65.7	9.23	0組胺酸	23.43	66.85	9.71
5 mM組胺酸	23.66	66.17	10.15	5 mM組胺酸	22.3	68.58	9.11
15 mM組胺酸	22.11	69.96	8.91	15 mM組胺酸	23.39	67.31	9.29
50 mM組胺酸	21.79	68.96	9.23	50 mM組胺酸	23.67	67.96	8.35
200 mM組胺酸	21.96	70.23	7.8	200 mM組胺酸	22.6	69.68	7.65
T0							
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml				IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml			
0組胺酸	30.24	51.83	17.92	0組胺酸	31.05	50.74	18.2
5 mM組胺酸	29.11	54.71	16.16	5 mM組胺酸	30.3	53.53	16.16
15 mM組胺酸	28.36	57.23	14.39	15 mM組胺酸	30.02	53.9	16.07
50 mM組胺酸	29.15	53.29	17.55	50 mM組胺酸	28.42	51.31	20.26
200 mM組胺酸	35.59	52.31	12.09	200 mM組胺酸	28.85	55.24	15.9
40C, 7d							
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml				IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml			
0組胺酸	37.24	45.3	17.45	0組胺酸	34.95	44.85	20.19
5 mM組胺酸	36	47.57	16.42	5 mM組胺酸	31.94	45.7	22.34
15 mM組胺酸	36.17	50.01	13.81	15 mM組胺酸	32.39	45.54	22.05
50 mM組胺酸	35.39	49.12	15.47	50 mM組胺酸	37	41.76	21.23
200 mM組胺酸	38.48	45.03	16.47	200 mM組胺酸	30.86	47.34	21.78

5C, 21d							
IL12IL18, pH 5.4, 1 mg/ml				IL12IL18, pH 5.4, 150 mg/ml			
0組胺酸	30.72	51.83	17.44	0組胺酸	30.91	50.49	18.59
5 mM組胺酸	30.25	51	18.74	5 mM組胺酸	29.14	50.47	20.37
15 mM組胺酸	30.07	56.33	13.58	15 mM組胺酸	28.45	50.95	20.58
50 mM組胺酸	30.51	55.5	13.97	50 mM組胺酸	27.91	52.66	19.42
200 mM組胺酸	42.9	49	8.08	200 mM組胺酸	27.96	48.84	22.19

表16及表17顯示，在不同時間點及形成不溶性聚集物時剩餘之單體量指示約5至約50 mM範圍內之組胺酸濃度提供最佳穩定性。約200 mM組胺酸濃度在一些情況下引起不溶性聚集物形成(參見表16及表17中之沈澱指示)。0 mM組胺酸調配物顯示聚集增強，如在一些情況下形成不溶性及可溶性聚集物所指示(在一些情況下，可溶性聚集物在0 mM組胺酸濃度下比在5 mM組胺酸濃度下高)。其次，預期含有組胺酸之調配物可良好維持較長儲存時間。

IEC量測誤差一般高於(2至3%偏差)對相同調配物之SEC量測。因此，考慮此因素，未觀測到調配物中存在顯著差異，如藉由IEC所分析，其指示組胺酸莫耳濃度不影響化學穩定性，因此化學穩定性與緩衝液濃度無關(通常與聚集傾向相反)。

實例8：AS-DVD Ig蛋白質(DVD-C抗IL1 α / β DVD-Ig蛋白質)於溶液中之穩定性之實例

評定抗IL1 α / β DVD-Ig蛋白質(DVD-C)在100 mg/ml及1 mg/ml下於不同pH值之不同緩衝液中且在不同溫度下的隨時間穩定性。針對100 mg/ml DVD-C測試的緩衝液包括15 mM乙酸鹽pH 4；15 mM乙酸鹽pH 5；15 mM組胺酸pH 5.5；15 mM丁二酸鹽pH 5.5；15 mM組胺酸pH 6.0；水(無緩衝液) pH 6.0；15 mM檸檬酸鹽pH 6.0；15 mM組胺酸pH 6.5；及15 mM Tris pH 8.0。針對1 mg/ml DVD-C測試的緩衝液包括10 mM檸檬酸鹽+ 10 mM磷酸鹽緩衝液，pH 3、4、5、6、7或8。

樣品在50°C、40°C、25°C及5°C儲存。在某些時間點，拉伸樣品

且評估穩定性。藉由尺寸排阻層析法(SE-HPLC或SEC)評估物理穩定性且量化聚集物%、單體%、片段%及所回收物質總量。藉由弱陽離子交換層析(IEX-HPLC或IEC)來評估化學穩定性且量化酸性物質%、主要物質%及鹼性物質%。

表18及表19分別描述100 mg/ml及1 mg/ml之DVD-C於多種緩衝液中及pH值下的穩定性。在表17與表18兩者中，顯示尺寸排阻層析法(SEC)資料及離子交換層析(IEC)資料。各表下方給出調配物及縮寫符號。

表18. 100 mg/ml之DVD-C在不同緩衝液中及在不同pH值下、在多個溫度下的穩定性

時間	溫度(°C)	調配物	pH值	SEC資料				IEX資料		
				HMW%	M%	LMW%	AUC	酸性物質%	主要物質%	鹼性物質%
T0	---	ace	4	0.88	98.03	1.09	45941	19.65	71.68	8.67
T0	---	ace	5	0.94	98.19	0.87	45789	19.79	71.60	8.61
T0	---	his	5.5	0.98	98.15	0.86	48085	20.40	71.90	7.70
T0	---	succ	5.5	1.04	97.96	1.00	49317	19.70	71.54	8.76
T0	---	his	6	1.15	97.93	0.92	48468	20.68	70.94	8.38
T0	---	水	6	1.87	97.27	0.86	48356	18.95	72.35	8.70
T0	---	檸檬酸鹽	6	1.38	97.54	1.09	44457	19.35	72.37	8.28
T0	---	his	6.5	1.16	97.93	0.91	47102	21.17	70.45	8.38
T0	---	tris	8	2.40	96.65	0.95	53889	21.71	69.12	9.17
T7d	40	ace	4	0.92	97.03	2.05	49124	19.16	71.61	9.23
T7d	40	ace	5	1.12	97.31	1.57	49077	21.62	71.09	7.29
T7d	40	his	5.5	1.17	97.27	1.56	49662	19.48	73.60	6.92
T7d	40	succ	5.5	1.46	97.06	1.48	48821	23.18	69.51	7.31
T7d	40	his	6	1.72	96.96	1.32	42872	20.99	73.36	5.64
T7d	40	水	6	2.48	96.22	1.30	37817	21.67	72.02	6.31
T7d	40	檸檬酸鹽	6	1.79	96.83	1.37	43022	21.70	71.52	6.78
T7d	40	his	6.5	2.08	96.65	1.27	48176	23.68	70.89	5.43
T7d	40	tris	8	4.58	93.87	1.55	48306	40.86	52.70	6.44
T1mo	40	ace	4	1.32	94.29	4.38	52518	34.78	32.07	33.16
T1mo	40	ace	5	1.64	95.36	3.00	53762	36.48	52.11	11.41
T1mo	40	his	5.5	1.61	95.38	3.01	52489	33.12	55.52	11.36
T1mo	40	succ	5.5	2.25	94.73	3.01	51508	40.94	46.88	12.19
T1mo	40	his	6	2.81	94.53	2.66	52229	34.46	56.00	9.54
T1mo	40	水	6	3.66	93.75	2.58	52285	33.46	56.53	10.01
T1mo	40	檸檬酸鹽	6	2.67	94.91	2.42	51968	36.54	52.80	10.67
T1mo	40	his	6.5	3.61	93.69	2.71	50276	39.06	51.20	9.74
T1mo	40	tris	8	7.49	85.24	7.28	53081	52.90	15.51	31.58

時間	溫度 (°C)	調配物	pH 值	SEC資料				IEX資料		
				HMW%	M%	LMW%	AUC	酸性物 質%	主要 物質%	鹼性物 質%
T1mo	25	ace	4	0.98	97.30	1.72	56026	23.39	59.02	17.59
T1mo	25	ace	5	1.15	97.31	1.54	55264	22.44	69.01	8.55
T1mo	25	his	5.5	1.16	97.41	1.43	54356	22.05	69.43	8.51
T1mo	25	succ	5.5	1.42	97.07	1.51	52417	23.00	67.63	9.37
T1mo	25	his	6	1.75	96.74	1.51	52220	23.80	67.67	8.52
T1mo	25	水	6	2.66	95.94	1.40	51198	23.68	67.35	8.98
T1mo	25	檸檬酸鹽	6	1.91	96.59	1.49	51137	22.41	68.14	9.45
T1mo	25	his	6.5	1.93	96.58	1.49	50594	25.93	65.50	8.56
T1mo	25	tris	8	4.35	93.87	1.78	51644	39.99	50.14	9.87
T3mo	40	ace	4	2.19	85.66	12.15	54546	45.24	29.61	25.15
T3mo	40	ace	5	2.69	89.70	7.61	63493	52.09	31.52	16.39
T3mo	40	his	5.5	2.57	89.79	7.64	64361	48.68	35.18	16.14
T3mo	40	succ	5.5	3.53	88.89	7.58	57855	60.00	24.73	15.28
T3mo	40	his	6	4.08	90.70	5.21	60062	50.85	37.10	12.04
T3mo	40	水	6	4.80	90.50	4.70	58908	47.55	43.39	9.06
T3mo	40	檸檬酸鹽	6	3.87	91.38	4.75	55505	56.39	30.85	12.76
T3mo	40	his	6.5	5.56	89.08	5.37	56243	58.77	32.28	8.95
T3mo	40	tris	8	14.20	75.16	10.64	59362	63.76	22.12	14.12
T3mo	25	ace	4	1.15	96.39	2.46	60821	25.24	61.82	12.94
T3mo	25	ace	5	1.29	96.85	1.86	53513	23.62	66.47	9.91
T3mo	25	his	5.5	1.34	96.84	1.82	56041	23.05	67.70	9.25
T3mo	25	succ	5.5	1.69	96.36	1.95	53657	27.27	61.25	11.48
T3mo	25	his	6	2.04	96.23	1.73	51684	26.17	63.16	10.67
T3mo	25	水	6	2.81	95.49	1.70	52442	25.01	64.07	10.91
T3mo	25	檸檬酸鹽	6	2.08	96.11	1.80	51993	24.48	64.34	11.18
T3mo	25	his	6.5	2.26	96.01	1.72	50988	30.52	59.06	10.42
T3mo	25	tris	8	5.61	91.87	2.51	52070	59.46	31.54	8.99
T3mo	5	ace	4	0.85	98.01	1.14	50571	18.16	71.76	10.09
T3mo	5	ace	5	1.06	97.91	1.04	49173	18.44	71.54	10.02
T3mo	5	his	5.5	1.33	97.65	1.02	51947	19.97	70.28	9.75
T3mo	5	succ	5.5	1.32	97.59	1.09	50358	19.12	70.88	10.00
T3mo	5	his	6	2.18	96.79	1.03	49875	22.34	67.47	10.19
T3mo	5	水	6	8.21	90.70	1.09	48448	18.89	67.56	13.55
T3mo	5	檸檬酸鹽	6	2.20	96.65	1.15	48907	19.08	70.77	10.16
T3mo	5	his	6.5	1.86	97.12	1.02	47895	22.91	67.10	9.99
T3mo	5	tris	8	5.93	93.02	1.05	49015	24.67	63.29	12.04

調配物及縮寫符號：

ace = 15 mM乙酸鹽

his = 15 mM組胺酸

succ = 15 mM丁二酸鹽

水 = 藉由透析在水中調配

檸檬酸鹽 = 15 mM檸檬酸鹽

tris = 15 mM TRIS

HMW% = 藉由SEC量化之高分子量物質之百分比

M% = 藉由SEC量化之單體之百分比

LMW% = 藉由SEC量化之低分子量物質(片段)之百分比

AUC = SEC曲線之總積分面積

酸性物質% = 藉由IEC量化之酸性物質相對於主要物質之百分比

主要物質% = 藉由IEC量化之主要物質之百分比

鹼性物質% = 藉由IEX量化之鹼性物質相對於主要物質之百分比

T0 = 時間零

T7d = 儲存7天

T1mo = 儲存1個月

T3mo = 儲存3個月

**表19. 1.0 mg/ml之DVD-C在10 mM檸檬酸鹽+ 10 mM磷酸鹽緩衝液中
及在不同pH值下、在多種溫度下的穩定性**

時間	溫度(°C)	pH值	SEC資料				IEX資料		
			HMW%	M%	LMW%	AUC	酸性物質%	主要物質%	鹼性物質%
0	---	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	---	4	0.78	97.97	1.25	106805	10.14	73.38	16.48
0	---	5	1.07	97.71	1.21	104165	9.80	73.84	16.35
0	---	6	1.23	97.62	1.15	99838	10.80	73.52	15.69
0	---	7	1.37	97.43	1.21	98566	10.45	73.79	15.76
0	---	8	1.48	97.30	1.22	93914	10.33	74.41	15.26
7d	40	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7d	40	4	0.70	94.51	4.79	99177	38.59	41.06	20.35
7d	40	5	1.09	97.43	1.48	105735	24.92	57.07	18.01
7d	40	6	1.30	97.16	1.54	101459	21.48	62.95	15.57
7d	40	7	1.53	96.38	2.09	94903	16.60	69.48	13.93
7d	40	8	2.00	95.74	2.25	95090	50.88	36.05	13.07
7d	50	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7d	50	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7d	50	5	2.72	93.91	3.37	102195	49.52	32.87	17.61
7d	50	6	2.23	95.55	2.22	99767	37.88	47.12	15.00
7d	50	7	1.67	94.59	3.74	96751	54.67	32.09	13.24
7d	50	8	1.82	94.13	4.05	85005	61.11	13.48	25.41

時間	溫度(℃)	pH值	SEC資料				IEX資料		
			HMW%	M%	LMW%	AUC	酸性物質%	主要物質%	鹼性物質%
21d	5	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21d	5	4	0.01	96.54	3.45	105701	11.64	73.47	14.89
21d	5	5	0.00	96.29	3.71	102947	11.40	73.19	15.41
21d	5	6	0.01	96.33	3.66	98166	11.56	73.70	14.74
21d	5	7	0.01	96.24	3.75	96077	17.02	67.39	15.60
21d	5	8	0.01	95.63	4.36	91507	17.87	68.99	13.15
21d	25	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21d	25	4	0.08	95.89	4.02	107054	32.05	49.45	18.51
21d	25	5	0.07	96.85	3.08	104609	20.27	62.85	16.88
21d	25	6	0.05	96.86	3.09	100308	18.61	66.21	15.18
21d	25	7	0.08	96.40	3.52	97790	18.83	67.03	14.14
21d	25	8	0.07	95.82	4.12	92666	41.03	45.81	13.16
21d	40	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21d	40	4	0.09	88.58	11.33	79690	61.27	18.98	19.74
21d	40	5	0.20	95.13	4.67	105902	46.17	37.31	16.52
21d	40	6	0.23	95.96	3.81	101455	31.13	54.02	14.85
21d	40	7	0.33	94.32	5.35	98972	53.39	34.34	12.27
21d	40	8	0.37	93.05	6.57	91576	59.60	15.00	25.40
21d	50	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21d	50	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21d	50	5	0.20	91.14	8.66	90993	56.65	10.23	33.13
21d	50	6	0.34	93.57	6.09	100229	66.40	21.90	11.70
21d	50	7	0.54	89.92	9.54	91695	50.18	26.86	22.97
21d	50	8	0.47	87.11	12.41	67323	47.09	17.82	35.09
3mo	40	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3mo	40	4	27.59	40.51	31.91	61759	NR	NR	NR
3mo	40	5	5.12	85.68	9.19	119476	NR	NR	NR
3mo	40	6	2.79	91.55	5.67	113431	NR	NR	NR
3mo	40	7	3.40	88.33	8.27	106409	NR	NR	NR
3mo	40	8	5.41	80.86	13.73	98142	NR	NR	NR
3mo	25	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3mo	25	4	1.10	91.64	7.26	109681	53.69	23.99	22.32
3mo	25	5	1.24	96.19	2.57	106230	37.33	41.02	21.65
3mo	25	6	1.56	96.65	1.79	102674	27.46	53.25	19.29
3mo	25	7	1.85	95.59	2.56	100526	17.69	65.85	16.46
3mo	25	8	2.37	94.80	2.83	95500	65.32	20.08	14.59
3mo	5	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3mo	5	4	0.83	97.90	1.28	104383	18.59	60.63	20.78
3mo	5	5	1.14	97.86	1.00	101554	16.91	58.78	24.30
3mo	5	6	1.31	97.75	0.95	97897	17.38	63.16	19.46
3mo	5	7	1.54	97.43	1.03	96067	18.48	63.33	18.19
3mo	5	8	1.67	97.27	1.06	92532	20.44	61.36	18.21
6.5mo	25	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6.5mo	25	4	1.67	85.69	12.64	7753	70.60	10.11	19.28
6.5mo	25	5	1.35	94.61	4.04	7865	50.36	28.97	20.67
6.5mo	25	6	1.69	95.80	2.51	7719	36.64	46.73	16.63
6.5mo	25	7	2.12	94.15	3.74	7523	55.68	28.89	15.44

時間	溫度(°C)	pH值	SEC資料				IEX資料		
			HMW%	M%	LMW%	AUC	酸性物質%	主要物質%	鹼性物質%
6.5mo	25	8	2.71	93.02	4.26	7155	68.76	16.22	15.01
6.5mo	5	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6.5mo	5	4	0.76	97.78	1.46	7508	19.30	59.53	21.17
6.5mo	5	5	1.07	97.92	1.00	7315	17.96	60.34	21.70
6.5mo	5	6	1.38	97.75	0.87	6969	19.99	60.32	19.69
6.5mo	5	7	1.61	97.38	1.02	6859	19.46	62.30	18.24
6.5mo	5	8	1.71	97.17	1.11	6501	21.06	59.64	19.30

縮寫符號：

HMW% = 藉由SEC量化之高分子量物質之百分比

M% = 藉由SEC量化之單體之百分比

LMW% = 藉由SEC量化之低分子量物質(片段)之百分比

AUC = SEC曲線之總積分面積

酸性物質% = 藉由IEX量化之酸性物質相對於主要物質之百分比

主要物質% = 藉由IEX量化之主要物質之百分比

鹼性物質% = 藉由IEX量化之鹼性物質相對於主要物質之百分比

ND = 未偵測到物質

NR = 未進行分析

0 = 時間零

7d = 儲存7天

21d = 儲存1個月

3mo = 儲存3個月

6.5mo = 儲存6.5個月

分子在pH 3透析期間完全降解。在此條件下透析之後，在時間零，藉由SEC或IEC未偵測到物質。此外，在50°C，在pH 4儲存產生相同結果。兩種結果皆由ND表示。

另外，藉由差示掃描熱量測定(DSC)評定DVD-C之熱穩定性。評估1.0 mg/ml分子於10 mM檸檬酸鹽 + 10 mM磷酸鹽緩衝液中之調配

物(pH 4、5、6、7或8)的熱穩定性。起始展開溫度較高或區域展開中點溫度較高意謂熱穩定性較大。在不同pH值下的熱穩定性通常與在彼等pH值下所調配之分子的長期穩定性相關。因此，DSC資料可幫助鑑別使分子最穩定及最不穩定的pH值。

表20. 1.0 mg/ml之DVD-C於10 mM檸檬酸鹽+10 mM磷酸鹽緩衝液中及在不同pH值下的差示掃描熱量測定資料

pH值	起始(°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tm4 (°C)
4	49.2	64.4	67.3	74.2	78.8
5	55.0	68.1	69.9	76.2	82.0
6	54.8	67.5	69.4	75.7	83.1
7	55.0	67.2	69.0	74.4	82.7
8	54.4	67.1	68.8	73.8	82.5

*所編號之Tm值表示展開過渡階段之中點。

如上所述，測試DVD-C於多種不同緩衝液及pH值下，在三種不同溫度(40°C、25°C或5°C)下儲存時的穩定性。DVD-C濃度範圍為1 mg/ml至100 mg/ml。在100 mg/ml，緩衝液包括乙酸鹽、組胺酸、丁二酸鹽、檸檬酸鹽及tris。DVD-C亦於普通水中調配。調配物pH值範圍為4至8。在1 mg/ml，蛋白質於pH值範圍為3至8的檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中調配。一經調配，則DVD-Ig蛋白質樣品在上述溫度下儲存。在特定時間點，獲得等分試樣且藉由SEC評定其物理穩定性且藉由弱陽離子交換(WCX)評定其化學穩定性。

總而言之，資料表示DVD-C穩定，在pH 3及pH 4除外。特定而言，資料表明DVD-C之物理穩定性在靠近5.5之pH值下最大且化學穩定性在靠近6.0之pH值下最高。組胺酸及丁二酸鹽確定為適用於此等pH值的緩衝液。

另外，如表18中所述，藉由差示掃描熱量測定(DSC)評定DVD-C之熱穩定性。評估調配於pH 4至8之檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中之1.0 mg/ml DVD-C的熱穩定性。起始展開溫度(Ton)較高或區域展開中點

溫度(T_m)較高意謂熱穩定性較大。熱穩定性可能與DVD-Ig蛋白質之長期穩定性相關。資料表明5至8之pH值範圍內的熱穩定性類似。

實例9：多元醇對AS-DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

利用動態掃描螢光(DSF)評定蛋白質展開傾向。研究多元醇(例如蔗糖及山梨糖醇)之影響以便評定此等多元醇對蛋白質於溶液中之穩定性的作用。DVD-A、DVD-C及IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質用作例示性AS-DVD-Ig蛋白質。如下表21中所示，一般而言，多種濃度(1、100、150 mg/ml)之AS-DVD-Ig蛋白質在蔗糖(例如40至160 mg/ml)及山梨糖醇(例如20至80 mg/ml)存在下穩定。此外，山梨糖醇及蔗糖濃度增加引起穩定性稍微增加。因此，向含有緩衝液(例如15 mM組胺酸)之蛋白質調配物中添加糖會使AS-DVD-Ig蛋白質穩定性稍微提高。

表21：如藉由動態掃描螢光所評定，多元醇對多種AS-DVD-Ig蛋白質在pH 6之熱力學穩定性的影響

IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質濃度	起始展開溫度(°C)
1 mg/ml，無山梨糖醇	62.8
1 mg/ml，20 mg/ml山梨糖醇	63.2
1 mg/ml，40 mg/ml山梨糖醇	63.1
1 mg/ml，80 mg/ml山梨糖醇	63.5
150 mg/ml，無山梨糖醇	57.5
150 mg/ml，20 mg/ml山梨糖醇	57.6
150 mg/ml，40 mg/ml山梨糖醇	57.6
150 mg/ml，80 mg/ml山梨糖醇	58.5
1 mg/ml，無蔗糖	62.8
1 mg/ml，40 mg/ml蔗糖	63.1
1 mg/ml，80 mg/ml蔗糖	64.1
1 mg/ml，160 mg/ml蔗糖	64.3
150 mg/ml，無蔗糖	57.5
150 mg/ml，40 mg/ml蔗糖	58.2
150 mg/ml，80 mg/ml蔗糖	58.3
150 mg/ml，160 mg/ml蔗糖	58.3
DVD-C	
1 mg/ml，無山梨糖醇	62
1 mg/ml，20 mg/ml山梨糖醇	62.3

1 mg/ml , 40 mg/ml山梨糖醇	62
1 mg/ml , 80 mg/ml山梨糖醇	62.1
100 mg/ml , 無山梨糖醇	47
100 mg/ml , 20 mg/ml山梨糖醇	47.5
100 mg/ml , 40 mg/ml山梨糖醇	47
100 mg/ml , 80 mg/ml山梨糖醇	48.1
1 mg/ml , 無蔗糖	62
1 mg/ml , 40 mg/ml蔗糖	62.1
1 mg/ml , 80 mg/ml蔗糖	62
1 mg/ml , 160 mg/ml蔗糖	62.2
100 mg/ml , 無蔗糖	47
100 mg/ml , 40 mg/ml蔗糖	46.9
100 mg/ml , 80 mg/ml蔗糖	48.1
100 mg/ml , 160 mg/ml蔗糖	48
DVD-A	
1 mg/ml , 無山梨糖醇	55.8
1 mg/ml , 20 mg/ml山梨糖醇	56
1 mg/ml , 40 mg/ml山梨糖醇	56
1 mg/ml , 80 mg/ml山梨糖醇	56.1
75 mg/ml , 無山梨糖醇	49.5
75 mg/ml , 20 mg/ml山梨糖醇	50
75 mg/ml , 40 mg/ml山梨糖醇	50.5
75 mg/ml , 80 mg/ml山梨糖醇	50.2
1 mg/ml , 無蔗糖	55.8
1 mg/ml , 40 mg/ml蔗糖	56
1 mg/ml , 80 mg/ml蔗糖	56.4
1 mg/ml , 160 mg/ml蔗糖	56.1
75 mg/ml , 無蔗糖	49.5
75 mg/ml , 40 mg/ml蔗糖	49.5
75 mg/ml , 80 mg/ml蔗糖	50
75 mg/ml , 160 mg/ml蔗糖	51.1

如依據表21中之上述資料所證明，多元醇(例如山梨糖醇及蔗糖)可在寬範圍(20至160 mg/ml蔗糖及20至80 mg/ml山梨糖醇)內改良AS-DVD-Ig蛋白質於溶液中之穩定性。此外，資料揭露，隨著DVD-Ig蛋白質濃度增加，起始展開溫度降低，因此熱力學穩定性降低。此等資料與所觀測之不穩定性相關，諸如在高濃度液體調配物中所觀測到之聚集。

V. AS-DVD-Ig蛋白質穩定存在於4.5至7.5之pH值範圍之含有緩衝液與多元醇的調配物中

實例10：緩衝液對含有多元醇之調配物中之DVD-A之儲存穩定性的作用

為評定緩衝液對DVD-A於不同緩衝液中之儲存穩定性的作用，評定調配物在儲存之前(T0)或在40°C儲存7天之後(7d)或21天之後(21d) (加速儲存)的穩定性。DVD-A (85 mg/ml) (AS-DVD-Ig蛋白質)在pH 5.2調配於多種緩衝液(15 mM檸檬酸鹽、15 mM組胺酸、15 mM精胺酸、15 mM乙酸鹽或水)中。將樣品填入無菌小瓶(各約500 µl)中且在控制條件下，在恆溫室中避光儲存。使用SEC分析樣品且結果提供於表22及表23中。

表22：如藉由SEC所量測，緩衝液類型對DVD-A之儲存穩定性的影響

調配物	時間點	單體	聚集物	片段
15 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，pH 4.0	T0	95.96	2.75	1.28
	7d, 40C	71.84	24.93	3.21
	21d, 40C	66.62	26.91	6.45
15 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	96.06	2.78	1.14
	7d, 40C	89.19	8.76	2.03
	21d, 40C	90.93	4.41	4.65
15 mM精胺酸，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	95.84	3.07	1.08
	7d, 40C	89.62	8.54	1.82
	21d, 40C	81.03	12.41	6.54
15 mM檸檬酸鹽，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	95.72	3.19	1.08
	7d, 40C	90.54	6.96	2.48
	21d, 40C	87.39	7.74	4.86
15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	96	2.9	1.09
	7d, 40C	91.04	6.91	2.03
	21d, 40C	87.58	8.63	3.78
水，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	94.89	4.04	1.05
	7d, 40C	88.4	9.76	1.82
	21d, 40C	81.41	14.39	4.18

表23：如藉由IEC所量測，緩衝液類型對DVD-A之儲存穩定性的作用

調配物	時間點	主要物質	酸性物質	鹼性物質
15 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，pH 4.0	T0	56.88	9.43	33.68
	7d, 40C	46.91	18.74	34.33
	21d, 40C	34.62	24.82	40.54
15 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	57.2	9.45	33.34
	7d, 40C	47.61	18.74	33.64
	21d, 40C	35.29	33.35	31.35
15 mM精胺酸，80 mg/ml蔗糖	T0	63.44	9.93	26.62

糖，pH 5.2	7d，40C	49.22	19.57	31.2
	21d，40C	37.87	25.3	36.81
15 mM檸檬酸鹽，80 mg/ml 蔗糖，pH 5.2	T0	59.59	7.88	35.51
	7d，40C	45.92	20.82	33.24
	21d，40C	31.97	31.81	36.21
15 mM組胺酸，80 mg/ml 糖，pH 5.2	T0	58.29	8.18	33.52
	7d，40C	44.97	16.84	38.17
	21d，40C	36.33	24.88	38.77
水，80 mg/ml蔗糖，pH 5.2	T0	57.05	9.53	33.41
	7d，40C	48.23	19.96	37.15
	21d，40C	37.69	25.15	37.15

表22中所提供之SEC結果顯示，與pH 4組胺酸調配物相比，pH 5.2組胺酸調配物具有最低聚集度，但檸檬酸鹽及乙酸鹽緩衝液亦顯示較低聚集度。雖然如藉由SEC所量測，檸檬酸鹽及乙酸鹽顯示較少可溶性聚集物，但溶液呈可見混濁，表明形成不溶性聚集物。然而，由於SEC量測，可見混濁度並不顯著。總體而言，檸檬酸鹽及乙酸鹽調配物的穩定性僅稍微小於組胺酸調配物。若IEC量測之雜訊/誤差一般較高，則表23中所呈現之調配物內觀測到的化學穩定性無顯著差異。僅多元醇之調配物的穩定性亦稍微低於組胺酸調配物。若蛋白質之總體穩定性特徵經鑑別為AS-DVD-Ig蛋白質，則表22及表23之SEC及IEC分析中所觀測到之微小差異顯示各測試緩衝液在pH 5.2為穩定的。因此，在pH 5.2測試緩衝液之間觀測到的差異表明，每一者可用於提供AS-DVD-Ig蛋白質(包括高濃度者)之穩定調配物。

VI. AS-DVD-Ig蛋白質穩定存在於含有緩衝液、多元醇及界面活性劑之4.5至7.5 pH值範圍的調配物中。

實例11：AS-DVD-Ig蛋白質穩定存在於一系列含有界面活性劑及糖的組胺酸調配物中

以下實例描述在加速/即時穩定性測試期間pH值、緩衝液及賦形劑(包括界面活性劑及多元醇)對低濃度及高濃度調配物中之DVD-Ig蛋白質之物理化學穩定性的影響。為了表明DVD-Ig蛋白質與單株抗體

相比具有截然不同的蛋白質特性，對廣泛已知且用於維持單株抗體穩定性的五種不同調配物條件進行測試。

使用尺寸排阻層析法(SEC)及離子交換層析(IEC)，利用以下三種儲存條件評估低濃度(1 mg/ml)及較高濃度(100 mg/ml) AS-DVD-Ig蛋白質調配物之儲存穩定性：未儲存(T0)、在5°C之控制溫度下儲存1個月(1m, 5C)，及在40°C之控制溫度下儲存1個月(1m, 40C)。根據以下條件測試具有不同pH值(選擇5.25至7.2之範圍)、緩衝液及賦形劑之調配物：

- 1) pH 5.25及pH 6, 15 mM組胺酸, 80 mg/ml蔗糖, 0.01%Tween 80;
- 2) pH 6, 15 mM組胺酸, 40 mg/ml山梨糖醇, 0.01%Tween 80;
- 3) PBS (10 mM磷酸鹽, 125 mM NaCl), pH 6及7.2;
- 4) 20 mM甘氨酸, 26 mg/ml甘油pH 6; 及
- 5)水, 0.01%Tween 80 pH 5及6。

結果呈現於下表24至表27中。資料顯示並非所有DVD-Ig蛋白質在所有pH值及調配物測試條件下均穩定。DVD-B在所測試之所有溶液條件下均形成大量聚集物且歸類為非AS-DVD-Ig蛋白質(根據實例4中所呈現之分析)。所有其他DVD-Ig蛋白質(預選擇為AS-DVD-Ig蛋白質)表現良好且穩定。

蔗糖、山梨糖醇、甘油及甘氨酸用於評估此等賦形劑之作用。亦利用Tween 80 (聚山梨醇酯80) (一種針對搖振應力提供穩定化作用的界面活性劑)評估其對高濃度溶液穩定性的影響。使用氯化鈉，藉由改變離子強度來評估鹽濃度之影響。

一般而言，組胺酸緩衝液中之pH 6或pH 5.2調配物對於所有AS-DVD-Ig蛋白質均有效。山梨糖醇與蔗糖各改良穩定性。蔗糖使得在所定義之時間點之後形成稍少之單體。鹽之存在使得不穩定性提高

(定義為剩餘單體減少)，特別是表24之IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質在100 mg/ml的情況下及在1 mg/ml程度降低之情況下，如表27中所示。甘油及甘胺酸之存在使得在穩定儲存之後的剩餘單體少於其他調配物。舉例而言，根據表24，IL12IL18 DVD-Ig蛋白質在pH 6，在蔗糖存在下的穩定性稍微大於在山梨糖醇存在下的穩定性。資料亦表明，不具有或幾乎不具有離子強度之調配物隨時間顯示之穩定性相當。

SEC資料顯示DVD-Ig蛋白質之物理穩定性，其中評估聚集物及/或片段之形成速率(參見表24及表26)。如表26中所示，所有分子在低濃度下未顯示顯著聚集傾向。IEC資料為DVD-Ig蛋白質之化學穩定性之指標。舉例而言，脫醯胺作用引起酸性物質之形成(主要物質轉化為酸性物質)。帶正電變異體之產生會使得鹼性物質增加。兩種酸性或鹼性物質中之任一者之形成均表明不穩定性，因為此兩種物質之形成使得主要物質百分比發生總體降低(參見表25及表27)。

表24至表27中之結果表明，AS-DVD-Ig蛋白質穩定存在於包含單獨界面活性劑(例如0.01%Tween 80)的pH 5至6調配物中。

表24：所儲存多種調配物之100 mg/ml SEC資料

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	單體	聚集物	片段
IL12IL18	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	96.53	1.1	2.36
		1m，5C	95.97	1.75	2.26
		1m，40C	92.58	2.86	4.55
IL12IL18	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	96.31	1.15	2.52
		1m，5C	96	1.71	2.27
		1m，40C	92.11	3.5	4.38
IL12IL18	15 mM組胺酸，40 mg/ml山梨糖醇，0.01%Tween，pH 6	T0	96.61	1.25	2.13
		1m，5C	95.71	1.78	2.5
		1m，40C	91.62	4.04	4.33
6	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	89.61	10.38	0
		1m，5C	89.48	10.51	0
		1m，40C	85.85	9.96	4.18
6	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	88.58	11.41	0
		1m，5C	86.8	13.19	0
		1m，40C	83.09	12.68	4.21
65	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗	T0	93.08	0.93	5.98
		1m，5C	92.59	1.67	5.72

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	單體	聚集物	片段
	糖，0.01%Tween，pH 5.25	1m，40C	85.25	11.47	3.27
65	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	93.34	0.85	5.79
		1m，5C	92.45	1.71	5.82
		1m，40C	86.15	10.69	3.14
66	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	97.57	0.62	1.8
		1m，5C	97.6	0.92	1.47
		1m，40C	91.65	5	3.34
66	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	97.41	0.71	1.87
		1m，5C	97.69	1.07	1.22
		1m，40C	92.68	4.3	3.01
66	15 mM組胺酸，40 mg/ml山梨糖醇，0.01%Tween，pH 6	T0	97.65	0.61	1.73
		1m，5C	97.52	1.04	1.42
		1m，40C	91.53	3.98	4.47
IL12IL18	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	96.13	1.57	2.28
		1m，5C	94.2	3.34	2.44
		1m，40C	88.48	7.3	4.2
IL12IL18	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	96.07	1.66	2.26
		1m，5C	94.64	2.91	2.43
		1m，40C	87.71	8.03	4.25
DVD-B	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	96.24	2.11	1.64
		1m，5C	94.66	3.85	1.48
		1m，40C	41.53	53.68	4.77
DVD-B	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	95.75	2.45	1.79
		1m，5C	95.11	3.62	1.26
		1m，40C	33.96	60.56	5.46
IL12IL18	20 mM甘胺酸，26 mg/ml甘油，pH 6.0	T0	96.48	1.27	2.24
		1m，5C	95.06	2.07	2.86
		1m，40C	90.33	4.7	4.95
DVD-B	20 mM甘胺酸，26 mg/ml甘油，pH 6.0	T0	96.29	1.88	1.81
		1m，5C	95.93	2.62	1.43
		1m，40C	23.32	73.53	3.14
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，pH 5.0	T0	95.06	2.55	2.37
		1m，5C	94.12	2.97	2.89
		1m，40C	90.99	4.93	4.07
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，pH 6.0	T0	94.59	2.88	2.52
		1m，5C	94.22	3.28	2.48
		1m，40C	90.9	4.82	4.26
5	水，0.01%Tween 80，pH 5.0	T0	65.33	31.34	3.31
		1m，5C	17.02	79.12	3.84
		1m，40C	82.54	13.41	4.03
5	水，0.01%Tween 80，pH 6.0	T0	43.43	53.33	3.23
		1m，5C	17.53	79.15	3.3
		1m，40C	74.6	21.38	4.03

表25：所儲存多種調配物之100 mg/ml IEC資料

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	主要物質	酸性物質	鹼性物質
IL12IL18	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 5.25	T0	58.32	27.98	13.68
		1m，5C	57.54	26.72	15.73
		1m，40C	44.91	37.65	17.43
IL12IL18	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 6	T0	58.63	27.84	13.51
		1m，5C	56.89	29.15	13.94
		1m，40C	41.47	44.38	14.14
IL12IL18	15 mM組胺酸，40 mg/ml 山梨糖醇， 0.01%Tween，pH 6	T0	58.1	28.09	13.79
		1m，5C	60.53	27.48	11.98
		1m，40C	41.02	44.69	14.29
6	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 5.25	T0	42.99	11.66	45.34
		1m，5C	42.53	10.26	47.19
		1m，40C	34.99	25.55	39.45
6	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 6	T0	41.03	11.84	47.12
		1m，5C	41.73	10.91	47.34
		1m，40C	36.18	25.94	37.86
65	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 5.25	T0	49.64	39.02	11.33
		1m，5C	45.48	38.77	15.73
		1m，40C	51.17	30.64	18.18
65	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 6	T0	50	39.1	10.88
		1m，5C	49.31	38.95	11.72
		1m，40C	29.83	52.65	17.5
66	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 5.25	T0	63.78	24.78	11.43
		1m，5C	60.03	25.27	14.69
		1m，40C	42.13	41.93	15.93
66	15 mM組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween， pH 6	T0	61.5	26.21	12.27
		1m，5C	59.06	25.85	15.07
		1m，40C	42.31	43.47	41.2
66	15 mM組胺酸，40 mg/ml 山梨糖醇， 0.01%Tween，pH 6	T0	57.18	24.54	18.26
		1m，5C	61.9	26.5	11.59
		1m，40C	41.24	45.29	13.46
IL12IL18	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	58.2	28.1	13.69
		1m，5C	57.43	27.35	15.21
		1m，40C	40.68	42.04	17.27
IL12IL18	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	54.51	27.99	17.48
		1m，5C	53.79	28.08	18.11
		1m，40C	27.08	58.25	14.65
DVD-B	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	52.94	27.32	19.72
		1m，5C	54.38	27.19	18.42
		1m，40C	29.14	38.63	32.21
DVD-B	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	27.93	52.59	19.46
		1m，5C	54.07	26.57	19.35
		1m，40C	19.79	48.61	31.59
IL12IL18	20 mM甘胺酸，26 mg/ml	T0	57.95	28.99	13.05
		1m，5C	57.85	29.95	12.18

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	主要物質	酸性物質	鹼性物質
	甘油，pH 6.0	1m，40C	37.55	47.49	14.94
DVD-B	20 mM甘胺酸，26 mg/ml 甘油，pH 6.0	T0	30.77	51	18.22
		1m，5C	50	33.32	16.67
		1m，40C	27.41	58.52	14.05
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，pH 5.0	T0	56.03	27.31	16.64
		1m，5C	57.67	28.06	14.26
		1m，40C	44.97	41.34	13.68
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，pH 6.0	T0	58.4	28.57	13.02
		1m，5C	58.93	26.36	14.7
		1m，40C	45.37	39.4	15.21
5	水，0.01%Tween 80，pH 5.0	T0	46.39	19.48	34.12
		1m，5C	16.75	8.54	74.69
		1m，40C	44.57	36.64	18.78
5	水，0.01%Tween 80，pH 6.0	T0	32.31	14.89	52.78
		1m，5C	16.32	8.27	75.4
		1m，40C	39.7	35.23	25.06

表26：所儲存多種調配物之1 mg/ml SEC資料

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	單體	聚集物	片段
IL12IL18	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	97.87	0.73	1.39
		1m，5C	97.83	0.57	1.59
		1m，40C	95.55	0.74	3.7
IL12IL18	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	98.04	0.32	1.62
		1m，5C	97.95	0.24	1.79
		1m，40C	95.83	0.58	3.58
IL12IL18	15 mM組胺酸，40 mg/ml山梨糖醇，0.01%Tween，pH 6	T0	96.2	0.56	3.22
		1m，5C	96.41	0.47	3.1
		1m，40C	94.21	0.66	5.12
6	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	92.05	7.94	0
		1m，5C	99.23	0.76	0
		1m，40C	95.52	0.53	3.94
6	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	93.59	6.4	0
		1m，5C	99.33	0.66	0
		1m，40C	95.3	0.59	4.1
65	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	94.74	0.51	4.73
		1m，5C	94.34	0.49	5.15
		1m，40C	93.06	0.91	6.02
65	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	94.33	0.37	5.29
		1m，5C	93.98	0.36	5.65
		1m，40C	92.71	0.87	6.41
66	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	98.76	0.51	0.72
		1m，5C	98.59	0.51	0.89
		1m，40C	96.37	1.02	2.59
66	15 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖	T0	98.82	0.2	0.96
		1m，5C	98.9	0.16	0.92

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	單體	聚集物	片段
	糖，0.01%Tween，pH 6	1m，40C	96.82	0.66	2.51
66	15 mM組胺酸，40 mg/ml山梨糖醇，0.01%Tween，pH 6	T0	97.87	0.29	1.83
		1m，5C	97.3	0.23	2.45
		1m，40C	95.5	1.02	3.48
IL12IL18	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	95.38	1.54	3.07
		1m，5C	95.29	1.54	3.15
		1m，40C	91.87	1.95	6.17
IL12IL18	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	94.36	2.73	2.89
		1m，5C	93.78	2.99	3.22
		1m，40C	86.45	3.64	9.9
DVD-B	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	95.82	1.66	2.5
		1m，5C	95.54	1.53	2.91
		1m，40C	91.39	2.31	6.29
DVD-B	10 mM磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	94.87	2.43	2.68
		1m，5C	95.01	2.3	2.68
		1m，40C	88.42	3.24	8.32
IL12IL18	20 mM甘胺酸，26 mg/ml甘油，pH 6.0	T0	96.48	0.36	3.14
		1m，5C	96.51	0.29	3.18
		1m，40C	93.82	0.4	5.77
DVD-B	20 mM甘胺酸，26 mg/ml甘油，pH 6.0	T0	96.05	1.33	2.6
		1m，5C	95.47	1.15	3.37
		1m，40C	94.14	1.22	4.63
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，pH 5.0	T0	89.16	2.42	8.41
		1m，5C	95.1	1.86	3.02
		1m，40C	89.69	4.11	6.18
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，pH 6.0	T0	94.24	2.88	2.86
		1m，5C	94.89	2.6	2.49
		1m，40C	90.66	3.38	5.94
5	水，pH 5.0	T0	69.49	26.36	4.13
		1m，5C	68.87	24.88	6.23
		1m，40C	91.35	3.6	5.08
5	水，pH 6.0	T0	49.15	46.65	4.19
		1m，5C	51.96	43.27	4.76
		1m，40C	92.56	2.45	4.97

表27：所儲存多種調配物之1 mg/ml IEC資料

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	主要物質	酸性物質	鹼性物質
IL12IL18	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween，pH 5.25	T0	61.83	24	14.14
		1m，5C	61.76	26.77	11.46
		1m，40C	41.58	39.69	18.72
IL12IL18	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖，0.01%Tween，pH 6	T0	61.31	26.12	12.55
		1m，5C	59.67	25.3	15.02
		1m，40C	42.98	45.85	11.15
IL12IL18	15 mM 組胺酸，40	T0	60.81	25.86	13.31
		1m，5C	59.07	27.12	13.8

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	主要物質	酸性物質	鹼性物質
	mg/ml 山梨糖醇， 0.01%Tween，pH 6	1m，40C	38.22	47.55	14.21
6	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖， 0.01%Tween，pH 5.25	T0	41.13	10.3	48.56
		1m，5C	46.96	10.38	42.64
		1m，40C	36	24.57	39.42
6	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖， 0.01%Tween，pH 6	T0	44.43	9.92	45.63
		1m，5C	46.33	11.55	42.11
		1m，40C	37.38	26.09	36.52
65	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖， 0.01%Tween，pH 5.25	T0	50.6	39.58	9.81
		1m，5C	49.57	37.75	11.66
		1m，40C	33.38	50.27	16.33
65	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖， 0.01%Tween，pH 6	T0	51.74	38.73	9.52
		1m，5C	53.21	36.58	10.2
		1m，40C	35.11	49.96	14.92
66	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖， 0.01%Tween，pH 5.25	T0	59.89	25.96	14.14
		1m，5C	58.1	25.05	16.84
		1m，40C	45.43	37.21	17.34
66	15 mM 組胺酸，80 mg/ml 蔗糖， 0.01%Tween，pH 6	T0	58.18	24.86	16.94
		1m，5C	61.69	24.94	13.36
		1m，40C	44.83	41.39	13.77
66	15 mM 組胺酸，40 mg/ml 山梨糖醇， 0.01%Tween，pH 6	T0	61.49	24.96	13.53
		1m，5C	60.34	24.96	16.69
		1m，40C	38.32	50.92	10.75
IL12IL18	10 mM 磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	58.52	26.18	15.29
		1m，5C	58.98	27.17	13.84
		1m，40C	37.54	47.49	14.96
IL12IL18	10 mM 磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	63.15	23.13	13.71
		1m，5C	58.58	26.07	15.33
		1m，40C	16.92	73.33	9.74
DVD-B	10 mM 磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 6	T0	54.38	27.35	18.25
		1m，5C	56.48	27.42	16.09
		1m，40C	30.99	50.68	18.32
DVD-B	10 mM 磷酸鹽，125 mM NaCl，pH 7.2	T0	54.86	30	15.12
		1m，5C	52.66	31.63	15.69
		1m，40C	8.64	60.51	30.84
IL12IL18	20 mM 甘胺酸，26 mg/ml甘油，pH 6.0	T0	57.58	27.8	14.6
		1m，5C	58.02	29.5	12.46
		1m，40C	28.8	60.9	10.29
TNFPGE2	20 mM 甘胺酸，26 mg/ml甘油，pH 6.0	T0	53.05	30.46	16.48
		1m，5C	44.21	33.97	21.8
		1m，40C	5.52	81.17	13.3
IL12IL18	水，0.01%Tween 80， pH 5.0	T0	57.76	26.51	15.71
		1m，5C	58.44	26.13	15.41
		1m，40C	36.16	44.81	19.02
IL12IL18	水，0.01%Tween 80，	T0	59.24	26.09	14.66

DVD-Ig	調配物	時間點，溫度	主要物質	酸性物質	鹼性物質
	pH 6.0	1m，5C	58.66	26.96	14.36
		1m，40C	35.97	44.16	19.85
5	水，0.01%Tween 80，pH 5.0	T0	51.73	19.4	28.85
		1m，5C	48.63	20.14	31.21
		1m，40C	44.52	41.73	13.73
5	水，0.01%Tween 80，pH 6.0	T0	34.34	14	51.62
		1m，5C	32.27	15.38	47.33
		1m，40C	42.03	44.28	13.67

實例12. 儲存對多種調配物中之AS-DVD-Ig蛋白質(DVD-C)之穩定性的影響

蛋白質調配物之pH值及儲存溫度為加速/長期儲存期間影響蛋白質穩定性的兩個重要因素。為評定此等因素之影響，使DVD-Ig蛋白質在短期儲存期間暴露於高溫及即時溫度，以便瞭解調配物在較低溫度(例如2至8℃)下長期儲存之可行性。

評估DVD-C溶液(100 mg/ml)於調配物中在40℃之儲存穩定性。所定義之儲存期之後，拉伸樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。將樣品填入無菌小瓶(各約500 μl)中且在控制條件下，在恆溫室中避光儲存。在預定時間點，將所製備溶液之樣品拉伸以便根據樣品拉伸方案分析。所得資料提供於表28及表29中。

表28：如藉由SEC所量測，100 mg/ml濃度之DVD-C在多種條件下儲存的影響

調配物	時間點	單體	聚集物	片段
15 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗糖、0.02 %Tween 80 pH 5	T0	97.66	1.09	1.20
	7d，40℃	96.32	1.70	1.98
	1m，40℃	94.18	2.43	3.39
15 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02%Tween 80 pH 6	T0	97.66	1.091	1.20
	7d，40℃	95.92	2.09	1.99
	1m，40℃	93.64	2.72	3.64

表29：如藉由IEC所量測，100 mg/ml濃度之DVD-C在多種條件下儲存的影響

調配物	時間點	主要物質	酸性物質	鹼性物質
15 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗	T0	73.84	9.80	16.35

糖、0.02%Tween 80 pH 5	T2m，5℃	69.18	10.88	19.95
15 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02%Tween 80 pH 6	T0	73.84	9.80	16.35
	T2m，5℃	67.99	10.59	21.42

表28及表29中所提供之資料顯示，DVD-C其穩定(與一些不穩定的DVD-Ig蛋白質相比，例如實例5)，在測試儲存條件期間，單體含量僅發生極小的損失且因此歸類為AS-DVD-Ig蛋白質。

實例13：界面活性劑對含有緩衝液及多元醇之調配物中之AS-DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

將調配物pH值設定為超過蛋白質等電點(pI) 1個單位通常有益。一般而言，調配物pH值越接近pI，則蛋白質之整個表面越被認為是不帶電的，因此有助於非極性基團之蛋白質-蛋白質吸引力，且因此增加非共價聚集及不穩定性。搖振及攪拌促進物理不穩定性，產生疏水性空氣/水界面，導致蛋白質分子在此等界面對準，且最終引起聚集。若空氣疏水性大於水，則空氣與液體之間的界面被認為是變性表面，在該表面可發生聚集，尤其是(部分)展開蛋白質之聚集。可藉由搖振或攪拌增加有效空氣-水界面。

在以下實例中，評估多種濃度之界面活性劑(例如Tween 80)對例示性DVD-Ig蛋白質之不穩定性的作用。在無或有多元醇蔗糖存在下進行研究。表30及表31中所呈現之資料是對具有及不具有蔗糖(80 mg/ml)之pH 5.2或5.4組胺酸緩衝液中之多種界面活性劑濃度(0至2 mg/ml)進行比較。混濁度量測結果顯示，0.05 mg/ml至2 mg/ml濃度範圍內之界面活性劑(Tween 80)通常為AS-DVD-Ig蛋白質提供針對剪應力/變性應力的穩定性。界面活性劑濃度降低至0.01 mg/ml時，混濁度增大。在蔗糖存在下，AS-DVD-Ig蛋白質存在類似觀測結果。所有研究均在15 mM組胺酸存在下，在1 mg/ml之DVD-Ig蛋白質濃度下進行。相應SEC分析顯示，含有0.05至0.1 mg/mL Tween 80之樣品存在顯著的相對單體百分比損失，表明產生最穩定調配物之Tween 80之量

是在0.5 mg/ml與2 mg/ml之間。使用UV在500 nm進行之混濁度量測結果列於表30中且樣品之SEC分析列於表31中。亦測試下述調配物之pH值範圍。

表30：如藉由空氣/液體界面變性研究/搖振研究*，藉由使用UV，在500 nm進行量測所評定，Tween對多種DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

DVD形式：	DVD-A，15 mM組胺酸，pH 5.2，80 mg/ml蔗糖			DVD-C，15 mM組胺酸，pH 5.4，80 mg/ml蔗糖			IL12IL18，15 mM組胺酸，pH 5.4，80 mg/ml蔗糖		
Tween 80	T0	T24h	T96h	T0	T24h	T96h	T0	T24h	T96h
0	0.11	0.07	0.55	0.085	0.08	0.107	0.051	0.051	0.051
2 mg/ml	0.069	0.018	0.004	0.085	0.038	0.003	0.069	0.072	0.017
0.5 mg/ml	0.014	0.014	0.002	0.025	0.036	0.004	0.09	0.006	0.008
0.1 mg/ml	0.061	0.02	0.001	0.043	0.007	0.002	0.055	0.011	0.0109
0.05 mg/ml	0.018	0.006	0.001	0.019	0.008	0.002	0.022	0.008	0.0208
0.01 mg/ml	0.007	0.007	1.03	0.03	0.033	0.22	0.057	0.081	0.082
	DVD-A，15 mM組胺酸，pH 5.2			DVD-C，15 mM組胺酸，pH 5.4			IL12IL18，15 mM組胺酸，pH 5.4		
Tween 80	T0	T24h	T96h	T0	T24h	T96h	T0	T24h	T96h
0	0.045	0.038	0.29	0.015	0.045	0.038	0.046	0.046	0.038
2 mg/ml	0.049	0.024	0.004	0.015	0.02	0.003	0.097	0.03	0.018
0.5 mg/ml	0.016	0.058	0.004	0.03	0.019	0.003	0.049	0.031	0.013
0.1 mg/ml	0.005	0.005	0.002	0.004	0.005	0.002	0.012	0.021	0.017
0.05 mg/ml	0.004	0.011	0.002	0.005	0.001	0.009	0.005	0.015	0.017
0.01 mg/ml	0.005	0.03	0.66	0.01	0.015	0.022	0.05	0.022	0.041

*使用UV量測OD 500

表31：如藉由空氣/液體界面變性研究/搖振研究*所評定，Tween對多種DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

DVD形式：DVD-A，15 mM組胺酸，pH 5.2，80 mg/ml蔗糖									
Tween 80 mg/ml	T0					T96h			
	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物
0	1.7	97.25	1.03	73550	1.35	97.55	1.08	39881	1.96
2	1.67	97.58	0.74	759057	2.33	96.67	0.99	74778	2.16
0.5	1.76	97.43	0.8	75635	2.35	96.42	1.21	74782	2
0.1	1.65	97.66	0.68	73158	3.85	95.06	1.07	72816	2.09
0.05	1.66	97.61	0.71	77474	18.86	80.36	0.76	76431	2.01
0.01	1.68	97.5	0.81	77410	9.32	83.25	7.41	11267	2.11

DVD形式：DVD-C，15 mM組胺酸，pH 5.4，80 mg/ml蔗糖									
Tween 80 mg/ml	T0					T96h			
	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物
0	7.15	91.18	1.66	76420	6.11	92.04	1.83	72538	1.59
2	7.29	90.64	2.05	77867	6.09	91.94	1.96	76447	1.55
0.5	7.04	91.4	1.54	77164	6.14	91.98	1.87	75844	1.65
0.1	7.08	91.23	1.68	72875	6.4	90.9	2.68	71645	1.69
0.05	7.03	91.3	1.65	69962	8.8	86.44	4.75	72941	1.72
0.01	6.81	91.57	1.61	77682	12.77	85.19	2.03	70341	1.63

DVD形式：DVD-A，15 mM組胺酸，pH 5.2									
Tween 80 mg/ml	T0					T96h			
	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物
0	7.15	91.18	1.66	76420	6.11	92.04	1.83	72538	1.59
2	7.29	90.64	2.05	77867	6.09	91.94	1.96	76447	1.55
0.5	7.04	91.4	1.54	77164	6.14	91.98	1.87	75844	1.65
0.1	7.08	91.23	1.68	72875	6.4	90.9	2.68	71645	1.69
0.05	7.03	91.3	1.65	69962	8.8	86.44	4.75	72941	1.72
0.01	6.81	91.57	1.61	77682	12.77	85.19	2.03	70341	1.63

DVD形式：DVD-C，15 mM組胺酸，pH 5.4									
Tween 80 mg/ml	T0					T96h			
	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物	單體	片段	AUC	聚集物
0	2.05	96.56	1.37	71752	1.71	97.3	0.98	67869	6.9
2	2.08	96.63	1.28	75988	2.03	96.58	1.37	75354	6.77
0.5	2.1	96.44	1.45	77324	2	96.49	1.5	76488	6.88
0.1	2.11	96.33	1.55	77859	1.86	96.59	1.54	76809	7.02
0.05	2.21	96.28	1.5	79134	2.38	96.09	1.52	77153	7.04
0.01	2.08	96.44	1.47	76726	2.95	95.52	1.51	74056	6.66

*SEC資料對應於表30中之0小時及96小時搖振樣品。

實例14：如搖振研究中所量測，界面活性劑濃度對IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

如利用光學密度在350 nm及500 nm之兩種不同波長下所量測，以下實例描述聚山梨醇酯80及泊洛沙姆之不同濃度(一系列濃度)對濃度為1 mg/mL之pH 6 (15 mM組胺酸+80 mg/mL蔗糖) IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之搖振穩定性的作用。0、24、48、120及240小時之後，獲取樣品。

表32：界面活性劑對具有緩衝液及多元醇之調配物的作用

		IL12IL18 1 mg/ml；15 mM組胺酸 + 80 mg/mL蔗糖pH 6									
界面活性劑		OD500 nm					OD350 nm				
	搖振時間 (H)	0	24	48	120	240	0	24	48	120	240
Tween 80 (mg/ml)	0	0.003	0.06	0.085	0.137	0.387	0.01	0.097	0.135	0.22	0.574
	0.01	0.0036	0.029	0.011	0.065	0.108	0.01	0.01	0.03	0.167	0.227
	0.05	0.0056	0.003	0.01	0.087	0.113	0.013	0.01	0.027	0.17	0.22
	0.1	0.0036	0.002	0.0022	0.067	0.004	0.01	0.01	0.009	0.135	0.011
	0.5	0.003	0.002	0.002	0.04	0.001	0.01	0.009	0.009	0.086	0.009
	2	0.035	0.002	0.0025	0.0025	0.002	0.062	0.012	0.013	0.014	0.013
		IL12IL18 1 mg/ml；15 mM組胺酸 + 80 mg/mL蔗糖pH 6									
		500 nM					350 nM				
	搖振時間 (H)	0	24	48	120	240	0	24	48	120	240
泊洛沙姆 (% w/v)	0	0.003	0.035	0.044	0.236	0.226	0.01	0.06	0.08	0.4	0.374
	0.01	0.004	0.004	0.007	0.013	0.0126	0.01	0.012	0.019	0.031	0.034
	0.05	0.003	0.014	0.002	0.027	0.002	0.01	0.02	0.011	0.009	0.011
	0.1	0.003	0.035	0.0037	0.0038	0.003	0.01	0.01	0.012	0.012	0.012
	0.5	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.01	0.01	0.011	0.011	0.013
	2	0.0036	0.003	0.003	0.005	0.004	0.011	0.01	0.01	0.013	0.013

如表32中所述，添加界面活性劑使IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質之搖振穩定性提高。0.05至2 mg/mL範圍內之聚山梨醇酯濃度經測定對於IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質之穩定性最有效，且泊洛沙姆經測定在0.1至

2% w/v範圍內最有效。亦測試DVD-B，且在此特定搖振分析中測試時顯示類似穩定性。

實例15：多元醇(蔗糖及山梨糖醇)濃度對IL12IL18及DVD-B DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

以下實例顯示如方法章節中所述，如使用Avacta之自動化高通量儀器Optim-1000 (York, UK)，藉由固有螢光所量測，多元醇蔗糖及山梨糖醇在聚山梨醇酯80存在下對IL12IL18 DVD-Ig蛋白質(3 mg/ml，pH 6)之穩定性的作用。研究使用9 μ l MCA。使用1°C/分鐘之掃描速率獲得熱掃描且自25°C掃描至75°C。所有樣品均由蔗糖及山梨糖醇賦形劑之儲備溶液新鮮製備。

表33：多元醇對具有15 mM His緩衝液(pH 6)及聚山梨醇酯之3 mg/ml IL12IL18及DVD-B DVD-Ig蛋白質調配物的作用

蔗糖(mg/ml)	山梨糖醇(mg/ml)	Tween	DSF (°C) IL12IL18	DSF (°C) DVD-B
0		0.01%	60	54
10		0.01%	61	55
40		0.01%	61	55
70		0.01%	60	56
100		0.01%	60	57
	0	0.01%	61	53
	10	0.01%	62	54
	20	0.01%	61	55
	40	0.01%	62	55
	60	0.01%	62	56

基於表33中之資料，DVD-B Ig蛋白質之穩定性隨著多元醇(蔗糖或山梨糖醇)之濃度增加而提高。經測定，100 mg/mL (對於蔗糖)及60 mg/mL (對於山梨糖醇)為實現滲透壓的大致最大濃度，且因此加以研究。就穩定性而言，60至100 mg/mL範圍內之蔗糖經測定為有效的，而20至60 mg/mL範圍內之山梨糖醇為有效的。相比之下，如藉由DSF所量測，表33中所示之IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質之結果未顯示穩定性改良。

實例16：pH值及組胺酸濃度(pH 6)對100 mg/ml之DVD-B及IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之存放穩定性的影響

如使用尺寸排阻層析法(SEC)所量測，以下實例顯示組胺酸濃度(0至200 mM範圍)對DVD-B及IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之存放穩定性的作用。製備樣品且評估100 mg/mL DVD-Ig蛋白質溶液在5℃及40℃之儲存穩定性。所定義之儲存期之後，拉伸樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。簡言之，將樣品填入無菌小瓶(各約500 µL)中且在40℃，在控制條件下儲存(在恆溫室中避光儲存)。在預定時間點，將所製備溶液之樣品拉伸以便根據樣品拉伸方案分析。

表34：pH值對100 mg/mL IL12IL18 DVD-Ig蛋白質及DVD-B DVD-Ig蛋白質溶液之穩定性的作用

℃	樣品	時間(D)	調配物	聚集物	單體	片段
N/A	IL12-18	0	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.08	95.12	1.8
N/A	IL12-18	0	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.8	95.18	2.02
N/A	IL12-18	0	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.92	95.06	2.02
N/A	IL12-18	0	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.94	94.93	2.13
N/A	IL12-18	0	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.11	94.63	2.25
N/A	IL12-18	0	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	2.88	95.06	2.06
N/A	IL12-18	0	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.54	95.4	2.06
N/A	IL12-18	0	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	3.16	95.53	1.31
N/A	DVDB	0	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.96	94.2	1.84
N/A	DVDB	0	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	4.55	93.66	1.79
N/A	DVDB	0	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	4.61	93.64	1.75
N/A	DVDB	0	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	5.52	92.6	1.88
N/A	DVDB	0	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	4.94	93.24	1.83
N/A	DVDB	0	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	11.19	86.86	1.95
N/A	DVDB	0	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	5.92	92.9	1.18
N/A	DVDB	0	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	3.26	94.9	1.73
5	IL12-18	7	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.82	94.98	2.19
5	IL12-18	7	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.53	95.36	2.1
5	IL12-18	7	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.63	95.9	1.48
5	IL12-18	7	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.7	95.57	1.73
5	IL12-18	7	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.03	95.08	1.9
5	IL12-18	7	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	2.23	95.73	2.05
5	IL12-18	7	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.38	95.46	2.16
5	IL12-18	7	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	2.76	94.66	2.56
5	DVDB	7	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	4.76	93.43	1.82

℃	様品	時間(D)	調配物	聚集物	単體	片段
5	DVDB	7	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	5.41	92.75	1.85
5	DVDB	7	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	5.15	93.11	1.74
5	DVDB	7	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	6.44	91.64	1.92
5	DVDB	7	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	5.99	92.27	1.74
5	DVDB	7	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	14.69	83.4	1.91
5	DVDB	7	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	7.97	90.15	1.87
5	DVDB	7	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	4.06	94.24	1.69
5	IL12-18	21	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	4.01	91.56	4.43
5	IL12-18	21	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.08	92.37	4.55
5	IL12-18	21	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.95	92.69	4.35
5	IL12-18	21	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.86	92.71	4.43
5	IL12-18	21	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.28	92.22	4.5
5	IL12-18	21	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	2.18	93.18	4.65
5	IL12-18	21	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.42	92.36	5.22
5	IL12-18	21	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	3.95	91.84	4.2
5	DVDB	21	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	5.21	91.17	3.62
5	DVDB	21	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	6.68	89.81	3.51
5	DVDB	21	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	6.26	89.85	3.89
5	DVDB	21	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	8.13	87.88	3.99
5	DVDB	21	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	8.29	87.66	4.06
5	DVDB	21	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	19.23	77.03	3.73
5	DVDB	21	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	9.54	86.75	3.71
5	DVDB	21	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	6.25	89.65	4.09
40	IL12-18	7	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.56	95.01	2.44
40	IL12-18	7	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.06	95.45	2.5
40	IL12-18	7	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	1.93	95.59	2.48
40	IL12-18	7	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	1.82	95.3	2.92
40	IL12-18	7	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.18	95.04	2.78
40	IL12-18	7	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	1.97	95.27	2.76
40	IL12-18	7	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	1.85	95.61	2.54
40	IL12-18	7	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	4.35	92.57	3.08
40	DVDB	7	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	44.35	54.38	1.28
40	DVDB	7	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	51.66	46.62	1.72
40	DVDB	7	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	50.76	47.45	1.79
40	DVDB	7	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	53.53	44.78	1.69
40	DVDB	7	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	43.21	54.95	1.84
40	DVDB	7	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	64.17	33.34	2.49
40	DVDB	7	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	50.51	46.87	2.5
40	DVDB	7	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	36.56	60.79	2.65
40	IL12-18	21	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	4.09	90.71	5.19
40	IL12-18	21	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.16	91.26	5.58
40	IL12-18	21	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	3.15	91.78	5.07
40	IL12-18	21	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.53	91.99	5.48
40	IL12-18	21	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.88	91.52	5.61

℃	樣品	時間(D)	調配物	聚集物	單體	片段
40	IL12-18	21	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	2.52	91.59	5.89
40	IL12-18	21	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	2.29	91.97	5.74
40	IL12-18	21	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	5.35	88.56	6.09
40	DVDB	21	0 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	55.03	39.46	5.51
40	DVDB	21	5 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	57.67	37.17	5.16
40	DVDB	21	10 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	55.56	39.33	5.11
40	DVDB	21	50 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	58.62	36.27	5.11
40	DVDB	21	200 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	56.6	37.74	5.66
40	DVDB	21	15 mM Ace pH 4.50+ Tween + 蔗糖	67.47	26.81	5.71
40	DVDB	21	15 mM His pH 6+ Tween + 蔗糖	63.14	31.52	5.34
40	DVDB	21	15 mM Pho pH 7.40+ Tween + 蔗糖	49.52	44.7	5.78

表34亦顯示4.5至7.4之pH值範圍(pH 4.5為15 mM乙酸鹽，pH 6為15 mM組胺酸且pH 7.4為15 mM磷酸鹽)對兩種DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用。資料表明IL12IL18 DVD-Ig蛋白質AS-DVD-Ig蛋白質之穩定性在約4.5至約7.4之pH值之間得以維持，而非AS DVD-Ig蛋白質DVD-B在pH值超過4.5時為不穩定的，如依據隨時間形成更高量之聚集物所指示。緩衝劑組胺酸之量似乎對穩定性幾乎無作用，表明非AS DVD-Ig蛋白質之穩定性問題可藉由調配物參數緩和，對於單株抗體而言，情況確是如此。

資料表明IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之穩定性在4.5至7.4之pH值範圍內得以維持，而DVD-B溶液在pH 4.5或pH 7.4不穩定。然而，在0至200 mM組胺酸濃度範圍內，在pH 6，在指定上述條件下，兩種DVD-Ig蛋白質溶液之穩定性顯示類似穩定性概況。

實例17：在pH 6，檸檬酸鹽濃度對100 mg/ml之DVD-B及IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之儲存穩定性的作用

以下實例描述檸檬酸鹽緩衝液濃度(0至100 mM範圍)對DVD-B及IL12/IL18 DVD-Ig蛋白質之儲存穩定性的影響。製備樣品且評估100 mg/mL DVD-Ig蛋白質溶液在5℃及40℃之儲存穩定性。所定義之儲存期之後，拉伸樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。簡言之，將樣品填入無菌小瓶(各約500 µL)中且在40℃，在控制條件

下儲存(在恆溫室中避光儲存)。在預定時間點，將所製備溶液之樣品拉伸以便根據樣品拉伸方案分析。

表35：pH值對DVD-B及IL12IL18 DVD-Ig蛋白質之穩定性的作用

℃	樣品	時間(D)	調配物	聚集物	單體	片段
	IL12/18	0	0 mM Cit pH 6	3.2	94.98	1.82
	IL12/18	0	5 mM Cit pH 6	3.3	94.68	2.2
	IL12/18	0	10 mM Cit pH 6	3.06	94.76	2.18
	IL12/18	0	50 mM Cit pH 6	2.52	95.28	2.19
	IL12/18	0	100 mM Cit pH 6	2.82	95.05	2.13
	IL12/18	0	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.73	95.11	2.16
	IL12/18	0	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.47	95.55	1.97
	IL12/18	0	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.67	95.1	2.23
	IL12/18	0	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.57	95.37	2.05
	IL12/18	0	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.55	95.24	2.21
5	IL12/18	7	0 mM Cit pH 6	2.91	94.51	2.58
5	IL12/18	7	5 mM Cit pH 6	3.16	94.76	2.08
5	IL12/18	7	10 mM Cit pH 6	2.77	94.77	2.46
5	IL12/18	7	50 mM Cit pH 6	3.16	94.67	2.17
5	IL12/18	7	100 mM Cit pH 6	2.84	95.81	1.36
5	IL12/18	7	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.58	95.21	2.21
5	IL12/18	7	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.98	94.84	2.18
5	IL12/18	7	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.78	94.82	2.4
5	IL12/18	7	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.87	94.79	2.35
5	IL12/18	7	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.77	94.97	2.25
5	IL12/18	21	0 mM Cit pH 6	3.22	94.21	2.57
5	IL12/18	21	5 mM Cit pH 6	3.64	95.31	1.05
5	IL12/18	21	10 mM Cit pH 6	3.4	93.9	2.7
5	IL12/18	21	50 mM Cit pH 6	3.66	94.53	1.81
5	IL12/18	21	100 mM Cit pH 6	3.3	94.47	2.23
5	IL12/18	21	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.93	94.44	2.68
5	IL12/18	21	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.19	94.71	2.1
5	IL12/18	21	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.2	94.54	2.26
5	IL12/18	21	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.12	94.51	2.37
5	IL12/18	21	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.88	94.94	2.19
40	IL12/18	7	0 mM Cit pH 6	3.06	94.81	2.12
40	IL12/18	7	5 mM Cit pH 6	3.4	94.33	2.27
40	IL12/18	7	10 mM Cit pH 6	3.28	94.47	2.24
40	IL12/18	7	50 mM Cit pH 6	3.81	94.13	2.06
40	IL12/18	7	100 mM Cit pH 6	3.55	94.07	2.38
40	IL12/18	7	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.7	96.87	0.44
40	IL12/18	7	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.84	94.61	2.55
40	IL12/18	7	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.98	94.61	2.4
40	IL12/18	7	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.88	94.84	2.27
40	IL12/18	7	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.96	94.64	2.4
40	IL12/18	21	0 mM Cit pH 6	4.48	91.27	4.26

℃	樣品	時間(D)	調配物	聚集物	單體	片段
40	IL12/18	21	5 mM Cit pH 6	4.92	90.99	4.1
40	IL12/18	21	10 mM Cit pH 6	4.62	91.2	4.18
40	IL12/18	21	50 mM Cit pH 6	4.69	91.53	3.78
40	IL12/18	21	100 mM Cit pH 6	4.24	92.23	3.52
40	IL12/18	21	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.92	91.87	4.21
40	IL12/18	21	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.92	92.05	4.03
40	IL12/18	21	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	4.01	91.63	4.36
40	IL12/18	21	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.66	92.52	3.81
40	IL12/18	21	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.78	91.89	4.33
5		3個月	0 mM Cit pH 6	2.53	94.36	3.11
5		3個月	5 mM Cit pH 6	2.89	94.33	2.77
5	IL12/18	3個月	10 mM Cit pH 6	3	94.35	2.64
5	IL12/18	3個月	50 mM Cit pH 6	3.78	93.83	2.39
5	IL12/18	3個月	100 mM Cit pH 6	3.58	94.45	1.98
5	IL12/18	3個月	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.94	94.71	2.35
5	IL12/18	3個月	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.58	94.29	2.13
5	IL12/18	3個月	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.95	95.16	1.89
5	IL12/18	3個月	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.44	94.58	1.98
5	IL12/18	3個月	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.24	94.54	2.21
5	IL12/18	6個月	0 mM Cit pH 6	6.4	90.99	2.61
5	IL12/18	6個月	5 mM Cit pH 6	6.18	91.58	2.24
5	IL12/18	6個月	10 mM Cit pH 6	6.04	92.12	1.84
5	IL12/18	6個月	50 mM Cit pH 6	5.72	92.9	1.38
5	IL12/18	6個月	100 mM Cit pH 6	5.98	92.86	1.16
5	IL12/18	6個月	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	4.98	94.02	1
5	IL12/18	6個月	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	5.47	92.96	1.5
5	IL12/18	6個月	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	4.51	94.56	0.9
5	IL12/18	6個月	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	4.58	93.44	1.9
5	IL12/18	6個月	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	4.63	93.54	1.82
5	IL12/18	6個月	0 mM Cit pH 6	6.4	90.99	2.61
	DVD-B	0	0 mM Cit pH 6	2.6	95.63	1.77
		0	5 mM Cit pH 6	2.6	95.49	1.87
	DVD-B	0	10 mM Cit pH 6	2.41	95.88	1.72
	DVD-B	0	50 mM Cit pH 6	1.76	96.62	1.62
	DVD-B	0	100 mM Cit pH 6	1.34	97	1.66
	DVD-B	0	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	1.54	97.31	1.15
	DVD-B	0	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	1.52	96.74	1.73
	DVD-B	0	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	1.5	96.8	1.71
	DVD-B	0	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	1.5	96.74	1.75
	DVD-B	0	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	1.11	97.16	1.73
5	DVD-B	7	0 mM Cit pH 6	2.61	95.54	1.85
5	DVD-B	7	5 mM Cit pH 6	3.01	95.37	1.62

℃	樣品	時間(D)	調配物	聚集物	單體	片段
5	DVD-B	7	10 mM Cit pH 6	3.2	95.12	1.68
5	DVD-B	7	50 mM Cit pH 6	2.85	95.5	1.64
5	DVD-B	7	100 mM Cit pH 6	2.14	96.22	1.64
5	DVD-B	7	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.32	95.95	1.73
5	DVD-B	7	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.86	95.47	1.66
5	DVD-B	7	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.71	95.61	1.68
5	DVD-B	7	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	2.75	95.62	1.64
5	DVD-B	7	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	1.97	96.35	1.68
5	DVD-B	21	0 mM Cit pH 6	3.33	94.44	2.23
5	DVD-B	21	5 mM Cit pH 6	4.97	92.72	2.31
5	DVD-B	21	10 mM Cit pH 6	5.52	92.56	1.92
5	DVD-B	21	50 mM Cit pH 6	4.88	93.82	1.3
5	DVD-B	21	100 mM Cit pH 6	3.7	94.76	1.54
5	DVD-B	21	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3	95.28	1.72
5	DVD-B	21	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	4.88	93.06	2.06
5	DVD-B	21	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	5	93.41	1.59
5	DVD-B	21	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	5.01	93.14	1.84
5	DVD-B	21	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	3.77	94.38	1.85
40	DVD-B	7	0 mM Cit pH 6	51.75	46.63	1.62
40	DVD-B	7	5 mM Cit pH 6	58.47	39.22	2.31
40	DVD-B	7	10 mM Cit pH 6	58.39	38.8	2.8
40	DVD-B	7	50 mM Cit pH 6	47.99	49.69	2.32
40	DVD-B	7	100 mM Cit pH 6	39.78	58.14	2.09
40	DVD-B	7	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	47.61	49.83	2.56
40	DVD-B	7	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	56.88	40.48	2.64
40	DVD-B	7	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	46.46	50.97	2.57
40	DVD-B	7	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	45.57	52.03	2.4
40	DVD-B	7	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	34.2	63.53	2.27
40	DVD-B	21	0 mM Cit pH 6	60.28	36.18	3.54
40	DVD-B	21	5 mM Cit pH 6	n/a	n/a	n/a
40	DVD-B	21	10 mM Cit pH 6	n/a	n/a	n/a
40	DVD-B	21	50 mM Cit pH 6	n/a	n/a	n/a
40	DVD-B	21	100 mM Cit pH 6	n/a	n/a	n/a
40	DVD-B	21	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	56.73	39.59	3.67
40	DVD-B	21	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	59.87	36.82	3.3
40	DVD-B	21	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	53.36	43.59	3.05
40	DVD-B	21	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	51.27	45.72	3.01
40	DVD-B	21	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	44.11	52.84	3.05
5	DVD-B	3個月	0 mM Cit pH 6	7.25	90.86	1.9
5	DVD-B	3個月	5 mM Cit pH 6	13.89	84.29	1.82
5	DVD-B	3個月	10 mM Cit pH 6	18.99	79.33	1.68
5	DVD-B	3個月	50 mM Cit pH 6	16.07	82.2	1.73
5	DVD-B	3個月	100 mM Cit pH 6	12.87	85.6	1.52
5	DVD-B	3個月	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	7.43	90.74	1.83
5	DVD-B	3個月	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	15.08	83.23	1.69
5	DVD-B	3個月	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	16.03	82.02	1.95

°C	樣品	時間(D)	調配物	聚集物	單體	片段
5	DVD-B	3個月	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	17.09	81.17	1.74
5	DVD-B	3個月	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	10.89	87.64	1.46
5	DVD-B	6個月	0 mM Cit pH 6	15.5	82.31	2.2
5	DVD-B	6個月	5 mM Cit pH 6	27.45	71.13	1.43
5	DVD-B	6個月	10 mM Cit pH 6	34.37	63.99	1.63
5	DVD-B	6個月	50 mM Cit pH 6	29.11	69.6	1.29
5	DVD-B	6個月	100 mM Cit pH 6			
5	DVD-B	6個月	0 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	15.24	83.22	1.54
5	DVD-B	6個月	5 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	27.28	71.19	1.53
5	DVD-B	6個月	10 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	27.69	70.8	1.51
5	DVD-B	6個月	50 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	27.18	70.78	2.04
5	DVD-B	6個月	100 mM Cit pH 6+ 蔗糖+Tween	21.8	76.46	1.74

表35中之兩種DVD-Ig蛋白質在pH 6，在0至100 mM檸檬酸鹽濃度之間顯示不同的穩定性概況。雖然AS-DVD-Ig蛋白質IL12IL18顯示高穩定性(隨著時間逝去，聚集物僅少量增加，在5°C尤其如此)，但是對於非AS-DVD-Ig蛋白質DVD-B而言確實存在相反情形。此表明在彼等條件下，高濃度液體調配物對於IL12IL18 DVD-Ig蛋白質而言為可行的，但對於DVD-B而言不可行。

VIII. 穩定凍乾DVD-IG (LS-DVD-IG)蛋白質調配物

實例18及19描述呈凍乾形式之LS-DVD-Ig蛋白質之穩定性。實例18描述的驚人結果證明LS-DVD-Ig蛋白質之冷凍/解凍(F/T)穩定性。實例19描述的研究顯示含有LS-DVD-Ig蛋白質之穩定凍乾調配物。冷凍為凍乾之第一步驟且不具有冷凍解凍穩定性之分子因此在凍乾期間容易不穩定。

實例18：溶液pH值對經受重複冷凍/解凍循環之DVD-Ig蛋白質之穩定性的影響

藉由使pH 4、pH 6及pH 8之蛋白質溶液在冷凍狀態與液體狀態之間循環多達2次來評估蛋白質濃度為1 mg/ml之DVD-Ig蛋白質於5 mM檸檬酸鹽/5 mM磷酸鹽緩衝液中之冷凍解凍性質。使用溫度控制在-80°C之冷凍機進行冷凍，且使用溫度控制在30°C之水浴進行解

凍。第二次冷凍/解凍(F/T)循環之後拉伸樣品且藉由SEC分析。表36顯示冷凍/解凍處理對在此等pH水準下所調配之樣品中剩餘之單體(Mon)之量及所形成之片段(Frag)及聚集物(Agg)之量的作用。

表36：如藉由SEC所測定，具有溶液pH值4、6或8之DVD-Ig蛋白質調配物重複冷凍/解凍循環之前及之後，DVD-Ig蛋白質單體、聚集物及片段之數目

DVD-Ig	pH	單體/T0	聚集物/T0	片段/T0	單體/T2	聚集物/T2	片段/T2
5	4	95.06	0.44	4.49	93.57	1.52	4.89
6	4	95.26	1.21	3.52	94.94	1.72	3.33
37	4	97.32	1.89	0.78	96.64	2.48	0.86
38	4	94.46	3.81	1.72	94.91	3.55	1.52
53	4	97.47	1	1.52	97.41	1.06	1.52
54	4	96.06	1.87	2.06	95.87	1.85	2.26
65	4	94.44	1.2	4.35	93.82	1.15	5.01
66	4	98.01	0.91	1.07	97.78	1.03	1.18
165	4	96.62	2.17	1.2	95.45	2.34	2.19
166	4	97.74	0.91	1.34	97.53	0.91	1.54
257	4	97.63	1.8	0.56	96.73	2.73	0.53
258	4	98.84	0.19	0.95	96.73	2.28	0.97
277	4	95.53	1.43	3.03	95.45	1.6	2.93
278	4	95.75	1.56	2.68	95.4	1.99	2.59
281	4	98.72	0.63	0.63	97.47	1.83	0.68
282	4	98.63	0.61	0.74	97.88	1.38	0.72
5	6	94.8	3.13	2.06	94.96	3.37	1.67
6	6	95.79	1.99	2.2	93.71	4.02	2.26
37	6	96.73	2.52	0.74	94.88	4.42	0.68
38	6	95.01	3.74	1.23	95.5	3.29	1.2
53	6	97.56	1	1.43	97.51	1.08	1.4
54	6	95.86	2.07	2.06	95.68	2.18	2.13
65	6	94.17	1.09	4.72	94.13	1.16	4.7
66	6	97.99	0.85	1.15	98.03	0.83	1.13
165	6	96.86	2.12	1.01	96.03	2.38	1.57
166	6	97.75	0.91	1.33	97.82	0.9	1.26
257	6	97.51	1.97	0.51	97.31	2.19	0.49
258	6	99.07	0.18	0.73	98.52	0.76	0.7
277	6	96.74	1.79	1.46	96.64	1.92	1.43
278	6	97.65	1.22	1.12	97.62	1.32	1.04
281	6	95.67	0.92	3.4	95.7	0.98	3.3
282	6	98.55	0.83	0.61	98.49	0.89	0.6
5	8	93.23	3.86	2.89	93.7	3.56	2.73
6	8	95.35	1.93	2.7	94.3	2.94	2.74
37	8	94.88	4.27	0.84	95.64	3.54	0.8
38	8	95.52	3.14	1.32	96.09	2.61	1.28
53	8	97.56	1.04	1.39	97.66	1.02	1.31
54	8	95.77	1.91	2.3	95.91	1.9	2.17

DVD-Ig	pH	單體/T0	聚集物/T0	片段/T0	單體/T2	聚集物/T2	片段/T2
65	8	94.1	1.14	4.74	94.29	1.14	4.56
66	8	97.84	0.95	1.2	97.74	0.95	1.3
165	8	96.63	2.23	1.12	96.07	2.32	1.59
166	8	97.55	0.9	1.54	97.77	0.85	1.37
257	8	97.12	2.19	0.67	96.62	2.7	0.67
258	8	98.81	0.28	0.9	98.71	0.39	0.89
277	8	95.48	2.23	2.27	95.52	2.24	2.22
278	8	95.94	1.83	2.21	96.08	1.67	2.23
281	8	95.61	1	3.38	95.94	0.98	3.06
282	8	98.28	1.04	0.67	98.26	1.05	0.67

DVD 5、DVD 6、DVD 37、DVD 38、DVD 53、DVD 54、DVD 65、DVD 66、DVD 165、DVD 166、DVD 257、DVD 258、DVD 277、DVD 278、DVD 281及DVD 282在重複冷凍解凍循環之後顯示穩定性。此等資料表明在約4至約8之pH值範圍內調配的DVD-Ig蛋白質在重複F/T處理之後保持穩定。因為DVD-Ig蛋白質比IgG複雜得多，所以所測試之DVD-Ig蛋白質調配物意外地具有高穩定性(所有皆顯示大於93%單體含量且11/16調配物顯示大於95%單體含量)。諸如DVD-Ig蛋白質之複雜分子當暴露於冷凍及解凍時預期容易聚集及片段化。

溶液pH值對經受重複冷凍/解凍循環之DVD-B之穩定性的影響

藉由使pH 4-9蛋白質溶液在冷凍狀態與液體狀態之間循環多達4次來評估蛋白質濃度為2 mg/ml之DVD-B於10 mM檸檬酸鹽/10 mM磷酸鹽緩衝液中之冷凍解凍性質。藉助於溫度控制在-80℃之冷凍機進行冷凍，且藉助於溫度控制在30℃之水浴進行解凍。每次冷凍/解凍(F/T)循環之後拉伸樣品且藉由遮光及SEC分析。表37顯示如在多種pH值下使用遮光量測法所測定，冷凍/解凍處理對所形成之亞可見顆粒數目的作用。

表37：如藉由遮光分析所測定，pH值為4、5、6、7、8或9之DVD-B調配物在0至4次冷凍/解凍(F/T)循環之後的每毫升亞可見顆粒數目

(A) 尺寸≥1微米之顆粒數目。						
F/T循環次數	pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
0	39.16	55	44	41	55	46
1	334.5	1291	38127	31896	28444	25970

2	6728.6	7935	80064	61592	58562	46863
3	13658	18733	128448	95775	89934	67225
4	5702	37930	175024	132768	120339	89389
(B) 尺寸≥10微米之顆粒數目。						
F/T循環次數	pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
0	1.33	1.5	2.6	2.6	5.5	1.83
1	15.16	3.16	28	45	27.16	16.83
2	207.5	62	142	165	148	134
3	342	136	440	740	773	375
4	572	269	2418	4099	4537	1425
(C) 尺寸≥25微米之顆粒數目。						
F/T循環次數	pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
0	0.33	0.33	0.16	0.5	1.16	0.16
1	3.3	0.5	3.83	2	4.33	1.33
2	40.16	10.83	2.33	6.33	1.16	3.16
3	71.16	6.67	13.5	39.83	39.33	5.33
4	118.83	67.63	198.67	476.16	641.5	142.83

遮光分析結果顯示，由pH 4至9之DVD-B調配物形成的顆粒數目較低。所形成之顆粒數目隨pH值提高而增加，且在分子之pI (pI 8.5)附近處於最大值。然而，僅有一項例外，所測試之蛋白質溶液滿足人類用途藥物註冊技術要求國際會議(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH))準則之要求，其要求每毫升25微米或大於25微米之顆粒數少於600個。

表38顯示冷凍/解凍處理之後，DVD-B之穩定性的SEC量測結果。此等量測結果包括單體、聚集物及片段之百分比以及曲線下面積(AUC)。

表38：如藉由SEC所測定，溶液pH值為4、5、6、7、8或9之DVD-B調配物在0至4次冷凍/解凍循環之後的DVD-B穩定性

(A) 未經受F/T循環之溶液之SEC量測結果				
	單體	聚集物	片段	AUC
pH 4小瓶1	96.38	1.44	2.16	76861
pH 4小瓶2	95.61	1.56	2.82	76123
pH 4平均值	95.995	1.5	2.49	76492
pH 5小瓶1	96.1	1.57	2.32	73704
pH 5小瓶2	96.16	1.55	2.28	74196
pH 5平均值	96.13	1.56	2.3	73950

pH 6小瓶2	95.09	1.69	3.2	77475
pH 7小瓶2	95.61	1.81	2.56	75863
pH 8小瓶2	95.84	1.87	2.27	74943
pH 9小瓶1	95.66	2.11	2.21	82103
pH 9小瓶2	95.43	2.14	2.41	81843
pH 9平均值	95.545	2.125	2.31	81973

(B) 一次F/T循環之後的SEC量測結果

pH 4小瓶1	96.37	1.68	1.94	74694
pH 4小瓶2	95.39	1.74	2.86	76213
pH 4平均值	95.88	1.71	2.4	75453.5
pH 5小瓶1	96.18	1.82	1.98	71511
pH 5小瓶2	96.08	1.6	2.31	76345
pH 5平均值	96.13	1.71	2.145	73928
pH 6小瓶1	96.37	1.6	2.02	75448
pH 6小瓶2	95.24	1.6	3.14	77009
pH 6平均值	95.805	1.6	2.58	76228.5
pH 7小瓶1	95.88	1.86	2.24	75821
pH 7小瓶2	95.28	1.96	2.74	76470
pH 7平均值	95.58	1.91	2.49	76145.5
pH 8小瓶1	95.64	2.01	2.34	74757
pH 8小瓶2	95.59	2.08	2.31	74270
pH 8平均值	95.81536	1.777143	2.3925	75306.68
pH 9小瓶1	95.62	2.15	2.22	81981
pH 9小瓶2	95.57	2.13	2.29	81516
pH 9平均值	95.595	2.14	2.255	81748.5

(C) 兩次F/T循環之後的SEC量測結果

pH 4小瓶1	95.75	1.98	2.25	75402
pH 4小瓶2	95.29	1.98	2.71	74567
pH 4平均值	95.52	1.98	2.48	74984.5
pH 5小瓶1	96.07	1.85	2.06	71454
pH 5小瓶2	95.92	1.88	2.19	71525
pH 5平均值	95.995	1.865	2.125	71489.5
pH 6小瓶1	96.33	1.58	2.08	74666
pH 6小瓶2	95.43	1.62	2.93	75080
pH 6平均值	95.88	1.6	2.505	74873
pH 7小瓶1	95.77	1.87	2.34	74813
pH 7小瓶2	95.72	1.84	2.42	74584
pH 7平均值	95.745	1.855	2.38	74698.5
pH 8小瓶1	95.72	2.02	2.24	73460
pH 8小瓶2	95.78	2	2.21	68769
pH 8平均值	95.75	2.01	2.225	71114.5
pH 9小瓶1	95.58	2.1	2.3	73356
pH 9小瓶2	95.57	2.12	2.3	77337
pH 9平均值	95.575	2.11	2.3	75346.5

(D) 三次F/T循環之後的SEC量測結果

pH 4小瓶1	95.62	2.14	2.22	72539
pH 4小瓶2	95.01	2.23	2.75	72480
pH 4平均值	95.315	2.185	2.485	72509.5
pH 5小瓶1	95.9	1.99	2.09	68689
pH 5小瓶2	95.8	1.98	2.21	65381
pH 5平均值	95.85	1.985	2.15	67035
pH 6小瓶2	95.55	1.63	2.81	71195
pH 7小瓶1	96.03	1.84	2.12	70617
pH 7小瓶2	95.77	1.86	2.35	71405
pH 7平均值	95.9	1.85	2.235	71011
pH 8小瓶1	95.86	2.04	2.08	69364
pH 8小瓶2	95.59	2.12	2.28	69308
pH 8平均值	95.725	2.08	2.18	69336
pH 9小瓶1	95.03	2.42	2.54	77679
pH 9小瓶2	95.59	2.22	2.18	76113
pH 9平均值	95.31	2.32	2.36	76896

(E) 四次F/T循環之後的SEC量測結果

pH 4小瓶1	94.38	2.53	3.08	53902
pH 4小瓶2	94.08	2.4	3.5	72943
pH 4平均值	94.23	2.465	3.29	63422.5
pH 5小瓶1	96.01	1.88	2.1	66962
pH 5小瓶2	95.85	1.96	2.18	67786
pH 5平均值	95.93	1.92	2.14	67374
pH 6小瓶1	96.26	1.62	2.11	70371
pH 6小瓶2	95.41	1.67	2.9	71086
pH 6平均值	95.835	1.645	2.505	70728.5
pH 7小瓶1	95.87	1.82	2.29	67317
pH 7小瓶2	96.03	1.81	2.15	67869
pH 7平均值	95.95	1.815	2.22	67593
pH 8小瓶1	95.62	2.07	2.3	69629
pH 8小瓶2	95.31	2.15	2.52	69401
pH 8平均值	95.465	2.11	2.41	69515
pH 9小瓶1	95.44	2.27	2.28	77495
pH 9小瓶2	95.58	2.18	2.22	73373
pH 9平均值	95.51	2.225	2.25	75434

表38中之結果表明DVD-Ig蛋白質未形成大量聚集物，即使在4次F/T循環之後。良好F/T穩定性令人驚訝，因為預期由於其結構複雜性較高，所以DVD-Ig蛋白質更傾向於在液體/冰界面經歷降解或甚至在多次冷凍/解凍循環時發生冷變性。此為蛋白質之常見觀測結果且許多其他DVD-Ig蛋白質在冷凍/解凍時顯示大量聚集。因為冷凍為凍乾

過程之初始及關鍵步驟，所以資料表明DVD-B可凍乾且由此轉化為穩定的生物治療劑型。

表37中之結果表明DVD-Ig蛋白質未形成大量聚集物，即使在4次F/T循環之後亦如此。良好的F/T穩定性令人驚訝，因為預期穩定性可能不如所觀測到的良好(若穩定性內在缺乏且結構複雜性相對於抗體增大)。

實例19：凍乾對DVD-Ig蛋白質穩定性之影響

在凍乾過程中以及隨後在固體蛋白質穩定存放期間可形成聚集物。在凍乾期間所形成的聚集物通常在快速復原之後量測到。

評估DVD-Ig蛋白質在控制溫度條件下之長期儲存穩定性。所定義之儲存期之後，拉伸樣品且藉由尺寸排阻層析法(SEC)及離子交換層析法(IEC)評估儲存時間及儲存溫度對所凍乾DVD-Ig蛋白質穩定性之影響。研究三種DVD-Ig蛋白質：DVD-B (TNF-PGE2)、DVD-A (TNF-IL17)及DVD-C (IL1 α IL1 β)。三者中，DVD-A及DVD-C為AS-DVD-Ig蛋白質。DVD-B為非AS-DVD-Ig蛋白質，但鑑別為LS-DVD-Ig蛋白質，因為發現其(以及LS-DVD-Ig蛋白質DVD-A及DVD-C)穩定存在於凍乾調配物中。如表39中所示，將調配物溶液(含有緩衝液、多元醇及界面活性劑之調配物)凍乾。

表39：凍乾調配物之組成

組分	DVD-A 55 mg/ml	DVD-B 55 mg/ml	DVD-C 48 mg/ml
組胺酸	2.33 (15mM)	2.33 (15mM)	2.33 (15mM)
蔗糖	46 (4.6%)	46 (4.6%)	46 (4.6%)
聚山梨醇酯80	0.2 (0.02%)	0.2 (0.02%)	0.1 (0.01%)
0.1 M HCl	足量(pH 5.25)	足量(pH 5.25)	足量(pH 6.0)

表40描述凍乾調配物在5℃或40℃儲存之前(T0)或儲存指定儲存期之後所量測之單體、聚集物及片段之百分比。

表40：如使用SEC所評定，凍乾調配物之儲存穩定性

DVD-Ig	儲存條件	單體	聚集物	片段
DVD-A	T0	94.22	5.09	0.67
	1週，40℃	94.12	5.23	0.64
	4週，40℃	94.41	5.14	0.43
	3m 40C	93.31	6.24	0.43
	3m 40C + 3h RT	93.17	6.38	0.43
DVD-B	T0	96.59	2.11	1.28
	1週，40℃	96.11	2.59	1.28
	4週，40℃	95.44	3.19	1.36
	4週，5℃	96.47	2.2	1.31
	4週，40℃ + 3h RT	95.35	3.29	1.34
DVD-C	T0	96.55	2.94	0.5
	1週，40℃	97.165	1.59	1.23
	1m 40℃	96.88	1.93	1.18
	3m 5℃	97.42	1.36	1.21

表40中之SEC資料顯示，凍乾LS-DVD-Ig蛋白質在儲存長達3個月期間保持穩定，因為其顯示高單體百分比及低聚集物及片段百分比。在40℃加速儲存3個月及3小時之復原時間之後，凍乾DVD-A具有超過93%單體、小於6.4%聚集物及僅約0.4%片段。在40℃加速儲存4週之後，凍乾DVD-B具有超過95%單體及僅約3.2%聚集物及約1.4%片段。在40℃加速儲存1個月之後，如藉由SEC所評定，凍乾DVD-C具有約97%單體、2%聚集物及1%片段。因此，DVD-A、DVD-B及DVD-C之凍乾調配物顯示長期穩定性。

下表41提供使用IEC量測之關於調配物之儲存穩定性的資料。如依據隨時間形成之酸性及鹼性物質所觀測，化學穩定性之影響不顯著。因此，所有測試分子在凍乾狀態下未顯示顯著化學降解。評估凍乾DVD-Ig蛋白質在40℃及5℃之儲存穩定性。所定義之儲存期之後，拉伸凍乾樣品且評估儲存時間對DVD-Ig蛋白質穩定性的影響。樣品用注射用水復原且在完全復原時，使用SEC及IEC分析。

表41：如使用IEC所評定，凍乾調配物之儲存穩定性

DVD-Ig	儲存條件	主要物質	酸性物質	鹼性物質	X
DVD-A	T0	73.28	3.6	20.78	2.32
	1週，40°C	72.59	3.38	21.91	2.1
	4週，40°C	70.73	3.6	23.44	2.21
	3m 40°C	71.75	3.84	22	2.39
	3m 40°C + 3h RT	71.8	3.71	22.03	2.44
DVD-B	T0	48.84	38.54	12.6	
	1週，40°C	48.18	38.72	13.09	
	4週，40°C	45.87	37.6	16.53	
	4週，5°C	48.17	38.16	13.56	
	4週，40°C + 3h RT	45.7	37.79	16.5	
DVD-C	1週，40°C	54.82	28.82	16.35	
	1m 40°C	53.61	28.84	17.53	
	3m 5°C	55.43	28.57	15.99	

如依據隨時間形成之酸性及鹼性物質所觀測，上文表40中所見之化學穩定性之影響不顯著。

下表42提供所儲存凍乾調配物之復原時間。用於表徵凍乾劑型之可行性的一個基本標準為凍乾樣品在用溶劑(一般為注射用水)復原之後轉化為均質透明液體所需之時間。復原程序所花時間理想地小於10分鐘。如表41中所示，所有測試樣品在最多5分鐘之後顯示完全復原。此表明AS-DVD-Ig蛋白質(例如DVD-Ig蛋白質A及C)可調配為穩定凍乾調配物。此外，上述實例顯示在液體調配物中不穩定的LS-DVD-Ig蛋白質可使用凍乾法加以穩定化(例如DVD-B)。

表42：凍乾調配物之復原時間(RT) (使用注射用水)

DVD-Ig	儲存條件	RT
DVD-A	T0	30s
	T1週，40°C	26s
	T4週，40°C	48s
	T3個月，40°C	300s
DVD-B	T0	48s
	T1週，40°C	60s
	T4週，5°C	69s
	T4週，40°C	89s
DVD-C	T0	47s
	T1週，40°C	76s
	3m 5°C	62s
	1m 40°C	53s

IX. 表徵DVD-Ig蛋白質

實例20至23一般性提供DVD-Ig蛋白質之進一步表徵。

實例20：使用PEG 3000之DVD-Ig蛋白質之溶解度評定

聚乙二醇(PEG)通常用作「大塊頭(crowder)」，其迫使蛋白質進入較少量水中，因為一些可用溶劑結合至大塊頭(通常為聚合物)或被大塊頭佔據。藉由利用在發展早期可獲得之微量蛋白質材料，利用PEG評定蛋白質之真實溶解度。一般而言，誘導沈澱所需之PEG量越大，則蛋白質於溶液中之預期真實溶解度會越大。

使用PEG溶液(50% w/v)添加至蛋白質於pH 6緩衝液(5 mM檸檬酸鹽及5 mM磷酸鹽)中之儲備溶液(0.5 mg/ml)中的少量等分樣品進行以下研究。表43顯示多種DVD-Ig蛋白質之資料。

表43.誘導DVD-Ig蛋白質沈澱於0.5 mg/ml蛋白質溶液中所需之PEG 3000之量

DVD-Ig	誘導沈澱所需之PEG 3000%
5	10
6	9.37
37	10
38	9.33
53	8.12
54	9.37
65	7.5
66	7.5
165	10.625
166	11.875
257	9.37
258	10.62
277	12.5
278	13.75
281	8.12
282	7.5

此等資料顯示，誘導DVD-Ig蛋白質沈澱所需之PEG 3000之量代表高度可溶性蛋白質(亦即真實溶解度超過約100 mg/ml之彼等蛋白質)。雖然PEG沈澱分析為抗體調配物評定中可提供關於其溶解度之資訊的標準分析，但其不足以預測DVD-Ig蛋白質是否歸類為AS或LS

或甚至非LS，表明與單株抗體相比，DVD-Ig蛋白質複雜且調配工作艱難。

實例21：使用近UV CD掃描法評定DVD-Ig蛋白質之三級結構

蛋白質結構為在蛋白質液體及凍乾調配物加速/長期儲存期間影響蛋白質穩定性的重要因素之一。為評定DVD-Ig蛋白質之三級結構，在1 mg/ml之濃度下，在Jasco光譜儀上，以50奈米/分鐘之掃描速率進行近UV CD掃描(250至320 nm)。每種DVD-Ig蛋白質平均進行3次掃描。在5 mM檸檬酸鹽及5 mM磷酸鹽條件下，研究中所用之pH值為6。亦對單株抗體進行UV CD掃描以便比較。圖5中所呈現之資料表明DVD-Ig蛋白質具有摺疊結構，如250至320 nm區域內存在特徵性橢圓形輪廓所指示。

圖5中所呈現之DVD-Ig橢圓率值類似於針對已知穩定單株抗體所觀測者。因此，預期DVD-Ig蛋白質與mAb皆顯示類似儲存穩定性。然而，LS-DVD-Ig蛋白質穩定性實際上小於mAb。因此，單獨UV-CD資料不能用於準確預測針對LS-DVD-Ig蛋白質所觀測到之穩定性問題。

實例22：使用ATR-FTIR評定DVD-Ig蛋白質之二級結構

為評定DVD-Ig蛋白質之二級結構(第二衍生物)，對Bruker之ATR-FTIR儀器(Tensor 27)上進行之面積歸一化FTIR掃描(在1600至1700 cm^{-1} 區域內)進行曲線擬合且分析多個峰且合計獲得分子中 β 片狀結構之總百分比。特定而言，考慮諸如位於1638 cm^{-1} 之峰，其為 β 片狀排列之指標。這是因為 β 片已知構成mAb之大部分二級結構。因此，預期來源於mAb之DVD-Ig蛋白質亦主要含有 β 片作為其二級結構組成。與此之任何偏差可表明分子之總體結構完整性受損。研究是在pH 4、6或8之5 mM檸檬酸鹽/5 mM磷酸鹽緩衝液中進行。DVD-Ig蛋白質濃度為1 mg/ml。評定16種DVD-Ig蛋白質之 β 結構總百分比(參見

表44)。

表44：使用ATR-FTIR量測之DVD-Ig蛋白質之β結構總百分比

DVD-Ig	pH 6	pH 4	pH 8
5	89.8	86.5	95.8
6	94.1	78.2	92.3
37	89.6	85.9	90.9
38	96.5	92	95.6
53	NA	NA	96.4
54	97.4	87.7	96.8
65	95.2	95.8	94.8
66	94.6	94.2	94.2
165	NA	NA	95.2
166	95.1	90	95.2
257	95.8	89.6	90.8
258	95.6	88.3	96.6
277	93.6	85.3	95
278	93.8	77.4	94.3
281	94.4	84.4	85
282	93	84.7	84.6

表45中所呈現之結果顯示，所研究之全部16種DVD-Ig蛋白質的摺疊二級結構主要由β元件組成。β元件比例的範圍為約85%至約97%，其類似於針對標準抗體所觀測者。此令人意外，因為DVD-Ig蛋白質為經工程改造之分子且假定具有比mAb低的β片百分比(雖然仍預期其含有β片作為其主要二級結構)。此等發現表明，二級結構組成並非DVD-Ig蛋白質之總體儲存穩定性低於抗體的因素。β元件比例之範圍為約85%至約97%。

實例23：離子強度及pH值對DVD-B調配物之第二維里係數(Virial Coefficient)的影響

第二維里係數(B_{22})為熱力學參數及溶液中蛋白質-蛋白質吸引力或互斥力之指標。正值指示互斥力且負值指示相互吸引力。互斥力一般轉化成良好長期儲存。根據以下等式，散射光強度與分子量及 B_{22} 有關。

$$\frac{Kc}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} + 2B_{22}c + B_{222}c^2 + \dots$$

其中K為光學常數且由以下給定：

$$K = \frac{[2\pi m \left(\frac{dn}{dc} \right)]^2}{N_A \lambda^4}$$

R_θ 為過量瑞利比(Rayleigh ratio) (由溶質散射之光的一種量度)， n 為溶劑折射率， dn/dc 為溶質之折射率增量， N_A 為亞佛加德羅常數(Avogadro's number)，且 λ 為入射光波長。因為對於多數稀釋溶液而言，高階維里係數值可忽略不計，所以使用以下等式(Debye)獲得第二維里係數。

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2B_{22}c$$

在Malvern Zetasizer Nano上量測散射強度。第二維里係數值均為正值且指示就此計算而言，DVD-Ig蛋白質起典型蛋白質分子的作用(至少在稀釋條件下)。所用緩衝液為乙酸鹽(pH 4.5)、組胺酸(pH 6)及Tris (pH 8)。1 mM離子強度溶液使用2 mM濃度之緩衝液且20 mM及100 mM離子強度溶液使用10 mM濃度之緩衝液。剩餘離子強度藉由氯化鈉維持。結果顯示於表33及表34中。第二維里係數值在pH 4.5及pH 6.0平均高於在pH 8.0，表明DVD-B在pH 4.5或pH 6.0儲存優於在pH 8.0儲存。此外，第二維里係數值在較低離子強度下較高，表明較低離子強度亦可與TNF-PGE2 DVD-Ig蛋白質之穩定性有關。

D_s 為分子在無限稀釋時之自擴散係數。 k_d 為描述溶液中分子之間的相互作用的參數。 k_d 之正值指示分子間斥力且反之亦然。

表45：DVD-B蛋白質在0 mM離子強度下之維里係數值

pH	$B_{22} \times 10^{-4}$ (mol mL/gm ²)	$B_{222} \times 10^{-2}$ (mol mL ² /gm ³)	$B_{2222} \times 10^{-1}$ (mol mL ³ /gm ⁴)	$B_{22222} \times 10^2$ (mol mL ⁴ /gm ⁵)	$M_w (\times 1000)$
6.0	136 ± 5.77	-273.8 ± 16.6	3376.1 ± 339	-221 ± 35.8	189 ± 14

表46：DVD-B蛋白質在多種條件下的第二維里係數

pH	離子強度 (mM)	$D_s \times 10^{-7}$ (cm ² /s) [*]	k_d (mL/gm) [†]	$B_{22} \times 10^{-4}$ (mol mL/gm ²) [‡]	$M_w (\times 1000)$ [§]
4.5	1	3.42 ± 0.04	434.90 ± 15.31	26.09 ± 0.82	195 ± 1
	20	3.66 ± 0.004	5.96 ± 0.32	5.08 ± 0.03	168 ± 2.89
	100	3.60 ± 0.03	-13.33 ± 0.88	3.09 ± 0.07	160 ± 3.38

6	1	3.41 ± 0.06	379.28 ± 51.34	14.71 ± 1.09	183 ± 0.57
	20	3.75 ± 0.02	-11.04 ± 1.37	3.37 ± 0.06	163 ± 2.35
	100	$3.70 \pm .002$	-23.05 ± 0.02	2.51 ± 0.19	170 ± 3.40
8	1	3.81 ± 0.01	-4.74 ± 0.06	3.50 ± 0.05	155 ± 0.78
	20	3.73 ± 0.02	-27.31 ± 0.29	2.14 ± 0.03	162 ± 5.08
	100	3.66 ± 0.03	-25.33 ± 0.90	2.34 ± 0.07	164 ± 4.59

如所提及，若 B_{22} 及 kD 為正號且量級較大，則其指示溶液中之DVD-Ig蛋白質之間存在強互斥力。此為DVD-Ig蛋白質液體調配物之長期儲存穩定性的理想條件，因為DVD-Ig蛋白質在溶液中彼此遭遇而形成聚集物的機率較低。上述資料表明，低離子強度及低pH值作為調配之一部分將使得長期DVD-Ig蛋白質穩定性大於具有高離子強度及高pH值之調配物。此外，因為離子強度及pH值對 B_{22} 值之作用較大，所以其表明靜電斥力通常構成 B_{22} 值之大部分。

就DVD-Ig蛋白質與抗體之比較而言，長期穩定性概況與抗體調配物相似的DVD-Ig蛋白質調配物可能更需要正 B_{22} 值。這是因為DVD-Ig蛋白質比抗體大且DVD-Ig蛋白質之硬球引起斥力(及 B_{22})更大。因此，若DVD-Ig蛋白質與抗體具有引起 B_{22} 之相同靜電斥力，則DVD-Ig蛋白質之 B_{22} 項正值更大，反映溶液中之蛋白質-蛋白質斥力程度相同。

實例24：DVD-Ig蛋白質之藥物動力學研究

以下實例描述多種DVD-Ig蛋白質之藥物動力學研究。

可變區域組合及取向影響血清穩定性

如圖2中所述，某些可變區域組合比其他組合使DVD-Ig蛋白質更穩定。圖2A描述呈兩種不同區域取向(亦即「外/內」及「內/外」)之某些DVD-Ig蛋白質的血清穩定性。舉例而言，DVD-Ig蛋白質TNF/SOST在「外/內」取向中具有約16%之高分子量(HMW)，但在反向取向中具有約75% HMW。區域取向構思闡明於圖2B中。圖2中之DVD-Ig蛋白質包括短/短連接子組合且為huIgG1同型。

活體外藥物動力學研究

向雄性史泊格多利大白鼠(Sprague-Dawley rat)給予4 mg/kg靜脈內單次劑量之後，評定多種生物治療劑之藥物動力學(PK)特性。收集整個28天研究期間的血液樣品。使用抗人類Ig捕捉抗體及 Sulfo-Tag 標記山羊抗人類IgG抗體(用於化學發光偵測)，使用MSD分析對血清樣品進行分析。藉由非隔室分析，使用WinNonlin軟體計算各動物之藥物動力學參數。

圖3描述使用大鼠進行藥物動力學研究的結果。研究檢查清除率(CL)與高分子量(HMW)聚集物活體外形成於大鼠血清中之 $T_{1/2}$ 之間的相關性。如圖3中所示，活體外HMW聚集物小於10%的DVD-Ig蛋白質很可能具有低(< 0.3毫升/小時/公斤)清除率及長(>10天)半衰期。離群值包括DVD 257及DVD 258。DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質識別大鼠目標，且PK受TMD影響。DVD 037 (VEGF/HER2；SEQ ID NO: 34及35)顯示較差活體外特性，但活體內PK良好。DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質之重鏈及輕鏈之胺基酸序列提供於表65之SEQ ID NO: 68及69中。

實例25：DVD-Ig蛋白質之黏度研究

以下實例描述例示性AS-DVD-Ig蛋白質(DVD-A)之黏度研究。

在Rheosense之m-VROC低容量黏度計(Redwood, CA)上量測黏度。m-VROC利用測試液體流經矩形狹縫時之壓降量測黏度。當測試液體經泵送流經流道時，量測離入口較大距離處之壓力。感測器之壓力相對於位置之直線圖與黏度成比例。

儀器預先經抽真空以使材料用量降至最低且隨後回收材料。因此在進行樣品量測之前，使用空氣清潔儀器。利用40微升/分鐘至200微升/分鐘之初始流動速率獲得所需壓差。壓力室飽和很快使黏度讀數穩定，且二十微升樣品達成穩定化作用。一旦儀器已填裝樣品，則小於5微升之額外樣品足以得到穩定的第二次讀數。因此總共小於三

十微升(<35微升)之樣品足以得到一式三份讀數。

亦在Anton Paar (X, X)之落球黏度計上量測所有樣品之黏度。黏度範圍2至70 cP之樣品使用1.8 mm毛細管，且最小黏度(小於2 cP)之樣品使用1.6 mm毛細管。儀器經預校準且在多種可能角度(70°、50°及/或40°)中之任一者下操作。

測定具有不同莫耳濃度(亦即0 mM至30 mM組胺酸)及pH值(亦即pH 4.8至pH 8.3)，具有多種DVD-A濃度之組胺酸調配物中之DVDA之黏度。量測結果提供於下表47至表49中。

表47：34 mg/ml DVD-A在多種pH值及組胺酸莫耳濃度下之黏度量測結果

DVDA 34 mg/ml					
Anton Paar黏度讀數(mPa.s.)					
	pH 4.8	pH 5.4	pH 6	pH 6.6	pH 8.3
0 Mm組胺酸	1.83	2.9	5.22	Na	na
5 Mm組胺酸	1.59	1.81	2.46	3.86	1.83
30 Mm組胺酸	1.33	1.71	2.03	3.5	1.97
Rheosense黏度量測結果					
	pH 4.8	pH 5.4	pH 6	pH 6.6	pH 8.3
0 Mm組胺酸					
1	3.07	4.11	6.03	Na	2.35
2	3.04	4.04	5.84	Na	2.36
3	2.93	4.15	6.08	Na	2.40
平均黏度	3.01	4.10	5.98	Na	2.37
5 Mm組胺酸					
1	1.58	1.73	2.56	3.87	2.22
2	1.52	1.71	2.55	3.87	2.12
3	1.59	1.72	2.53	3.86	2.13
平均黏度	1.56	1.72	2.55	3.86	2.16
30 Mm組胺酸					
1	1.37	1.57	1.88	3.34	2.84
2	1.39	1.58	1.91	3.37	2.93
3	1.33	1.58	1.86	3.50	2.73
平均黏度	1.36	1.58	1.88	3.40	2.83

表 48：15 mg/ml DVD-A 在 0 Mm 組胺酸存在下，在 pH 4.8 至 8.3 之黏度量測結果

DVDA 15 mg/ml 0 mM					
	pH 4.8	pH 5.4	pH 6	pH 6.6	pH 8.3
0 Mm 組胺酸					
1	1.66	1.30	1.28	Na	1.85
2	1.64	1.34	1.31	Na	1.82
3	1.64	1.30	1.29	Na	1.80
平均黏度	1.65	1.31	1.29	Na	1.82

表 49：不同濃度之 DVD-A 在不同 pH 值及組胺酸莫耳濃度下之黏度量測結果

DVDA					
		5mM		30mM	
		Anton Paar	Rheosense	Anton Paar	Rheosense
pH4.8 (95 mg/ml)	1	4.63	6.924	5.29	4.179
	2	4.67	6.925	5.3	4.241
	平均值	4.65	6.9245	5.295	4.21
Ph5.4 (77 mg/ml)	1	10.45	10.09	6.3	6.027
	2	10.5	10.1	6.29	6.016
	平均值	10.475	10.095	6.295	6.0215
pH6 (47.8 mg/ml)	1	6.23	5.721	3.643	3.34
	2	6.3	5.695	3.648	3.36
	平均值	6.265	5.708	3.6455	3.35
	5 mM		30 mM		

上文表 47 至表 49 中所述之結果顯示離子強度、pH 值及蛋白質濃度對 DVD-Ig 蛋白質溶液之黏度的影響。DVD-A (SEQ ID NO : 62 及 63) 為 AS-DVD-Ig 蛋白質且上述結果顯示黏度值可藉由調配方式調節，此調配方式可提供適合醫藥組合物及活體內使用的在高濃度可注射液體調配物。因為 DVD-Ig 蛋白質不僅具有比約 150 kD 之標準單株抗體高得多的約 200kD 分子量，而且其結構更複雜。因此，驚人的是 mAb 及 DVD-Ig 之黏度相對類似且即使在高濃度下亦低於約 10 cP。

實例 26：DVD-Ig 蛋白質之熱穩定性

以下實例描述檢查DVD-Ig蛋白質(包括例示性AS-DVD-Ig蛋白質及例示性LS-DVD-Ig蛋白質，相對於單株抗體，諸如阿達木單抗)之熱穩定性之三種不同測試之結果。

動態掃描螢光

研究使用Avacta之自動化高通量儀器Optim-1000 (York, UK)。研究使用9微升微立方陣列(MCA)。製備儲備樣品時，將3微升Sypro橙(Invitrogen, Cambridge, MA)添加至27微升樣品溶液中以便獲得1×最終濃度之染料。染料可以5000X商業產品獲得，但任何染料可為適合的。以60°C/小時之掃描速率獲得26°C至95°C之熱掃描。對基線之線性度進行擬合且其納入使 R^2 低於0.95的第一點(溫度)視為起始溫度。反覆研究證實起始溫度之偏差小於5%。

固有螢光

色胺酸螢光用於評估展開溫度。研究使用Hitachi之Hitachi FL-4500 (Tokyo, Japan)。使用水浴維持溫度。使用Omega Inc. (Stamford, CT)之熱電偶及溫度監測器CSi32監測光析管之溫度。使用VWR之前表面三角形石英光析管(MA)，因為此可使內部濾色效應降至最低且由此產生強發射信號。使用295 nm之激發波長。監測328至338 nm的發射。雖然在332 nm觀測到 $\lambda_{\max}$ ，但監測335 nm下之強度用於比較。以78°C/小時之掃描速率獲得30°C至70°C之熱掃描。對基線之線性度進行擬合且其納入使 R^2 低於0.95的第一點(溫度)視為起始溫度。反覆研究證實起始溫度之偏差小於5%。增大之掃描速率對起始溫度無顯著影響。

差示掃描熱量測定(DSC)

DSC用於表徵蛋白質在多種溶液條件下的熱力學穩定性。使用Microcal之自動化cap DSC儀器(Northampton, MA)。以60°C/小時之掃描速率獲得25°C至65°C之熱掃描。因為高濃度樣品中繼展開後之聚集

及沈澱可導致帽式DSC單元阻塞而變得相當難以清潔，所以所得掃描僅直至超出起始溫度 $\approx 5^{\circ}\text{C}$ 以防止任何此類情況發生。每次掃描之前，應用10分鐘之預掃描恆溫平衡。樣品掃描之後立即進行相應的緩衝掃描。重複掃描之間在起始溫度差異小於 2°C 。對基線之線性度進行擬合且其納入使 R^2 低於0.95的第一點(溫度)視為起始溫度。反覆研究證實起始溫度之偏差小於5%。

研究結果提供於表50中。

表 50：對DVD-Ig蛋白質與mAb進行比較之熱穩定性研究的結果

	固有螢光		非固有螢光		DSC	
	1 mg/mL	75 mg/mL	1 mg/mL	75 mg/mL	1 mg/mL	75 mg/mL
mAb1	66	64	63	57	59	57
mAb2	74	69	73	68	63	59
mAb3	65	62	65	63	59	55
mAb4	72	67	64	58	61	59
mAb5	71	64	66	61	59	56
IL12IL18	69	67	64	61	62	59
DVD-B TNF/PGE2	56	53	53	49	54	50

表50中所述之結果顯示蛋白質濃度對蛋白質溶液之熱穩定性的影響。DVD1 (IL12IL18)、AS DVD及DVD2 (在本文中亦稱為DVD-B)、LS-DVD-Ig蛋白質及其他mAb均顯示蛋白質濃度對蛋白質之熱穩定性僅具有微小影響。因此高濃度液體調配物之可行性可獨立於蛋白質濃度對蛋白質之熱穩定性的影響；然而，高濃度液體調配物呈現其他熟知類型的不穩定性，例如存放不穩定性。一般而言，如實例1至3中所述，DVD-Ig蛋白質具有比抗體低的解鏈溫度。在一些情況下，例如DVD1，觀測到類似解鏈溫度，但通常情況並非如此。

X. 抗DLL4/抗VEGF DVD-IG調配物(水性及凍乾)

實例27：抗DLL4/抗VEGF DVD-Ig蛋白質h1A11.1SL-Av之調配前表徵

在下列調配物及蛋白質濃度下，評估抗DLL4/抗VEGF DVD

(h1A11.1-SL-Av，表41)之儲存穩定性(5°C)及加速儲存穩定性(40°C)。藉由尺寸排阻層析法(SEC)評估穩定性且量化聚集物%、單體%、片段%及所回收物質總量。總體而言，調配物涵蓋5至7之pH值範圍及1.0至118 mg/ml之蛋白質濃度範圍。

在5°C及40°C溫度及在50 mg/ml、30 mg/ml及10 mg/ml之蛋白質濃度下，調配物為：15 mM乙酸鹽pH 5；15 mM磷酸鹽pH 7；30 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80，pH 5；30 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80，pH 6；PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)。所有調配物均含有0.02%疊氮化鈉以防止儲存期間的微生物生長。在5°C及40°C溫度及在60 mg/ml、50 mg/ml、30 mg/ml及10 mg/ml之蛋白質濃度下，調配物為15 mM組胺酸pH 6 (亦含有0.02%疊氮化鈉以防止儲存期間的微生物生長)。在5°C及在118 mg/ml之蛋白質濃度下，調配物為15 mM組胺酸pH 6 (亦含有0.02%疊氮化鈉以防止儲存期間的微生物生長)。在40°C及在1.0 mg/ml之蛋白質濃度下，調配物為10 mM檸檬酸鹽及10 mM磷酸鹽，pH值為5、6及7。過濾具有蛋白質之調配物以移除可能的微生物。

藉由使含有蛋白質之調配物經受四次至少20小時-80°C冷凍及30°C水浴解凍之循環來進行冷凍-解凍穩定性。測試冷凍解凍穩定性之調配物列舉於下文中。藉由SE-HPLC評估穩定性且量化聚集物%、單體%、片段%及所回收物質總量。調配物為15 mM組胺酸pH 6，60 mg/ml蛋白質(亦含有0.02%疊氮化鈉以防止微生物生長)；及10 mM檸檬酸鹽及10 mM磷酸鹽，pH值為5、6及7，及1.0 mg/ml蛋白質(過濾移除可能的微生物)。

最後，對10 mM檸檬酸鹽及10 mM磷酸鹽緩衝液中之蛋白質(pH值為5、6及7，1.0 mg/ml蛋白質)進行差示掃描熱量測定以量測熱穩定性。量化各蛋白質區域之起始展開溫度及中點展開溫度(T_m)。

表51：H1a11.1-SL-Av在40℃，在不同濃度及不同緩衝液、賦形劑及pH值下之加速穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	2.71	96.31	0.98	53058
50, 30, 10	T0	---	ace	5	2.89	96.08	1.03	48033
50, 30, 10	T0	---	his	6	2.81	96.23	0.96	46995
50, 30, 10	T0	---	phos	7	2.91	96.09	1.00	52571
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	2.54	96.50	0.96	50185
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	2.37	96.62	1.01	50771
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2.90	96.08	1.01	49170
50	T7d	40	ace	5	5.19	93.32	1.49	49028
30	T7d	40	ace	5	3.86	94.68	1.47	48171
10	T7d	40	ace	5	2.60	95.97	1.43	48379
50	T7d	40	his	6	5.25	93.46	1.29	47731
30	T7d	40	his	6	4.13	94.58	1.29	46684
10	T7d	40	his	6	2.73	95.84	1.42	46877
50	T7d	40	phos	7	9.02	89.52	1.46	53429
30	T7d	40	phos	7	6.11	92.40	1.49	51923
10	T7d	40	phos	7	3.94	94.57	1.49	53098
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	5.42	92.85	1.73	50373
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	4.07	94.06	1.87	48768
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	2.66	95.20	2.14	49396
50	T7d	40	his-suc-tw	6	3.44	95.02	1.54	50040
30	T7d	40	his-suc-tw	6	4.16	94.14	1.70	48715
10	T7d	40	his-suc-tw	6	2.86	95.24	1.90	49871
50	T7d	40	PBS	7	8.13	90.28	1.60	49207
30	T7d	40	PBS	7	5.82	92.55	1.63	48853
10	T7d	40	PBS	7	3.62	94.82	1.56	48166
50	T21d	40	ace	5	6.65	90.83	2.51	48536
30	T21d	40	ace	5	4.55	92.91	2.54	48520
10	T21d	40	ace	5	2.71	94.70	2.59	48395
50	T21d	40	his	6	7.01	90.71	2.27	46729
30	T21d	40	his	6	4.69	93.10	2.21	46687
10	T21d	40	his	6	2.77	94.93	2.30	46866
50	T21d	40	phos	7	13.39	83.83	2.78	52244
30	T21d	40	phos	7	9.38	87.76	2.86	53556
10	T21d	40	phos	7	4.77	92.32	2.91	52536
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	6.37	90.34	3.30	48268
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	4.27	91.91	3.82	47211
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	2.26	93.02	4.72	46322
50	T21d	40	his-suc-tw	6	6.84	89.82	3.34	47140
30	T21d	40	his-suc-tw	6	4.60	91.90	3.50	47416
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2.67	93.66	3.67	48166
50	T21d	40	PBS	7	12.13	84.81	3.06	49845
30	T21d	40	PBS	7	8.09	88.78	3.13	48108
10	T21d	40	PBS	7	4.20	92.63	3.17	48803

緩衝液符號(所有緩衝液均含有0.02%疊氮化鈉以防止微生物生長)：

ace = 15 mM乙酸鹽pH 5；**his** = 15 mM組胺酸pH 6；**phos** = 15 mM磷酸鹽pH 7

ace-suc-tw = 30 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

his-suc-tw = 30 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

PBS = 磷酸鹽緩衝鹽水

表52. H1a11.1-SL-Av在5°C，在不同濃度及不同緩衝液、賦形劑及pH值下之儲存穩定性(緩衝液符號與表53中相同)

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	2.71	96.31	0.98	53058
50, 30, 10	T0	---	ace	5	2.89	96.08	1.03	48033
50, 30, 10	T0	---	his	6	2.81	96.23	0.96	46995
50, 30, 10	T0	---	phos	7	2.91	96.09	1.00	52571
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	2.54	96.50	0.96	50185
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	2.37	96.62	1.01	50771
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2.90	96.08	1.01	49170
50	T7d	5	ace	5	2.96	95.99	1.05	49118
30	T7d	5	ace	5	2.74	96.21	1.06	48434
10	T7d	5	ace	5	2.62	96.23	1.15	48915
50	T7d	5	his	6	2.93	95.87	1.20	47967
30	T7d	5	his	6	2.75	96.06	1.19	47182
10	T7d	5	his	6	2.55	96.31	1.13	47395
50	T7d	5	phos	7	3.15	95.64	1.21	53843
30	T7d	5	phos	7	3.10	95.76	1.14	53372
10	T7d	5	phos	7	2.91	95.96	1.13	53269
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.75	96.13	1.12	50236
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.62	96.11	1.27	50026
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.56	96.18	1.26	49290
50	T7d	5	his-suc-tw	6	2.84	96.10	1.07	50129
30	T7d	5	his-suc-tw	6	2.58	96.19	1.23	49272
10	T7d	5	his-suc-tw	6	2.64	96.08	1.28	50926
50	T7d	5	PBS	7	3.26	95.59	1.15	49502
30	T7d	5	PBS	7	3.07	95.64	1.29	49724
10	T7d	5	PBS	7	2.83	95.87	1.29	49563
50	T21d	5	ace	5	2.57	95.76	1.67	49722
30	T21d	5	ace	5	2.37	96.03	1.60	48882
10	T21d	5	ace	5	2.22	96.09	1.69	49255
50	T21d	5	his	6	2.63	95.63	1.74	44884
30	T21d	5	his	6	2.42	95.95	1.62	47510

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
10	T21d	5	his	6	2.19	96.08	1.73	47015
50	T21d	5	phos	7	3.06	94.96	1.98	53449
30	T21d	5	phos	7	2.69	95.46	1.85	52938
10	T21d	5	phos	7	2.35	95.84	1.81	52703
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	2.25	95.76	1.99	50960
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	2.08	95.90	2.02	49042
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	1.97	95.84	2.19	49851
50	T21d	5	his-suc-tw	6	2.24	95.62	2.14	49983
30	T21d	5	his-suc-tw	6	2.09	95.86	2.05	48813
10	T21d	5	his-suc-tw	6	1.97	95.83	2.19	49984
50	T21d	5	PBS	7	2.84	95.07	2.09	50641
30	T21d	5	PBS	7	2.27	95.62	2.12	48441
10	T21d	5	PBS	7	1.99	95.94	2.07	48978
50	T10mo	5	his	6	8.05	91.04	0.91	45552
30	T10mo	5	his	6	5.81	93.29	0.90	46607
10	T10mo	5	his	6	3.62	95.46	0.92	46207
50	T10mo	5	his-suc-tw	6	8.08	90.26	1.67	45430
30	T10mo	5	his-suc-tw	6	5.98	92.43	1.58	42967
10	T10mo	5	his-suc-tw	6	3.95	94.25	1.80	42567

表 53：H1a11.1-SL-Av 在不同濃度及在不同緩衝液及 pH 值下下的在 5°C 之儲存穩定性，在 40°C 之加速穩定性及冷凍解凍穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間/FT	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
1	T0	---	cit-phos	5	7.07	92.14	0.80	46824
1	T8d	40	cit-phos	5	2.23	96.39	1.38	47090
1	T22d	40	cit-phos	5	7.10	89.62	3.28	47956
1	FT2	---	cit-phos	5	7.91	90.75	1.34	46502
1	FT4	---	cit-phos	5	7.41	92.18	0.41	52181
1	T0	---	cit-phos	6	7.17	92.33	0.50	45809
1	T8d	40	cit-phos	6	2.56	96.03	1.42	46783
1	T22d	40	cit-phos	6	5.79	91.73	2.48	47401
1	FT2	---	cit-phos	6	7.14	91.48	1.38	45256
1	FT4	---	cit-phos	6	7.09	92.56	0.34	45004
1	T0	---	cit-phos	7	6.82	92.67	0.51	47025
1	T8d	40	cit-phos	7	2.52	95.95	1.53	48080
1	T22d	40	cit-phos	7	5.52	91.58	2.90	48706
1	FT2	---	cit-phos	7	7.23	91.52	1.25	46732
1	FT4	---	cit-phos	7	7.15	92.49	0.36	46561
60及118	T0	---	his	6	8.03	91.15	0.82	43528
60	T7d	40	his	6	7.17	91.76	1.07	45333
60	T21d	40	his	6	15.77	82.13	2.10	44729
60	T7d	5	his	6	3.83	95.32	0.86	46774
60	T26d	5	his	6	7.14	92.56	0.30	63982

蛋白質濃度 (mg/ml)	時間 /FT	溫度 (°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
118	T5mo	5	his	6	12.82	86.65	0.53	55869
60	T5mo	5	his	6	9.46	90.03	0.51	64573
60	FT2	---	his	6	6.71	92.59	0.70	42259
60	FT4	---	his	6	6.33	93.62	0.05	41054

符號：

FT = 冷凍解凍

FT2 = 兩次冷凍及解凍循環之後的分析；-80°C 冷凍及30°C 水浴中解凍

FT4 = 四次冷凍及解凍循環之後的分析；-80°C 冷凍及30°C 水浴中解凍

cit-phos = 10 mM檸檬酸鹽及10 mM磷酸鹽

his = 15 mM組胺酸及0.02%疊氮化鈉(疊氮化物用於防止微生物生長)

表54. 1 mg/ml H1a11.1-SL-Av在不同pH值下、於10 mM檸檬酸鹽+ 10 mM磷酸鹽中之差示掃描熱量測定資料

pH	起始(°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tm4 (°C)
5	55	68.2	68.86	75.56	81.18
6	58	69.04	70.47	75.24	82.04
7	59	69.52	70.94	74.44	82.06

總體而言，表51至表54中之資料表明h1A11.1-SL-Av具有穩定單株抗體通常所觀測到之降解概況。高溫(40°C)下的聚集及片段化程度大於在較低溫度(5°C)下的聚集及片段化程度。

在5°C，儲存21天之後，聚集或片段化未出現明顯提高。在40°C，降解量高於穩定mAb通常所觀測到之彼等值。然而，降解量並未大到妨礙其進一步開發的程度。總體而言，此DVD-Ig蛋白質基於其穩定性定性為AS-DVD-Ig蛋白質。

實例28：針對抗DLL4/抗VEGF DVD-Ig蛋白質之調配物選擇

材料及方法。評估表55中所列之五種調配物中之抗DLL4/抗

VEGF DVD-Ig h1A11.1-SL-Av蛋白質之穩定性。所有調配物均於15 mM組胺酸緩衝液中製備。調配物F1至F4是以50 mg/ml蛋白質濃度製備。在此等調配物中，pH值範圍為5.5至6.0，聚山梨醇酯80濃度範圍為0至0.05% w/v，蔗糖濃度範圍為0至7.5% w/v，且精胺酸濃度範圍為0至1% w/v。調配物F4於無任何穩定劑之pH 6.0之15 mM組胺酸緩衝液中製備且充當50 mg/ml液體調配物穩定性評定之研究對照。另外，一種調配物是在pH 6.0以25 mg/ml蛋白質濃度製備(調配物F5)。在此調配物中，聚山梨醇酯80濃度為0.025% w/v且蔗糖濃度為3.8% w/v。

表55.調配物組成描述

調配物身分	抗DLL4/抗VEGF DVD-Ig 濃度(mg/mL)	緩衝液	pH	聚山梨醇酯80 (Tween 80) (% w/v)	蔗糖(% w/v)	精胺酸 (% w/v)
F1	50	15 mM組胺酸	6.0	0.05	7.5	0
F2	50	15 mM組胺酸	5.5	0.05	7.5	0
F3	50	15 mM組胺酸	6.0	0.05	7.5	1
F4	50	15 mM組胺酸	6.0	0	0	0
F5	25	15 mM組胺酸	6.0	0.025	3.8	0

在上述調配物中，選擇15 mM組胺酸緩衝液，因為其提供足以維持目標調配物pH值的緩衝能力。蔗糖作為針對冷凍-解凍應力(冷凍保護劑)及凍乾過程誘導應力(低溫保護劑)之穩定劑加以評估。添加聚山梨醇酯80 (界面活性劑)及精胺酸以潛在地使調配物穩定化而防止聚集及微粒形成。

冷凍-解凍及液體調配物穩定性測試。三次冷凍/解凍(F/T)應力循環之後，且在-80℃、5℃、25℃及40℃儲存1個月之後，評估所有液體調配物之穩定性。藉由一組分析性分析測試穩定性，包括目測外觀、

藉由尺寸排阻層析法(SE-HPLC)所得之聚集物%、藉由陽離子交換層析(CEX-HPLC)所得之電荷異質性、藉由還原 SDS 毛細管電泳(CE-SDS)進行之片段化、藉由微流成像(MFI)所得之亞可見顆粒及使用 ELISA 所得之 DLL4/VEGF 結合效能。

冷凍/解凍及液體穩定性測試結果提供於表 56 中。

表 56. 冷凍解凍及液體調配物穩定性結果

調配物身分	時間點	目測外觀	藉由SEC-HPLC 所得之聚集物%	CEX-HPLC			純度%	藉由MFI所得之亞可見顆粒			藉由ELISA所得 之結合效能	
				酸性區 域%	主要物 質峰%	鹼性區 域%		≥2 µm/mL	≥10 µm/mL	≥25 µm/mL	DLL4	VEGF
F1	T0	EFVP	1.0	21.6	61.7	16.7	97.7	3333	5	0	93	113
	3FT	EFVP	1.1	21.5	61.8	16.6	97.7	2388	50	5	NP	NP
	1M , -80°C	EFVP	1.1	21.0	62.1	16.8	97.8	1364	15	5	NP	NP
	1M , 5°C	EFVP	2.0	21.2	62.4	16.3	97.8	1064	0	0	NP	NP
	1M , 25°C	EFVP	4.3	23.5	62.2	14.2	97.4	1559	5	5	NP	NP
	1M , 40°C	EFVP	7.2	35.8	43.0	21.2	95.0	1219	15	0	94	104
F2	T0	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.8	97.5	1589	15	0	93	113
	3FT	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.9	97.6	435	5	5	NP	NP
	1M , -80°C	EFVP	1.4	21.0	62.0	17.0	97.8	315	0	0	NP	NP
	1M , 5°C	EFVP	2.1	20.9	62.3	16.8	97.8	230	5	5	NP	NP
	1M , 25°C	EFVP	4.4	22.8	61.6	15.6	97.4	1149	5	0	NP	NP
	1M , 40°C	EFVP	7.9	33.8	40.9	25.3	95.1	655	5	0	95	97
F3	T0	EFVP	1.1	21.5	61.7	16.7	97.6	784	0	0	93	113
	3FT	EFVP	1.1	21.3	61.8	16.9	97.5	490	10	0	NP	NP
	1M , -80°C	EFVP	1.1	21.0	61.9	17.1	97.9	250	0	0	NP	NP
	1M , 5°C	EFVP	2.0	20.8	62.0	17.2	97.8	225	5	0	NP	NP
	1M , 25°C	EFVP	4.9	21.5	58.3	20.2	97.3	834	10	0	NP	NP
	1M , 40°C	EFVP	11.3	32.1	42.3	25.6	95.0	1464	5	0	97	101
F4	T0	TMTC	1.2	21.6	61.8	16.6	97.4	23707	370	5	93	113
	3FT	TMTC	1.5	21.4	61.8	16.8	97.4	105467	5906	30	NP	NP
	1M , -80°C	TMTC	1.2	21.1	62.0	16.9	97.8	42024	1329	60	NP	NP
	1M , 5°C	EFVP	2.0	21.3	62.3	16.5	97.8	1189	0	0	NP	NP
	1M , 25°C	EFVP	4.5	23.5	61.8	14.7	97.2	89299	3053	165	NP	NP
	1M , 40°C	EFVP	7.7	34.9	44.2	20.9	94.8	61754	5051	670	101	97

調配物身分	時間點	目測外觀	藉由SEC-HPLC 所得之聚集物%	CEX-HPLC			純度%	藉由MFI所得之亞可見顆粒			藉由ELISA所得 之結合效能	
				酸性區 域%	主要物 質峰%	鹼性區 域%		≥ 2 µm/mL	≥ 10 µm/mL	≥ 25 µm/mL	DLL4	VEGF
F5	T0	EFVP	0.9	21.6	61.6	16.7	97.7	2808	5	5	93	113
	3FT	EFVP	1.2	21.5	61.8	16.8	97.6	1949	0	0	NP	NP
	1M , -80°C	EFVP	1.1	21.0	62.2	16.8	97.8	270	5	0	NP	NP
	1M , 5°C	EFVP	1.5	21.2	61.9	16.8	97.8	709	10	0	NP	NP
	1M , 25°C	EFVP	2.6	23.5	62.0	14.6	97.2	944	15	0	NP	NP
	1M , 40°C	EFVP	3.9	37.0	44.4	18.6	95.0	974	20	0	92	95

符號：EFVP：基本上不含可見顆粒，TMTC：不計其數，NP：未執行

如上述表所示，冷凍解凍應力導致未用任何穩定劑(例如聚山梨醇酯80、蔗糖及精胺酸)調配之調配物F4中形成可見顆粒及顯著較高之亞可見顆粒計數。相對於其他調配物，此調配物在25℃及40℃儲存1個月之後亦顯示較高亞可見顆粒計數之傾向。相對於50 mg/mL調配物，具有25 mg/mL蛋白質濃度之調配物F5在5℃、25℃及40℃儲存1個月期間內顯示顯著較低之聚集。

凍乾調配物穩定性測試。凍乾調配物之後亦評估所選調配物之穩定性。評定所有含蔗糖調配物(F1、F2、F3及F5)之凍乾藥物產物穩定性。在55℃儲存2週之後評定穩定性。藉由一組分析性分析測試穩定性，包括目測外觀(復原之前及之後)、復原時間、藉由尺寸排阻層析法(SE-HPLC)所得之聚集物%、藉由陽離子交換層析(CEX-HPLC)所得之電荷異質性、藉由還原SDS毛細管電泳(CE-SDS)進行之片段化、藉由微流成像(MFI)所得之亞可見顆粒，及使用卡爾費歇爾滴定(Karl Fischer titration)所得之水含量。

凍乾調配物穩定性測試結果提供於表57中。所有評估調配物之復原時間為約1分鐘。觀測到所有調配物在55℃之應力儲存條件下的聚集(藉由SEC)及鹼性區域%(藉由CEX)稍微增加。觀測到所有其他所量測產物穩定性特徵出現極小變化。

表 57.凍乾調配物穩定性結果

調配物身分	時間	目測外觀		藉由SEC-HPLC所得之聚集物%	CEX-HPLC			藉由RCE-SDS所得之純度%	藉由MFI所得之亞可見顆粒數		
		復原之前	復原之後		酸性區域%	主要物質峰%	鹼性區域%		≥ 2 μm/mL	≥ 10 μm/mL	≥ 25 μm/mL
F1	T0	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.1	21.3	61.9	16.8	97.6	749	20	10
	2週，55℃	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.6	20.6	58.1	21.3	97.5	1639	15	0
F2	T0	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.3	21.2	61.8	17.0	97.6	1254	15	0
	2 週，55℃	白色至灰白色餅狀	EFVP	2.0	20.4	57.8	21.8	97.6	1609	10	0
F3	T0	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.1	21.2	61.9	16.9	97.6	719	5	0
	2週，55℃	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.4	20.8	59.5	19.8	97.5	475	10	5
F5	T0	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.0	21.3	61.8	16.9	97.5	844	35	5
	2週，55℃	白色至灰白色餅狀	EFVP	1.5	20.5	58.0	21.5	97.7	270	5	0

符號：EFVP =基本上不含可見顆粒；NP =未執行

抗DLL4/抗VEGF DVD-Ig蛋白質H1A11.1-SL-Av之序列闡明於表58中(實例28及29中所述之DVD-Ig蛋白質)。

表58：DVD h1A11.1-SL-Av之全長序列

名稱	序列
h1A11.1-SL-Av輕鏈	12345678901234567890123456789012345678901234567890 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPS <u>VFIFPP</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS RFGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS <u>VFIFPP</u> SDEQLKSGTASVVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 28)
h1A11.1-SL-Av重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN FPM AWVRQAPGKGLEWVATIS <u>SSDGTYY</u> RDSVKGRFTISR DN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGYIN SPFAYWGQ TLTVSS <u>AS</u> <u>TKGPEV</u> QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQ TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK TH TCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA TK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29)

表58提供DVD h1A11.1-SL-Av之全長重鏈及輕鏈序列。連接子序列加有下劃線，而CDR及恆定區序列為粗體。

實例29：第二抗DLL4/抗VEGF DVD-Ig蛋白質(h1A11.1-LS-Av)之調配前擴展表徵

對抗DLL4/抗VEGF DVD-Ig蛋白質進行調配前擴展表徵，以探究不同調配物條件如何影響DVD-Ig蛋白質之穩定性。h1A11.1-LS-Av之資料呈現於表59及表60中。在下列調配物及蛋白質濃度下，評估DVD-Ig蛋白質之儲存穩定性(5℃)及加速穩定性(40℃)。藉由SEC評估穩定性且量化聚集物%、單體%、片段%及所回收物質總量。總體而言，調配物涵蓋5至7之pH值範圍及10至50 mg/ml之蛋白質濃度範圍。

在5℃及40℃溫度及在50 mg/ml、30 mg/ml及10 mg/ml濃度下，評估以下調配物：15 mM乙酸鹽pH 5；15 mM組胺酸pH 6，15 mM磷酸鹽pH 7，30 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80，pH 5；30 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80，pH 6；及PBS (磷酸

鹽緩衝鹽水)。所有調配物均含有0.02%疊氮化鈉以防止儲存期間的微生物生長。

表59. h1A11.1-LS-Av在40°C之加速穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	0.21	98.42	1.36	56054
50, 30, 10	T0	---	ace	5	0.28	98.41	1.31	56381
50, 30, 10	T0	---	his	6	0.46	98.23	1.31	54316
50, 30, 10	T0	---	phos	7	0.74	97.86	1.40	53212
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	0.24	98.16	1.60	56244
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	0.30	98.11	1.59	54076
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	0.52	98.05	1.43	50085
50	T7d	40	ace	5	1.63	96.74	1.63	55563
30	T7d	40	ace	5	1.13	97.24	1.62	55194
10	T7d	40	ace	5	0.84	97.49	1.67	55029
50	T7d	40	his	6	2.00	96.62	1.38	53566
30	T7d	40	his	6	1.17	97.46	1.38	52443
10	T7d	40	his	6	0.60	98.00	1.40	53812
50	T7d	40	phos	7	4.31	94.02	1.67	52934
30	T7d	40	phos	7	2.85	95.46	1.69	52663
10	T7d	40	phos	7	1.20	97.11	1.69	52411
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	1.10	96.23	2.66	54837
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	0.77	96.40	2.83	52474
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	0.43	96.39	3.17	50855
50	T7d	40	his-suc-tw	6	1.69	96.27	2.05	53017
30	T7d	40	his-suc-tw	6	1.14	96.84	2.02	52153
10	T7d	40	his-suc-tw	6	0.59	97.30	2.11	52208
50	T7d	40	PBS	7	2.77	95.30	1.93	51623
30	T7d	40	PBS	7	1.73	96.28	1.99	49973
10	T7d	40	PBS	7	0.78	97.25	1.97	50851
50	T21d	40	ace	5	3.66	94.30	2.04	55920
30	T21d	40	ace	5	2.56	95.33	2.10	54188
10	T21d	40	ace	5	1.85	96.00	2.15	55213
50	T21d	40	his	6	4.14	94.28	1.58	54807
30	T21d	40	his	6	2.67	95.79	1.54	53071
10	T21d	40	his	6	1.59	96.82	1.58	54053
50	T21d	40	phos	7	8.52	89.32	2.16	53273
30	T21d	40	phos	7	5.58	92.54	1.89	53162
10	T21d	40	phos	7	3.01	94.89	2.10	52747
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	4.12	93.78	2.10	56278
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	2.93	94.94	2.13	55481
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	1.99	95.75	2.26	54696
50	T21d	40	his-suc-tw	6	4.94	93.21	1.85	54034
30	T21d	40	his-suc-tw	6	n/a	n/a	n/a	n/a
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2.00	96.30	1.70	52686
50	T21d	40	PBS	7	8.44	89.65	1.90	51697
30	T21d	40	PBS	7	5.54	92.43	2.03	50282

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物 %	單體%	片段%	總面積
10	T21d	40	PBS	7	2.89	95.05	2.06	51580

緩衝液符號(所有緩衝液含有0.02%疊氮化鈉以防止微生物生長):**ace** = 15 mM乙酸鹽pH 5 ; **his** = 15 mM組胺酸pH 6 ; **phos** = 15 mM磷酸鹽pH 7 ; **ace-suc-tw** = 30 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗糖、0.02%Tween 80 ; **his-suc-tw** = 30 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02%Tween 80 ; **PBS** =磷酸鹽緩衝鹽水

表60. h1A11.1-LS-Av在5°C之儲存穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物 %	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	0.21	98.42	1.36	56054
50, 30, 10	T0	---	ace	5	0.28	98.41	1.31	56381
50, 30, 10	T0	---	his	6	0.46	98.23	1.31	54316
50, 30, 10	T0	---	phos	7	0.74	97.86	1.40	53212
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	0.24	98.16	1.60	56244
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	0.30	98.11	1.59	54076
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	0.52	98.05	1.43	50085
50	T7d	5	ace	5	0.18	98.17	1.64	57599
30	T7d	5	ace	5	0.16	98.21	1.64	55889
10	T7d	5	ace	5	0.13	98.17	1.70	53289
50	T7d	5	his	6	0.18	98.14	1.68	55742
30	T7d	5	his	6	0.12	98.06	1.82	53603
10	T7d	5	his	6	0.13	98.07	1.80	53505
50	T7d	5	phos	7	0.23	97.72	2.05	54355
30	T7d	5	phos	7	0.18	97.77	2.04	53561
10	T7d	5	phos	7	0.13	97.72	2.15	53151
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	0.09	97.40	2.51	57158
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	0.08	97.43	2.49	55025
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	0.08	97.34	2.58	53882
50	T7d	5	his-suc-tw	6	0.10	97.48	2.43	55272
30	T7d	5	his-suc-tw	6	0.08	97.63	2.29	52763
10	T7d	5	his-suc-tw	6	0.05	97.41	2.53	52903
50	T7d	5	PBS	7	0.12	97.31	2.58	51698
30	T7d	5	PBS	7	0.09	97.24	2.67	50144
10	T7d	5	PBS	7	0.08	97.28	2.64	50428
50	T21d	5	ace	5	0.87	98.45	0.68	57706
30	T21d	5	ace	5	0.80	98.55	0.65	56566
10	T21d	5	ace	5	0.83	98.47	0.70	54226
50	T21d	5	his	6	1.05	98.29	0.66	55911
30	T21d	5	his	6	0.92	98.40	0.68	54225
10	T21d	5	his	6	0.90	98.41	0.70	54128
50	T21d	5	phos	7	1.25	98.09	0.66	54980
30	T21d	5	phos	7	1.20	98.11	0.69	53903

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
10	T21d	5	phos	7	1.01	98.29	0.69	53271
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	0.92	98.36	0.72	61574
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	0.89	98.39	0.72	55532
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	0.83	98.46	0.71	55841
50	T21d	5	his-suc-tw	6	1.00	98.27	0.73	55484
30	T21d	5	his-suc-tw	6	0.92	98.37	0.70	53335
10	T21d	5	his-suc-tw	6	0.82	98.49	0.69	53736
50	T21d	5	PBS	7	1.49	97.79	0.71	52405
30	T21d	5	PBS	7	1.29	98.02	0.70	51284
10	T21d	5	PBS	7	1.12	98.18	0.70	51377

表59中之緩衝液符號與表60中相同。

實例 30：其他 DLL4-VEGF DVD-Ig 蛋白質 h1A11.1.A6-LS-Av 及 h1A11.1.A6-SL-Av之調配物研究

對其他DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質進行調配前擴展表徵以探究不同調配物條件如何影響穩定性。h1A11.1.A6-LS-Av及h1A11.1.A6-SL-Av DLL4/VEGF DVD-Ig蛋白質之資料呈現於下文中。此等DVD-Ig蛋白質證明是不穩定的且未通過被認為是AS-DVD-Ig蛋白質的篩選標準。

在下列調配物及蛋白質濃度下，評估h1A11.1.A6-LS-Av及h1A11.1.A6-SL-Av之儲存穩定性(5°C)及加速穩定性(40°C)。藉由SEC評估穩定性且量化聚集物%、單體%、片段%及所回收物質總量。總體而言，調配物涵蓋5至7之pH值範圍及10至50 mg/ml之蛋白質濃度範圍。

在5°C及40°C溫度及在50 mg/ml、30 mg/ml及10 mg/ml濃度下，測試以下條件：15 mM乙酸鹽pH 5；15 mM組胺酸pH 6；15 mM磷酸鹽pH 7；30 mM乙酸鹽，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80，pH 5；30 mM組胺酸，80 mg/ml蔗糖，0.02%Tween 80，pH 6；及PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)。所有調配物含有0.02%疊氮化鈉以防止儲存期間的微生物生長。

總體而言，表61至63中所提供之資料表明，兩種DVD-Ig蛋白質具有穩定單株抗體未觀測到之非典型降解概況。在5°C的聚集速率實際上大於在40°C之聚集速率。

在5°C，儲存21天之後，聚集快速提高。在40°C，降解量亦增大，但不以在5°C所觀測到之速率降解。在兩種情況下，聚集皆與濃度有關。

總體而言，此等DVD-Ig蛋白質根據其5°C不穩定性而未通過篩選且為非AS-DVD-Ig蛋白質之實例。

表61. H1a11.1.A6-LS-Av在40°C、在不同濃度及在不同緩衝液、賦形劑及pH值下之加速穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	0.66	98.64	0.70	48425
50, 30, 10	T0	---	ace	5	1.24	98.05	0.72	50944
50, 30, 10	T0	---	his	6	1.49	97.74	0.76	46462
50, 30, 10	T0	---	phos	7	1.76	97.67	0.58	43322
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	1.66	97.69	0.65	57038
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	1.62	97.87	0.52	54299
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2.22	97.25	0.53	48116
50	T7d	40	ace	5	4.40	94.52	1.08	43246
30	T7d	40	ace	5	2.76	96.17	1.08	46266
10	T7d	40	ace	5	1.54	97.41	1.05	52178
50	T7d	40	his	6	5.11	94.02	0.87	50471
30	T7d	40	his	6	3.17	95.97	0.87	40875
10	T7d	40	his	6	1.60	97.52	0.88	48759
50	T7d	40	phos	7	12.24	86.69	1.07	44327
30	T7d	40	phos	7	7.81	91.09	1.11	42284
10	T7d	40	phos	7	3.46	95.42	1.12	44023
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	5.46	93.48	1.07	63100
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	3.42	95.55	1.03	59243
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	1.83	97.03	1.14	60361
50	T7d	40	his-suc-tw	6	4.90	94.14	0.96	56706
30	T7d	40	his-suc-tw	6	3.65	95.50	0.84	53538
10	T7d	40	his-suc-tw	6	1.78	97.31	0.91	55447
50	T7d	40	PBS	7	14.78	84.08	1.14	58511
30	T7d	40	PBS	7	9.20	89.56	1.24	46917
10	T7d	40	PBS	7	4.08	94.73	1.19	49978
50	T21d	40	ace	5	5.58	92.75	1.67	53248
30	T21d	40	ace	5	3.59	94.67	1.74	51038
10	T21d	40	ace	5	1.90	96.38	1.72	50617

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
50	T21d	40	his	6	6.25	92.37	1.37	46908
30	T21d	40	his	6	3.82	94.77	1.41	46075
10	T21d	40	his	6	1.93	96.61	1.47	47827
50	T21d	40	phos	7	13.12	84.98	1.90	40311
30	T21d	40	phos	7	9.11	88.98	1.91	42037
10	T21d	40	phos	7	4.05	93.96	1.99	43009
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	6.45	91.73	1.82	56752
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	4.21	93.92	1.87	56330
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	2.11	95.88	2.00	57757
50	T21d	40	his-suc-tw	6	6.69	91.83	1.49	54091
30	T21d	40	his-suc-tw	6	4.22	94.30	1.48	52932
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2.09	96.45	1.47	54118
50	T21d	40	PBS	7	15.74	82.23	2.03	52080
30	T21d	40	PBS	7	9.98	87.82	2.19	47188
10	T21d	40	PBS	7	4.71	93.04	2.25	47400

緩衝液符號(所有緩衝液均含有0.02%疊氮化鈉以防止微生物生長)：

ace = 15 mM乙酸鹽pH 5；**his** = 15 mM組胺酸pH 6；**phos** = 15 mM磷酸鹽pH 7

ace-suc-tw = 30 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

his-suc-tw = 30 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

PBS = 磷酸鹽緩衝鹽水

表62. H1a11.1.A6-LS-Av在5°C、在不同濃度及在不同緩衝液、賦形劑及pH值之儲存穩定性(緩衝液符號與表63中相同)

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	0.66	98.64	0.70	48425
50, 30, 10	T0	---	ace	5	1.24	98.05	0.72	50944
50, 30, 10	T0	---	his	6	1.49	97.74	0.76	46462
50, 30, 10	T0	---	phos	7	1.76	97.67	0.58	43322
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	1.66	97.69	0.65	57038
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	1.62	97.87	0.52	54299
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2.22	97.25	0.53	48116
50	T7d	5	ace	5	4.68	94.74	0.58	54446
30	T7d	5	ace	5	2.77	96.62	0.62	51286
10	T7d	5	ace	5	1.75	97.62	0.63	51444
50	T7d	5	his	6	7.46	91.88	0.66	46683
30	T7d	5	his	6	4.83	94.49	0.68	46282
10	T7d	5	his	6	2.36	96.95	0.69	47844

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
50	T7d	5	phos	7	1.84	97.46	0.71	34008
30	T7d	5	phos	7	1.89	97.48	0.63	36992
10	T7d	5	phos	7	2.05	97.30	0.65	41962
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	4.74	94.65	0.61	57937
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	N/A	N/A	N/A	N/A
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	1.95	97.41	0.64	58618
50	T7d	5	his-suc-tw	6	7.97	91.45	0.59	54735
30	T7d	5	his-suc-tw	6	4.85	94.49	0.66	53379
10	T7d	5	his-suc-tw	6	2.34	97.01	0.65	54187
50	T7d	5	PBS	7	5.68	93.65	0.67	46544
30	T7d	5	PBS	7	5.20	94.13	0.67	45219
10	T7d	5	PBS	7	3.56	95.76	0.68	47653
50	T21d	5	ace	5	9.33	89.97	0.70	52020
30	T21d	5	ace	5	4.25	95.04	0.70	51223
10	T21d	5	ace	5	1.95	97.36	0.69	50950
50	T21d	5	his	6	19.35	79.71	0.94	44105
30	T21d	5	his	6	9.91	89.29	0.80	46096
10	T21d	5	his	6	3.11	96.15	0.73	47777
50	T21d	5	phos	7	1.65	97.49	0.86	25059
30	T21d	5	phos	7	1.49	97.75	0.76	29723
10	T21d	5	phos	7	2.00	97.09	0.90	38517
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	9.41	89.79	0.79	56438
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	4.72	94.50	0.79	56230
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	2.13	97.01	0.86	58579
50	T21d	5	his-suc-tw	6	20.57	78.32	1.11	53114
30	T21d	5	his-suc-tw	6	10.17	88.99	0.85	53155
10	T21d	5	his-suc-tw	6	3.20	95.94	0.86	54028
50	T21d	5	PBS	7	5.65	93.38	0.98	34294
30	T21d	5	PBS	7	2.99	96.04	0.96	36457
10	T21d	5	PBS	7	5.14	93.95	0.91	46566

表 63. H1a11.1.A6-SL-Av在40°C、在不同濃度及在不同緩衝液、賦形劑及pH值之加速穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	1.19	97.75	1.06	58988
50, 30, 10	T0	---	ace	5	1.23	97.85	0.92	47138
50, 30, 10	T0	---	his	6	1.30	97.84	0.87	44711
3.4	T0	---	phos	7	0.86	98.00	1.14	57373
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	1.30	97.85	0.85	52129
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	1.28	97.85	0.87	47563
6.6	T0	---	PBS	7	1.35	97.76	0.89	71146
50	T7d	40	ace	5	7.66	90.88	1.46	48331
30	T7d	40	ace	5	4.05	94.43	1.52	45731
10	T7d	40	ace	5	1.45	97.05	1.51	47455
50	T7d	40	his	6	8.68	90.23	1.09	45897
30	T7d	40	his	6	4.74	94.15	1.11	44807

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
10	T7d	40	his	6	1.62	97.07	1.31	45567
3.4	T7d	40	phos	7	2.04	96.51	1.45	56002
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	9.10	89.27	1.62	52696
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	5.23	93.14	1.64	50591
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	1.91	96.09	2.00	51790
50	T7d	40	his-suc-tw	6	8.55	90.18	1.27	48458
30	T7d	40	his-suc-tw	6	4.82	93.19	1.99	46963
10	T7d	40	his-suc-tw	6	1.78	96.78	1.45	46676
6.6	T7d	40	PBS	7	4.53	93.83	1.64	70277
50	T21d	40	ace	5	8.27	89.20	2.53	47139
30	T21d	40	ace	5	4.41	93.03	2.56	45779
10	T21d	40	ace	5	1.60	95.68	2.72	46794
50	T21d	40	his	6	9.26	88.56	2.18	44423
30	T21d	40	his	6	5.19	92.86	1.96	43874
10	T21d	40	his	6	1.74	95.71	2.55	45249
3.4	T21d	40	phos	7	2.43	95.14	2.42	54476
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	9.45	87.66	2.89	51846
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	5.35	91.28	3.37	50456
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	1.94	94.29	3.78	50414
50	T21d	40	his-suc-tw	6	8.72	89.02	2.26	46410
30	T21d	40	his-suc-tw	6	5.08	92.63	2.29	43210
10	T21d	40	his-suc-tw	6	1.95	95.68	2.37	46539
6.6	T21d	40	PBS	7	4.71	92.43	2.86	68811

緩衝液符號(所有緩衝液均含有0.02%疊氮化鈉以防止微生物生長)：

ace = 15 mM乙酸鹽pH 5；**his** = 15 mM組胺酸pH 6；**phos** = 15 mM磷酸鹽pH 7

ace-suc-tw = 30 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

his-suc-tw = 30 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

PBS = 磷酸鹽緩衝鹽水

表64. H1a11.1.A6-SL-Av在5°C、在不同濃度及在不同緩衝液、賦形劑及pH值中之儲存穩定性

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
---	透析前	---	---	---	1.19	97.75	1.06	58988
50, 30, 10	T0	---	ace	5	1.23	97.85	0.92	47138
50, 30, 10	T0	---	his	6	1.30	97.84	0.87	44711
3.4	T0	---	phos	7	0.86	98.00	1.14	57373
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	1.30	97.85	0.85	52129

蛋白質濃度(mg/ml)	時間	溫度(°C)	緩衝液	pH	聚集物%	單體%	片段%	總面積
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	1.28	97.85	0.87	47563
6.6	T0	---	PBS	7	1.35	97.76	0.89	71146
50	T7d	5	ace	5	3.52	95.40	1.08	46507
30	T7d	5	ace	5	2.35	96.55	1.10	40267
10	T7d	5	ace	5	1.46	97.48	1.07	47761
50	T7d	5	his	6	3.48	95.24	1.27	46306
30	T7d	5	his	6	3.63	95.34	1.03	46581
10	T7d	5	his	6	2.01	97.01	0.98	45843
3.4	T7d	5	phos	7	1.42	97.41	1.17	52150
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	3.97	94.99	1.04	53439
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.65	96.35	1.00	52119
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	1.60	97.23	1.17	52681
50	T7d	5	his-suc-tw	6	4.81	94.10	1.09	48136
30	T7d	5	his-suc-tw	6	3.38	95.49	1.13	48266
10	T7d	5	his-suc-tw	6	1.88	96.90	1.22	47966
6.6	T7d	5	PBS	7	2.25	96.78	0.97	68563
50	T21d	5	ace	5	7.82	92.06	0.11	47402
30	T21d	5	ace	5	4.22	95.68	0.10	45736
10	T21d	5	ace	5	1.77	98.13	0.09	47900
50	T21d	5	his	6	7.36	92.48	0.17	47111
30	T21d	5	his	6	6.51	93.34	0.15	43911
10	T21d	5	his	6	2.92	96.98	0.10	45446
3.4	T21d	5	phos	7	0.05	99.53	0.42	45856
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	9.13	90.73	0.14	52424
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	4.79	95.07	0.15	51575
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	1.98	97.87	0.15	51870
50	T21d	5	his-suc-tw	6	9.50	90.30	0.20	46588
30	T21d	5	his-suc-tw	6	6.20	93.64	0.16	46023
10	T21d	5	his-suc-tw	6	2.61	97.27	0.12	47285
6.6	T21d	5	PBS	7	3.12	96.76	0.13	62856

緩衝液符號(所有緩衝液均含有0.02%疊氮化鈉以防止微生物生長)：

ace = 15 mM乙酸鹽pH 5；**his** = 15 mM組胺酸pH 6；**phos** = 15 mM磷酸鹽pH 7

ace-suc-tw = 30 mM乙酸鹽、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

his-suc-tw = 30 mM組胺酸、80 mg/ml蔗糖、0.02% Tw80

PBS = 磷酸鹽緩衝鹽水

總體而言，表61至表64中之資料表明，兩種DVD-Ig蛋白質具有穩定單株抗體未觀測到之非典型降解概況。在5°C的聚集速率實際上

大於在40℃的聚集速率。在5℃，儲存21天之後，聚集快速提高。在40℃，降解量亦增大，但不以在5℃所觀測到之速率降解。在兩種情況下，聚集皆與濃度有關。總體而言，此等DVD-Ig蛋白質基元其5℃不穩定性而不定性為AS-DVD-Ig蛋白質且被認為是非水性穩定的。

序列

本文所述之其他DVD-Ig蛋白質之重鏈及輕鏈之胺基酸序列提供於下表65中。連接子序列加有下劃線，而CDR序列為粗體。下文「L」表示輕鏈，且下文「H」表示重鏈。

表65：DVD-Ig蛋白質序列

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
DVD005H CD20/CD80	AB001 VH	AB007 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCAR STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS AASTKGP QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGGSIS GGY GWGWIRQPPGKGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVTIST DTSKNQFSLKLNMTAADTAVYYCVR DRLF SVVGMVYNNW FDVWGPGVLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 30)
DVD005L CD20/CD80	AB001 VL	AB007 VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMT CRASSVS YIHWFQQKPG SSPKPWIY ATSNLASGVPV RFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYC QQWTSNPPT FGGGTKLEIKR TVAAP ESALTQPP SVSGAPGQKVTISCT SGTSNIGGYDL HWYQQLPGTAPKLL IY DINKRPSGI SDRFSGSKSGTAASLAITGLQTEDEADYY CQSYDSSLNAQV FGGGTRLTVLG TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)
DVD006H CD80/CD20	AB007 VH	AB001 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGGSIS GGY GWGWIRQ PPGKGLEWIG SFYSSSGNTYYNPSLKSQVTIST DTSKNQF SLKLNMTAADTAVYYCVR DRLF SVVGMVYNNW FDVWGPG VLTVSS ASTKGP QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGY TFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR STYYGGDWY

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			FNVWGAGTTVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:32)
DVD006L CD80/CD20	AB007 VL	AB001 VL	ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCT GTSTSNIGGYDLHWYQQ L PGTAPKLLIY DINKRPSGISDR FSGSKSGTAASLAITGLQ TEDEADYYC QSYDSSLNAQV FGGGTRLTVLG QPKAAPQ IV LSQSPAILSPSPGEKVTMT CRASSSVSYI HWFQQKPGSSP KPWIY ATSNLASGVPV RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA TYYC QQWTSNPPT FGGGTKLEIKR QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:33)
DVD037H VEGF/HER2	AB014 VH	AB004 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT NYGMN WVRQA PGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRR FTFSLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAK YPHYYGSSHWYFDV WGQGTLT VSS ASTKGPEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQ APGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGR FTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDY WG QGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:34)
DVD037L VEGF/HER2	AB014 VL	AB004 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQ KP GKAPKVLIIY FTSSLHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQ EDFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR TVAAP DIQMTQS PSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLL IY SASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:35)
DVD038H Her2/VEGF	AB004 VH	AB014 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQ A PGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDY WGQGTTLVTVSS ASTKGPEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT NYGM NWVRQ APGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRR FTFSLDT

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			SKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK YPHYYGSSHWYFDVWG QGT LVT VSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)
DVD038L Her2/VEGF	AB004 VL	AB014 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIY SASFLYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQ EDFATYYC QQHYTTPPT FGQGTKVEIKR TVAAP DIQMTQS PSSLSASVGDRVITITC SASQDISNYL NWYQQKPGKAPKVL IY FTSSLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY C QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 37)
DVD053H TNF/RANK L	AB017 VH	AB018 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGR FTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDYWG QGT LVT VSS SASTKGPEVQL LES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YA MSWVRQAPGKGLEWVS GITGSGGSTYYADSVKGR FTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DPGTTVIMSWFDPWG QGT LVT VSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)
DVD053L TNF/RANK L	AB017 VL	AB018 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNYLAWYQQKP GKAPKLLIY AASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQ EDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIKR TVAAP EIVLTQS PGTSLSPGERATLSC RASQSVRGRYLA WYQQKPGQAPRL LIY GASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVF YC QQYGSSPRT FGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 39)
DVD054H RANKL/TN F	AB018 VH	AB017 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMS WVRQA PGKGLEWVS GITGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAK DPGTTVIMSWFDPWG QGT LVT V SS SASTKGPEVQL VES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDY

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			AMHWVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSV EGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VS YLSTASSLDYWG QGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)
DVD054L RANKL/TN F	AB018 VL	AB017 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQSVRGRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFC QQYGSSPRT FGQGTKVEIKR TVAAP DIQMTQ SPSSLSASVGDRTIT CRASQGIRNYLAWYQQK PGKAPKL LIY AAS TLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATY YC QRYNRAPYT FGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 41)
DVD065H TNF/DKK	AB017 VH	AB023 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD DIAMHWVRQA PGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSV EGRFTISR DNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAK VS YLSTASSLDYWG QGTLVTVS SASTKGPEVQLVESGGGLVQPANSLKLSCAASGFTFSDYA MAWVRQSPKKGLEWVATI IYDGSSTYYRDSVKGRFTISR NAKSTLYLQMDSLRSEDATYYCAT GLGIATDYFDYWGQG VLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)
DVD065L TNF/DKK	AB017 VL	AB023 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQGIRNYLAWYQQK GKAPKLLIY AAS TLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQ EDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIKR TVAAP DIRMTQS PASLSASLGETVNI ECLASEDIYSD LAWYQQKPGKSPQLL IY NANSLQNGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDVATYF C QQYNNYPPT FGGGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 43)
DVD066H DKK/TNF	AB023 VH	AB017 VH	EVQLVESGGGLVQPANSLKLSCAASGFTF SDYAMAWVRQS PKKGLEWV ATI IYDGSSTYYRDSVKGRFTISR DNAKSTLY LQMDSLRSEDATYYCAT GLGIATDYFDYWGQ VLVTVSS

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			ASTKGPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVGEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDYWGQG TLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)
DVD066L DKK/TNF	AB023 VL	AB017 VL	DIRMTQSPASLSASLGETVNIECL ASEDIYSDLAWYQQKP GKSPQLLIY NANSLQNGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLS EDVATYFC QQYNNYPPT FGGGTKLELKR TVAAP DIQMTQS PSSLSASVGDRTITCR ASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLL IY AASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYY CQRYNRAPYTF GQGTKEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 45)
DVD165H CD20/RANK L	AB001 VH	AB018 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCAR STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS AASTKGPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYA MSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DPGTTVIMSWFDPWG QGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 46)
DVD165L CD20/RANK L	AB001 VL	AB018 VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMT CRASSVS YIHWFQQKPG SSPKPWIY ATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYC QQWTSNPPT FGGGTKLEIKR TVAAP EIVLTQSP GTLSSLSPGERATLSC RASQSVRG RYLAWYQQKPGQAPRLL IY GASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFY CQQYGSSPRT FGQGTKEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 47)
DVD166H RANKL/CD	AB018 VH	AB001 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAM SWVRQA PGKGLEWV SGITGSGGSTYYADSVKGRFTISR DN SKNTLY

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
20			LQMNSLRAEDTAVYYCAK DPGTTVIMSWFDPWGQ GLTVTV SS ASTKGP QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT SY NMH WVKQTPGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTA DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR STYYGGDWYFNVWG AGTTVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 48)
DVD166L RANKL/CD 20	AB018 VL	AB001 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC RASQSVRGRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVFY CQQYGSSPRT FGQGTKVEIKR TVAAPQ IVLSQ SPAILSPSPGEKVTMT CRASSVS YIHWFOQKPGSSPKPW IY ATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWTSNPPT FGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTTLISKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 49)
DVD257H DLL4/PLGF	DLL4H	PIGFH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DNWISWVRQA PGKGLEWVG YISPNSGFTYYADSVKGR FTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARD DNFGGYFDYWGQ GLTVTVSS AS TKGP QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFT DYYINW VKLAPQGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKG KATLTIDTSS STAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRD SPFFDYWGQ GLTLLTVSS (SEQ ID NO: 50)
DVD257L DLL4/PLGF	DLL4L	PIGFL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQDVSTAVAWYQQK P GKAPKLLIY SASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQ EDFATTYY CQQSYTGTVT FGQGTKVEIKR TVAAPD IVLTQ SPDSLAVSLGERVTMNCK SSQSLNSGMRKSFLAWYQQK P GQSPKLLIY WASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLTISSVQA EDVAVYY CKQSYHLFT FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO: 51)
DVD258H PLGF/DLL4	PIGFH	DLL4 H	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFT DYYINWVKLA PGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKG KATLTIDTSSSTAY MQLSSLTSEDTAVYFCVRD SPFFDYWGQ GLTLLTVSS ASTK GPEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DNWISWVR QAPGKGLEWVG YISPNSGFTYYADSVKGR FTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARD DNFGGYFDYWGQ GLTVTVSS (SEQ ID NO: 52)
DVD258L PLGF/DLL4	PIGFL	DLL4L	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCK SSQSLNSGMRKSFLA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDVAVYY CKQSYHLFT FGSGTKLEIKR TVAAPD I QMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQDVSTAVAWYQQK PGK APKLLIY SASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPED

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			FATYYC QQSYTGTVT FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 53)
DVD277H TNF/SOST(S 2)	AB017 VH	AB050 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQA PGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGRFTIS RDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDY WGQGLTVTS SASTKGPEVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTDYN MHWMKQNQGSLEWIGEINPNSGGSGYNQKFKG KATLTVD KSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR LGYYGNYEDWYFDVW GAGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)
DVD277L TNF/SOST(S 2)	AB017 VL	AB050 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QGIRNYLAWYQQKP GKAPKLLIYA AASTLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQ EDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIKR TVAAP DLQMTQT TSSLSASLGDRVITISCRAS QDISNYLNWYQQKPDGTVKLL IF YTTSTLQSGVPSR FSGSGSGTNYSLTITNLEQDDAATYF CQQGDTLPYT FGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 55)
DVD278H SOST(S2)/T NF	AB050 VH	AB017 VH	EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTD YNMHWMKQN QGSLEWIGE INPNSGGSGYNQKFKG KATLTVDKSSSTAY MELRSLTSEDSAVYYCAR LGYYGNYEDWYFDVW GAGTTVT VSS SASTKGPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDY W GQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 56)
DVD278L SOST(S2)/T NF	AB050 VL	AB017 VL	DLQMTQTTSLSASLGDRVITISCRAS QDISNYLNWYQQKP DGTVKLLIF YTTSTLQSGVPSR FSGSGSGTNYSLTITNLEQ DDAATYFC QQGDTLPYT FGGGTKLEIKR TVAAP DIQMTQS PSSLSASVGDRVITITCRAS QGIRNYLAWYQQKPGKAPKLL IYA AASTLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYY CQRYNRAPYT FGQGTKVEIKR

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:57)
DVD281H IL-9(S2)/IgE	AB056 VH	AB053 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTG SWIEWIKQ RPGHGLEWIG QILPGSGS AYYNEK FKG KATFTADTSSKTVYIQLISLTTEDSAIYYCARE DNYGSSSL AYWGQGTLLTVSA ASTKGPE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSIT SGYS W WNWIRQ APGKGLEWVAS ITYDGSTN YN PSVKGRITIS RDDSKNTFY LQMNSLRAEDTAVYYCARG SHYFGHWHFAV WGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:58)
DVD281L IL-9(S2)/IgE	AB056 VL	AB053 VL	DILLTQSPAILSVPGERVSFSC RASQSIGTNI HWYQORTNGSPRLLIK YASESISGIP SRFSGGGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQSNNWPLT FGAGTKLELKR TVAAP DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSV DYD GDSYMN WYQQKPGKAPKLLIY AASYLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSHEDPYT FGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:59)
DVD282H IgE/IL-9(S2)	AB053 VH	AB056 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVAS ITYDGSTN YN PSVKGRITIS RDDSKNTFY LQMNSLRAEDTAVYYCARG SHYFGHWHFAV WGQGTLLTVS SASTKGPE VQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTG SWIEWIKQ RPGHGLEWIG QILPGSGS AYYNEK FKG KATFTADTSSKTVYIQLISLTTEDSAIYYCARE DNYGSSSL AYWGQGTLLTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:60)
DVD282L IgE/IL-9(S2)	AB053 VL	AB056 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSV DYD GDSYMN WYQQKPGKAPKLLIY AASYLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSHEDPYT FGQGTKVEIKR TVAAP DILLTQSPAILSVPGERVSFSC RASQSIGTNI HWYQORTNGSPRLLIK YASESISGIP SRFSGGGSGTDFTLSINSVESEDI

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			ADYYC QQSNNWPLT FGAGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)
TNF/IL-17H (DVD-A)	TNFH	IL-17H	EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQA PGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGR FTISRDNANKSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDY WGQGTLLTVS SGGGSGGGGSE EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGSF GGYGIGWVRQAP QGQLEWMGGIT PFFGFADYAQKFQGR VT ITADESTTTAYMELSGLTSDDTAVYYCARD PNEFWNGYYS THDFDSW GQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 62)
TNF/IL-17L (DVD-A)	TNFL	IL-17L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRNYLAWYQQ KP GKAPKLLIY AASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQ EDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIKR GGSGGGGSGSEI VLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRAS QDIGSELHWYQQ KPDQ PPKLLIKY ASHSTSGVPS RFSGSGSGTDFTLTINGLEAED AGTYT CHQTD SLPYTFGPGTKVDIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 63)
TNF/PGE2H (DVD-B)	TNFH	PGE2	EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQA PGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGR FTISRDNANKSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDY WGQGTLLTVS SASTKGPEV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT KYW LGWVRQAP QGQLEWMGDI YPGYDYTHYNEKFKDR VTLLTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR SDGSSTY WGQGTLLT VSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)
TNF/PGE2L (DVD-B)	TNF	PGE2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRNYLAWYQQ KP GKAPKLLIY AASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQ

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			EDVATYYC QRYN RAPYTFGQGTKVEIKR TVAAP DVLMTQT PLSLPVTGPGEPAISICT TSSQNIVHSNGNTYLE WYLQKPGQ SPQLLIY KVSNR FS GV PD R FSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC FQVSHV PYTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 65)
IL-1a/IL-1bH (DVD-C)	IL-1aH	IL-1bH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI FSRYDMS WVRQA PGKGLEWVA YISHGGAGTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR GGVTKGYFDV WGQGTPTVTVSS A STKGP QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFT FSMFGVH WVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYAESVKGR FTISRDN KNILFLQMDSLRLEDTAVYYCARG RPKVVI PAP LAH WGQ TLVTFSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)
IL-1a/IL-1bL (DVD-C)	IL-1aL	IL-1bL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASGNIHNYLT WYQQTP GKAPKLLIY NAKTLADGVPSR FSGSGSGTDYFTFTISLQ EDIATYYC QHFSI PYTFGQGTKLQITR TVAAP DIQMTQS PSSVSASVGDRVTITC RASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLL IY EASNLETGVPSR FSGSGSGSDFTLTISLQPEDFATYY CQQTSSFLLS FGGGTKVEHKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 67)
DLL4/VEGF HC(h1A11.1. A6-LS-Av)			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMA WVRQA PGKGLEWVA TISSDAWPSYRDSVKGR FTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCSR GYNSPFAY WGQGTTLVTVSS AS TKGPSVFPLAPE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF TNYGMN WVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAAD FKRRFT FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PHYYGSSHWY FDV WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 68)
DLL4/VEGF			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYSNLAWY QQKP

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
LC(h1A11.1. A6-LS-Av)			GKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 69)
DLL4/VEGF HC(h1A11.1. A6-SL-Av)			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRHFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDAWPSYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCSRGYNSPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
DLL4/VEGF LC(h1A11.1. A6-SL-Av)			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)
IL12/IL18H			EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSKSVMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQV VLTMTNMDPVDTATYYCARRGIRSAMDYWGQGT VTVSSASTKGPEVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKS FNTAFLQWSSSLKASDTAMYICARVGS GWYPYTFDIWGQGT MVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT

DVD-Ig重鏈 或輕鏈名稱	外部可 變區域 名稱	內部可 變區域 名稱	序列，其中可變區與恆定區之間為虛線 1234567890123456789012345678901234567890
			QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 70)
IL12/IL18 LC			DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKP GQPPKLLIYYASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQDYNSPWTFGGGTKVEIKRTVAAP ¹ EIVMTQS PATLSVSPGERATLSCRASESISSNLAWYQQKPGQAPRLF IYTASTRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNNWPSITFGQGTRLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 71)
DLL4/VEGF HC h1A11.1-LS- AV			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQA PGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF TNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWY FDVWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 72)
DLL4/VEGF LC h1A11.1-LS- AV			DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKP GKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKRTVAAP ² DIQMTQS PSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 73)

以引用的方式併入

本申請案全文中引用之所有引用參考文獻(包括參考文獻書目、專利、專利申請案及網站)之內容均以全文引用的方式明確併入本文中，該等參考文獻中引用之參考文獻亦併入本文中。除非另外指明，否則本發明之實施將利用免疫學、分子生物學及細胞生物學之習知技術，此等習知技術在此項技術中已熟知。

等效物

本發明可以其他特定形式實施而不悖離其精神或本質特徵。因此認為上述實施例在所有方面均為說明性的，而非限制本文所述之本發明。因此本發明之範圍由隨附申請專利範圍而非由上述說明指示，且因此希望本文包涵屬於申請專利範圍之等效含義及範圍內之所有變化。

【符號說明】

無

序列表

<110> 美商艾伯維有限公司
<120> 穩定雙重可變區域免疫球蛋白蛋白質調配物
<130> 117813-05063
<140>
<141>
.
.
<150> 61/794,231
<151> 2013-03-15
.
.
<150> 61/721,364
<151> 2012-11-01
.
<160> 75
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 1
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
1 5 10 15

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 2
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
1 5 10 15

Val

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
.
<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽
.

<400> 3
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 4
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 5
Ser Ala Lys Thr Thr Pro
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 6
Arg Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 7
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
1 5

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 8
Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 9
Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 10
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
1 5 10 15

Arg Val

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 11
Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

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

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 12
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 13
Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 14

201422236

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 15
Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 16
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 17
Ala Lys Thr Thr Pro Pro
1 5

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 18
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 19
Ala Lys Thr Thr Ala Pro
1 5

<210> 20

201422236

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 20
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 21
Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 22
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 24
Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 25
Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 26
Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 27
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 334
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 28
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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

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

Pro Ser Vai Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

115

120

125

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser

130135140

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

145150155160

Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

165170175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

180185190

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

195200205

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

210215220

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

225230235240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

245250255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

260265270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser

275280285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

290295300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

305310315320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

325330

<210> 29

<211> 577

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

202530

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn
165 170 175

Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe
180 185 190

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro
210 215 220

His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

<210> 30
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 30
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

201422236

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

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

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140

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

Gly Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
180 185 190

Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Thr Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
195 200 205

Leu Lys Leu Asn Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Val Arg Asp Arg Leu Phe Ser Val Val Gly Met Val Tyr Asn Asn Trp
225 230 235 240

Phe Asp Val Trp Gly Pro Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
245 250 255

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
275 280 285

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
290 295 300

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

201422236

305 310 315 320

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
325 330 335

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
340 345 350

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
355 360 365

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
370 375 380

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
385 390 395 400

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
405 410 415

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
420 425 430

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
435 440 445

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
450 455 460

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
465 470 475 480

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
485 490 495

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
500 505 510

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
515 520 525

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
530 535 540

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
545 550 555 560

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
565 570 575

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210>	31
<211>	329
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 31

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Gly Tyr
 130 135 140

Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Ile Tyr Asp Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 165 170 175

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 180 185 190

Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 195 200 205

Asn Ala Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Thr
 210 215 220

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 225 230 235 240

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 260 265 270

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

275 280 285

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
290 295 300

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 32
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 32
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Gly
20 25 30

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

Ile Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

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

Trp Phe Asp Val Trp Gly Pro Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu
130 135 140

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
145 150 155 160

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg
165 170 175

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
180 185 190

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
195 200 205

201422236

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr
225 230 235 240

Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser
245 250 255

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
275 280 285

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
290 295 300

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
305 310 315 320

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
325 330 335

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
340 345 350

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
355 360 365

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
370 375 380

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
385 390 395 400

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
405 410 415

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
420 425 430

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
435 440 445

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
450 455 460

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
465 470 475 480

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
485 490 495

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

201422236

500

505

510

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
515 520 525

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
530 535 540

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
545 550 555 560

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
565 570 575

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 33

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 33

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Gly Tyr
20 25 30

Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

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

Pro Lys Ala Ala Pro Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu
115 120 125

Ser Pro Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
130 135 140

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro
145 150 155 160

Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val
165 170 175

201422236

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 180 185 190
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr
 195 200 205
 Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215 220
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 245 250 255
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 260 265 270
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 275 280 285
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 290 295 300
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 305 310 315 320
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 325
 <210> 34
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列之說明：合成多肽
 <400> 34
 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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala 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 Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
 145 150 155 160
 Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser
 180 185 190
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 260 265 270
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 275 280 285
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 290 295 300
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 325 330 335
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 340 345 350
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 355 360 365
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 370 375 380
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 385 390 395 400

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
565 570 575

Pro Gly Lys

<210> 35
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之説明：合成多肽

<400> 35
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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr
130 135 140

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
195 200 205

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 36
<211> 579
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

201422236

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 36

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 Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val
115 120 125

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
130 135 140

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met
145 150 155 160

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

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg
180 185 190

Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
195 200 205

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
245 250 255

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
275 280 285

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 290 295 300

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 325 330 335

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 340 345 350

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 355 360 365

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 385 390 395 400

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 565 570 575

Pro Gly Lys

201422236

<210> 37
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 37
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 Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
195 200 205

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

201422236

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 38

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 38

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 Lys Gly Pro Glu
115 120 125

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
145 150 155 160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
165 170 175

201422236

Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
180 185 190

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
195 200 205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
245 250 255

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
275 280 285

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
290 295 300

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
305 310 315 320

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
325 330 335

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
340 345 350

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
355 360 365

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
385 390 395 400

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
565 570 575

Pro Gly Lys

<210> 39
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 39
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 Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly
130 135 140

201422236

Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
180 185 190

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser
195 200 205

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
210 215 220

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
245 250 255

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
260 265 270

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
275 280 285

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
290 295 300

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
305 310 315 320

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 40
<211> 579
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 40
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser 85	Leu Arg Ala Glu Asp 90	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 95	
Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val 100	Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp 105		
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val 115	Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 120		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val 130	Gln Pro Gly Arg 135		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 145			
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 165			
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val 180			
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 195			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 210			
Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly 225			
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser 245			
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala 260			
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val 275			
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala 290			
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val 305			
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His 325			
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys 340			
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly 355			

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
385 390 395 400

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
565 570 575

Pro Gly Lys

<210> 41
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之説明：合成多肽

<400> 41
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35

40

45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

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

Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 115 120 125

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg
 130 135 140

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 180 185 190

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala
 195 200 205

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 210 215 220

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 245 250 255

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 260 265 270

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 275 280 285

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 290 295 300

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 305 310 315 320

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325

201422236

<210> 42
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 42
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 Lys Gly Pro Glu
115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn Ser
130 135 140

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

Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
165 170 175

Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
180 185 190

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu
195 200 205

Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

260

265

270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 545 550 555 560

201422236

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

<210> 43
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 43
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 Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu
115 120 125

Gly Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser
130 135 140

Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln
180 185 190

Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro
195 200 205

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

225 230 235 240
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 245 250 255
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 260 265 270
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 275 280 285
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 290 295 300
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 305 310 315 320
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325
 <210> 44
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列之說明：合成多肽
 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ile Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Leu Gly Ile Ala Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val
 115 120 125
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
 130 135 140
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met
 145 150 155 160

201422236

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala
165 170 175

Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly
180 185 190

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
195 200 205

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

450

455

460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

<210> 45

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn
130 135 140

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro
195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 46
<211> 579
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 46
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu
 115 120 125
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 145 150 155 160
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175
 Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220
 Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 260 265 270
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 275 280 285
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 290 295 300
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 325 330 335
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 340 345 350

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
355 360 365

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
385 390 395 400

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
565 570 575

Pro Gly Lys

<210> 47
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 47
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Pro Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 115 120 125
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg
 130 135 140
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 145 150 155 160
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 180 185 190
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 195 200 205
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 210 215 220
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 225 230 235 240
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 245 250 255
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 260 265 270
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 275 280 285
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 290 295 300
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 305 310 315 320

201422236

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 48

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 48

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

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

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
130 135 140

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
180 185 190

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
225 230 235 240

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
245 250 255

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
275 280 285

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
290 295 300

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
305 310 315 320

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
325 330 335

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
340 345 350

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
355 360 365

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
385 390 395 400

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
435 440 445

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
450 455 460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
530 535 540

201422236

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
565 570 575

Pro Gly Lys

<210> 49

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

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

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
130 135 140

Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp
145 150 155 160

Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu
180 185 190

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro
195 200 205

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 50

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 50

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 Thr Asp Asn
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

201422236

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp
145 150 155 160

Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr
165 170 175

Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala
180 185 190

Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
195 200 205

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Asp Ser
210 215 220

Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

<210> 51
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 51
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Phe Ala Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Thr
85 90 95

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

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

Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
130 135 140

Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 165 170 175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 180 185 190

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 195 200 205

Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 210 215 220

Ile Lys Arg
225

<210> 52
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 52
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg
145 150 155 160

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Pro Asn
 165 170 175

Ser Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly
210 215 220

Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

<210> 53
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 53
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
115 120 125

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
130 135 140

Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val
165 170 175

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
180 185 190

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln
195 200 205

Gln Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
210 215 220

Ile Lys Arg
225

<210> 54

<211> 580

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 54

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 Lys Gly Pro Glu
115 120 125

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser
130 135 140

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

Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
180 185 190

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
195 200 205

Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
225 230 235 240

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
245 250 255

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
275 280 285

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
290 295 300

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
305 310 315 320

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
325 330 335

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
340 345 350

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
355 360 365

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
370 375 380

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
385 390 395 400

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
405 410 415

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
420 425 430

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
435 440 445

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
450 455 460

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
465 470 475 480

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
485 490 495

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
500 505 510

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
515 520 525

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
530 535 540

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
545 550 555 560

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
565 570 575

Ser Pro Gly Lys
580

<210> 55
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 55
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 Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

201422236

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu
180 185 190

Gln Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 56
<211> 580
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 56
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

100	105	110
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly 115 120 125		
Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 130 135 140		
Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp 145 150 155 160		
Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 165 170 175		
Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser 180 185 190		
Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 195 200 205		
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 210 215 220		
Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp 225 230 235 240		
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 245 250 255		
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 260 265 270		
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 275 280 285		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 290 295 300		
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 305 310 315 320		
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 325 330 335		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 340 345 350		
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 355 360 365		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 370 375 380		
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 385 390 395 400		

201422236

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
405 410 415

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
420 425 430

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
435 440 445

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
450 455 460

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
465 470 475 480

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
485 490 495

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
500 505 510

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
515 520 525

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
530 535 540

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
545 550 555 560

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
565 570 575

Ser Pro Gly Lys
580

<210> 57

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 57

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

201422236

[illegible]

<210> 58
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

201422236

<400> 58

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Ser
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Lys Thr Val Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Leu Ile Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val
115 120 125

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
130 135 140

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

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
165 170 175

Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val Lys Gly
180 185 190

Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln
195 200 205

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
210 215 220

Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

201422236

<210> 59
<211> 331
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 59

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

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

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr
130 135 140

Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
225 230 235 240

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
245 250 255

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

260

265

270

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 275 280 285

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 290 295 300

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 305 310 315 320

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 60

<211> 577

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 60

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 Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

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

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

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

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

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser
 130 135 140

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

Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 165 170 175

Gln Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 180 185 190

Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Lys Thr Val Tyr Ile
195 200 205

Gln Leu Ile Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Glu Asp Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Leu Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

485

490

495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570 575

Lys

<210> 61

<211> 331

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 61

Asp Ile Gln Leu 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 Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser
 145 150 155 160

201422236

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
180 185 190

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
195 200 205

Asn Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
210 215 220

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
225 230 235 240

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
245 250 255

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
260 265 270

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
275 280 285

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
290 295 300

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
305 310 315 320

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 62

<211> 587

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 62

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 130 135 140
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe
 145 150 155 160
 Gly Gly Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 165 170 175
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Thr Pro Phe Phe Gly Phe Ala Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr
 195 200 205
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Glu Phe Trp Asn Gly Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240
 Thr His Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 245 250 255
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 260 265 270
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 275 280 285
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 290 295 300
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 325 330 335
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 340 345 350
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 355 360 365
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 370 375 380

201422236

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
385 390 395 400

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
405 410 415

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
420 425 430

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
435 440 445

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
450 455 460

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
465 470 475 480

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
485 490 495

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
500 505 510

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
515 520 525

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
530 535 540

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
545 550 555 560

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
565 570 575

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585

<210> 63

<211> 332

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 63

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 Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe
 115 120 125
 Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 130 135 140
 Gln Asp Ile Gly Ser Glu Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln
 145 150 155 160
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser His Ser Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 180 185 190
 Ile Asn Gly Leu Glu Ala Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 195 200 205
 Thr Asp Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 210 215 220
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 225 230 235 240
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 245 250 255
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 260 265 270
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 275 280 285
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 290 295 300
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 305 310 315 320
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 64
 <211> 573

201422236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 64

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 Lys Gly Pro Glu
115 120 125

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
130 135 140

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

Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
165 170 175

Asp Ile Tyr Pro Gly Tyr Asp Tyr Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
180 185 190

Asp Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
195 200 205

Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
245 250 255

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
260 265 270

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 275 280 285
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 290 295 300
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 305 310 315 320
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 325 330 335
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 340 345 350
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 355 360 365
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 370 375 380
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 385 390 395 400
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 405 410 415
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 420 425 430
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 435 440 445
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 450 455 460
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 465 470 475 480
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 485 490 495
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 500 505 510
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 515 520 525
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 530 535 540
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 545 550 555 560
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

<210> 65
<211> 332
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 65
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 Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
115 120 125
Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Asn Ile Val His
130 135 140
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
145 150 155 160
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
165 170 175
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
180 185 190
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
195 200 205
Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
210 215 220
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
225 230 235 240
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
245 250 255

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
260 265 270

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
275 280 285

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
290 295 300

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
305 310 315 320

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 66
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

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

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
130 135 140

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

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Val
165 170 175

Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Phe Leu Gln Met
195 200 205

Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

<210> 67

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 67

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 Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
130 135 140

201422236

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu
195 200 205

Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 68
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 68
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 Arg His Phe
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ala Trp Pro Ser Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys 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	
Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln			
130	135	140	
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
145	150	155	160
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
165	170	175	
Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala			
180	185	190	
Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser			
195	200	205	
Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
210	215	220	
Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr			
225	230	235	240
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser			
245	250	255	
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
260	265	270	
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
275	280	285	
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
290	295	300	
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
305	310	315	320
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
325	330	335	
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
340	345	350	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
355	360	365	

201422236

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
370 375 380

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
385 390 395 400

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
405 410 415

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
420 425 430

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
435 440 445

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
450 455 460

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
465 470 475 480

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
485 490 495

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
500 505 510

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
515 520 525

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
530 535 540

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
545 550 555 560

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
565 570 575

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 69

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 69

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 130 135 140
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
 145 150 155 160
 Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 180 185 190
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
 195 200 205
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 210 215 220
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 225 230 235 240
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 245 250 255
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 260 265 270
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 275 280 285
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 290 295 300
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 305 310 315 320
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325

201422236

<210> 70
<211> 576
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 70
Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys
130 135 140

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

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Phe Ile
165 170 175

Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Ser Pro Thr Phe Gln Gly Gln
180 185 190

Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Phe Asn Thr Ala Phe Leu Gln Trp
195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Val
210 215 220

Gly Ser Gly Trp Tyr Pro Tyr Thr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
245 250 255

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

260	265	270
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 275 280 285		
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 290 295 300		
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 305 310 315 320		
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser 325 330 335		
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr 340 345 350		
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser 355 360 365		
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 370 375 380		
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 385 390 395 400		
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 405 410 415		
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val 420 425 430		
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 435 440 445		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 450 455 460		
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 465 470 475 480		
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 485 490 495		
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 500 505 510		
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp 515 520 525		
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 530 535 540		
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala 545 550 555 560		

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570 575

<210> 71
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 71
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro
115 120 125

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser
130 135 140

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe
145 150 155 160

Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
195 200 205

Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
210 215 220

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

245 250 255

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
260 265 270
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
275 280 285
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
290 295 300
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
305 310 315 320
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 72
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 72
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 Ser Asn Phe
20 25 30
Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
145 150 155 160
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
180 185 190

Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr
225 230 235 240

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
245 250 255

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
275 280 285

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
290 295 300

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
305 310 315 320

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
325 330 335

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
340 345 350

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
355 360 365

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
370 375 380

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
385 390 395 400

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
405 410 415

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
420 425 430

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
435 440 445

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
450 455 460

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
465 470 475 480

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
485 490 495

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
500 505 510

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
515 520 525

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
530 535 540

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
545 550 555 560

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
565 570 575

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 73

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 73

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
195 200 205

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
210 215 220

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
245 250 255

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
260 265 270

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
290 295 300

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
305 310 315 320

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 74
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 74
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 Arg His Phe
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ala Trp Pro Ser Tyr Arg Asp Ser Val

50

55

60

Lys 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

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn
 165 170 175

Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe
 180 185 190

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro
 210 215 220

His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
355 360 365

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

<210> 75
<211> 334
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 75
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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

20

25

30

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
 130 135 140

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
 165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 180 185 190

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 195 200 205

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 305 310 315 320

201422236

Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
				325					330				

申請專利範圍

1. 一種水性調配物，其包含水性穩定DVD-Ig (AS-DVD-Ig)蛋白質及具有約5至約50 mM之莫耳濃度之緩衝液，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。
2. 如請求項1之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，當以至少約50 mg/ml之濃度調配於組胺酸或檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中時，在約40℃儲存14天之後，如藉由尺寸排阻層析法(SEC)所測定，具有小於約15%之單體相對百分比損失的DVD-Ig蛋白質。
3. 如請求項1之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，當以至少約50 mg/ml之濃度調配於組胺酸或檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中時，在約40℃儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有小於約10%之單體相對百分比損失的DVD-Ig蛋白質。
4. 如請求項1之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，當以至少約50 mg/ml之濃度調配於組胺酸或檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中時，在約40℃儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有小於約5%之單體相對百分比損失的DVD-Ig蛋白質。
5. 如請求項1之水性調配物，其中如藉由SEC分析所測定，該調配物包含約6%或小於6%聚集度。
6. 如請求項1之水性調配物，其中如藉由SEC分析所測定，該調配物包含約5%或小於5%聚集度。
7. 如請求項1至6中任一項之水性調配物，其中該調配物具有約5至約6.5之pH值。
8. 如請求項1至6中任一項之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，在約40℃下，在約5.5至約6.5之pH值下，在約100

mg/ml濃度下以水性調配物儲存21天之後，具有約10%或小於10%之單體相對(rel.)峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。

9. 如請求項1至6中任一項之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，在約5°C下，在約5.5至約6.5之pH值下，在約100 mg/ml濃度下以水性調配物儲存21天之後，具有約1%或小於1%之單體相對峰面積變化的DVD-Ig蛋白質。
10. 如請求項1至6中任一項之水性調配物，其進一步包含至少一種選自界面活性劑、多元醇及其組合之組分。
11. 如請求項10之水性調配物，其中該多元醇係選自由山梨糖醇、甘露糖醇及蔗糖組成之群。
12. 如請求項11之水性調配物，其中該多元醇為甘露糖醇且其中甘露糖醇之濃度係選自由以下組成之群：約10至約100 mg/ml，約20至約80 mg/ml，約20至約70 mg/ml，約30至約60 mg/ml，及約30至約50 mg/ml。
13. 如請求項11之水性調配物，其中該多元醇為山梨糖醇。
14. 如請求項13之水性調配物，其中山梨糖醇之濃度係選自由以下組成之群：約20至約60 mg/ml，約25至約55 mg/ml，約30至約50 mg/ml，及約35至約45 mg/ml。
15. 如請求項11之水性調配物，其中該多元醇為蔗糖。
16. 如請求項15之水性調配物，其中蔗糖之濃度係選自由以下組成之群：約60至約100 mg/ml，約65至約95 mg/ml，約70至約90 mg/ml，及約75至約85 mg/ml。
17. 如請求項10之水性調配物，其中該界面活性劑為聚山梨醇酯。
18. 如請求項17之水性調配物，其中聚山梨醇酯之濃度係選自由以下組成之群：約0.001%至約1%，約0.005%至約0.05%，約0.005%至約0.02%，約0.01%至約0.05%，及約0.1%。

19. 如請求項17之水性調配物，其中該聚山梨醇酯為聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。
20. 如請求項19之水性調配物，其中該聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20具有約0.005%至約0.02%之濃度。
21. 如請求項1至6中任一項之調配物，其中該緩衝液係選自由乙酸鹽、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、磷酸鹽及檸檬酸鹽組成之群。
22. 如請求項1至6中任一項之水性調配物，其中該緩衝液之莫耳濃度範圍為10 mM至20 mM。
23. 如請求項1至6中任一項之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有約1至約200 mg/ml之濃度。
24. 如請求項23之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有選自由以下組成之群之濃度：約20至約100 mg/ml，約1至約250 mg/ml，約10至約230 mg/ml，約20至約210 mg/ml，約30至約190 mg/ml，約40至約170 mg/ml，約50至約150 mg/ml，約60至約130 mg/ml，約70至約110 mg/ml，及約80至約105 mg/ml之該AS-DVD-Ig蛋白質。
25. 一種水性調配物，其包含水性穩定DVD-Ig (AS-DVD-Ig)蛋白質、具有約5至約50 mM之莫耳濃度之緩衝液、界面活性劑及多元醇，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。
26. 如請求項25之水性調配物，其中該多元醇係選自由山梨糖醇、甘露糖醇及蔗糖組成之群。
27. 如請求項26之水性調配物，其中該多元醇為山梨糖醇。
28. 如請求項27之水性調配物，其中山梨糖醇之濃度為約30至約50 mg/ml。
29. 如請求項26之水性調配物，其中該多元醇為蔗糖。
30. 如請求項29之水性調配物，其中該蔗糖具有約70至約90 mg/ml之

濃度。

31. 如請求項25至30中任一項之水性調配物，其中該緩衝液係選自由乙酸鹽、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、磷酸鹽及檸檬酸鹽組成之群。
32. 如請求項25至30中任一項之水性調配物，其中該緩衝液之莫耳濃度範圍為約10至約20 mM。
33. 如請求項25至30中任一項之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有約1至約200 mg/ml之濃度。
34. 如請求項25至30中任一項之水性調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有選自由以下組成之群之濃度：約20至約100 mg/ml，約1至約250 mg/ml，約10至約230 mg/ml，約20至約210 mg/ml，約30至約190 mg/ml，約40至約170 mg/ml，約50至約150 mg/ml，約60至約130 mg/ml，約70至約110 mg/ml，及約80至約105 mg/ml之該AS-DVD-Ig蛋白質。
35. 一種調配物，其包含AS-DVD-Ig蛋白質、多元醇、緩衝液及界面活性劑，其中該調配物具有約5至約7之pH值，且其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，當以約60 mg/ml之濃度調配於組胺酸或檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中時，在約40℃儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有小於約15%之單體相對百分比損失的DVD-Ig蛋白質。
36. 如請求項35之調配物，其中該多元醇係選自由山梨糖醇、甘露糖醇及蔗糖組成之群。
37. 如請求項35或36之調配物，其中該緩衝液係選自由乙酸鹽、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、磷酸鹽及檸檬酸鹽組成之群。
38. 如請求項35或36之調配物，其中該界面活性劑為聚山梨醇酯。
39. 如請求項38之調配物，其中該聚山梨醇酯為聚山梨醇酯80或聚

山梨醇酯20。

40. 如請求項39之調配物，其中該聚山梨醇酯80或該聚山梨醇酯20具有約0.005%至約0.02%之濃度。
41. 一種調配物，其包含AS-DVD-Ig蛋白質、多元醇、組胺酸緩衝液及聚山梨醇酯，其中該調配物具有約5至約7之pH值，且其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，當以約60 mg/ml之濃度調配於組胺酸或檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中時，在約40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有小於約15%之聚集度的DVD-Ig蛋白質。
42. 如請求項35、36及41中任一項之調配物，其為水性調配物。
43. 如請求項35、36及41中任一項之調配物，其為凍乾調配物。
44. 如請求項1至6、25至30、35、36及41中任一項之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質包含各獨立包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的第一及第二多肽鏈，其中
 - VD1為第一可變區域；
 - VD2為第二可變區域；
 - C為恆定區域；
 - X1為連接子，限制條件為其不為CH1；
 - X2為Fc區；
 - n為0或1，
 其中該第一及第二多肽鏈上之VD1區域形成第一功能性目標結合位點且該第一及第二多肽鏈上之VD2區域形成第二功能性目標結合位點。
45. 如請求項44之調配物，其中該第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中
 - VD1為第一重鏈可變區域；
 - VD2為第二重鏈可變區域；

C爲重鏈恆定區域；

X1爲連接子，限制條件爲其不爲CH1；

X2爲Fc區；

n爲0或1，及

其中該第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中

VD1爲第一輕鏈可變區域；

VD2爲第二輕鏈可變區域；

C爲輕鏈恆定區域；

X1爲連接子，限制條件爲其不爲CH1；

X2不包含Fc區；

n爲0或1，

其中該第一及第二多肽鏈上之該等VD1區域形成第一功能性目標結合位點且該第一及第二多肽鏈上之該等VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

46. 如請求項44之調配物，其包含兩條第一多肽鏈及兩條第二多肽鏈，其中該結合蛋白包含四個功能性目標結合位點。
47. 如請求項44之調配物，其中X1不爲CL。
48. 如請求項44之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質包含來自如SEQ ID NO: 28至75中所列之可變輕鏈或重鏈胺基酸序列的三個CDR。
49. 如請求項44之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質包含如SEQ ID NO: 28至75中所列之輕鏈或重鏈胺基酸序列。
50. 如請求項44之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有選自由以下組成之群之結合特異性：CD20/CD80、VEGF/Her2、TNF/RANKL、TNF/DKK、CD20/RANKL、DLL4/PLGF、TNF/SOST、IL-9/IgE、IL-12/IL-18、TNF/IL-17、TNF/PGE2、

IL1 α /IL1 β 及DLL4/VEGF。

51. 如請求項44之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有選自由以下組成之群之結合特異性：IL4/IL13、IL1 α /IL1 β 及TNF α /IL17。
52. 如請求項50之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有針對TNF及IL-17之結合特異性。
53. 如請求項52之調配物，其中該TNF α /IL17特異性AS-DVD-Ig蛋白質為DVD A (SEQ ID NO: 62及63)。
54. 如請求項50之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有針對IL1 α /IL1 β 之結合特異性。
55. 如請求項54之調配物，其中該IL1 α /IL1 β 特異性AS-DVD-Ig蛋白質為DVD C (SEQ ID NO: 66及67)。
56. 如請求項50之調配物，其中該AS-DVD-Ig蛋白質具有針對IL-12/IL-18之結合特異性。
57. 如請求項1至6、25至30、35、36及41中任一項之調配物，其中該調配物為醫藥調配物。
58. 一種醫藥組合物，其包含水性穩定DVD-Ig (AS-DVD-Ig)蛋白質及具有約5至約50 mM之莫耳濃度之緩衝液，其中該AS-DVD-Ig蛋白質特徵為，當以約60 mg/ml之濃度調配於組胺酸或檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液中時，在約40°C儲存14天之後，如藉由SEC所測定，具有小於約10%之單體相對百分比損失的DVD-Ig蛋白質，且該調配物具有4.5至7.5之pH值。
59. 如請求項58之醫藥組合物，其進一步包含至少一種選自界面活性劑、多元醇及其組合之組分。
60. 一種如請求項58或59之組合物之用途，其用於製造供治療病症之藥劑。
61. 一種凍乾調配物，其包含穩定凍乾DVD-Ig (LS-DVD-Ig)蛋白

質，其中當該調配物經復原時，該調配物包含約1至約100 mg/ml之該LS-DVD-Ig蛋白質、約10至約50 mM之緩衝液、多元醇、約0.01至約0.2 mg/ml之聚山梨醇酯，且具有約5至約7之pH值。

62. 如請求項61之凍乾調配物，其中該調配物具有約5.5至約6.5之pH值。

63. 如請求項61或62之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質以超過約100 mg/ml之濃度調配時，以水性調配物在約5.5至約6.5之pH值下，在約40°C下加速儲存21天之後，觀測到具有超過10%之單體相對峰面積變化。

64. 如請求項61或62之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質包含各獨立包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的第一及第二多肽鏈，其中

VD1為第一可變區域；

VD2為第二可變區域；

C為恆定區域；

X1為連接子，限制條件為其不為CH1；

X2為Fc區；

n為0或1，

其中該第一及第二多肽鏈上之該等VD1區域形成第一功能性目標結合位點且該第一及第二多肽鏈上之該等VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

65. 如請求項64之凍乾調配物，其中該第一多肽鏈包含第一VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中

VD1為第一重鏈可變區域；

VD2為第二重鏈可變區域；

C為重鏈恆定區域；

X1為連接子，限制條件為其不為CH1；

X2爲Fc區；

n爲0或1，及

其中該第二多肽鏈包含第二VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中

VD1爲第一輕鏈可變區域；

VD2爲第二輕鏈可變區域；

C爲輕鏈恆定區域；

X1爲連接子，限制條件爲其不爲CH1；

X2不包含Fc區；

n爲0或1，

其中該第一及第二多肽鏈上之該等VD1區域形成第一功能性目標結合位點且該第一及第二多肽鏈上之該等VD2區域形成第二功能性目標結合位點。

66. 如請求項64之凍乾調配物，其包含兩條第一多肽鏈及兩條第二多肽鏈，其中該結合蛋白包含四個功能性目標結合位點。
67. 如請求項64之凍乾調配物，其中X1不爲CL。
68. 如請求項64之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質包含來自如SEQ ID NO: 28至75中所列之可變輕鏈或重鏈胺基酸序列的三個CDR。
69. 如請求項63之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質包含如SEQ ID NO: 28至75中所列之輕鏈或重鏈胺基酸序列。
70. 如請求項61或62之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質具有選自由以下組成之群之結合特異性：CD20/CD80、VEGF/Her2、TNF/RANKL、TNF/DKK、CD20/RANKL、DLL4/PLGF、TNF/SOST、IL-9/IgE、IL-12/IL-18、TNF/IL-17、TNF/PGE2、IL1 α /IL1 β 或DLL4/VEGF。
71. 如請求項70之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質具有針對

TNF及IL-17之結合特異性。

72. 如請求項70之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質具有針對IL1 α /IL1 β 之結合特異性。
73. 如請求項70之凍乾調配物，其中該LS-DVD-Ig蛋白質具有針對IL-12/IL-18之結合特異性。
74. 一種凍乾調配物，其藉由將包含LS-DVD-Ig蛋白質、具有約5至約50 mM之莫耳濃度之緩衝液、界面活性劑及多元醇的水性調配物凍乾而製備，其中該調配物具有約4.5至約7.5之pH值。
75. 如請求項74之凍乾調配物，其中該緩衝液係選自由組胺酸、丁二酸鹽及檸檬酸鹽及/或磷酸鹽組成之群。
76. 如請求項74或75之凍乾調配物，其中該多元醇係選自由甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖及海藻糖組成之群。

圖式

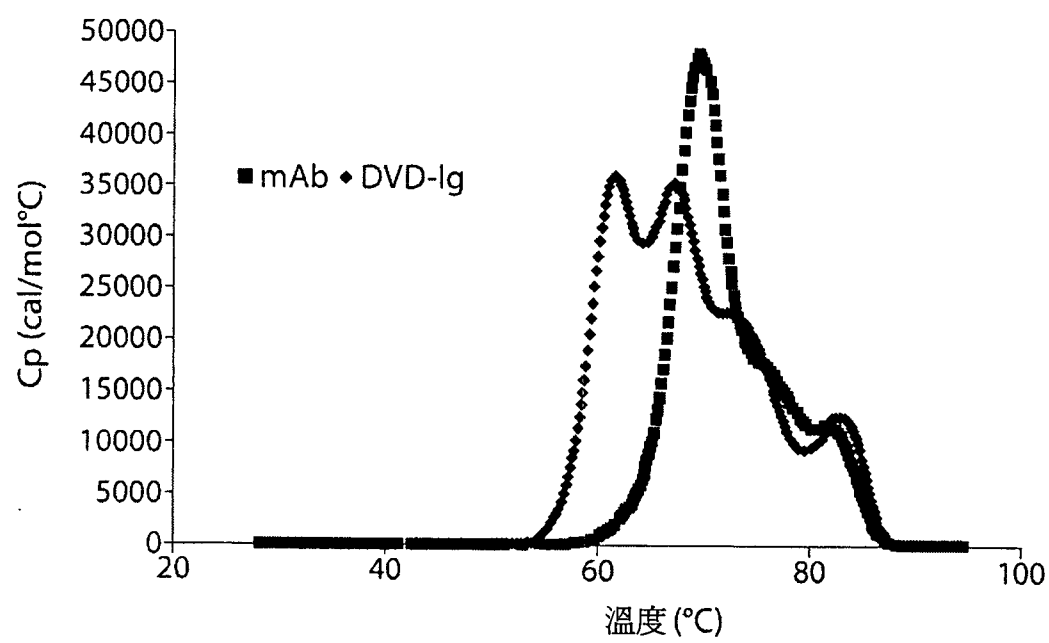


圖1

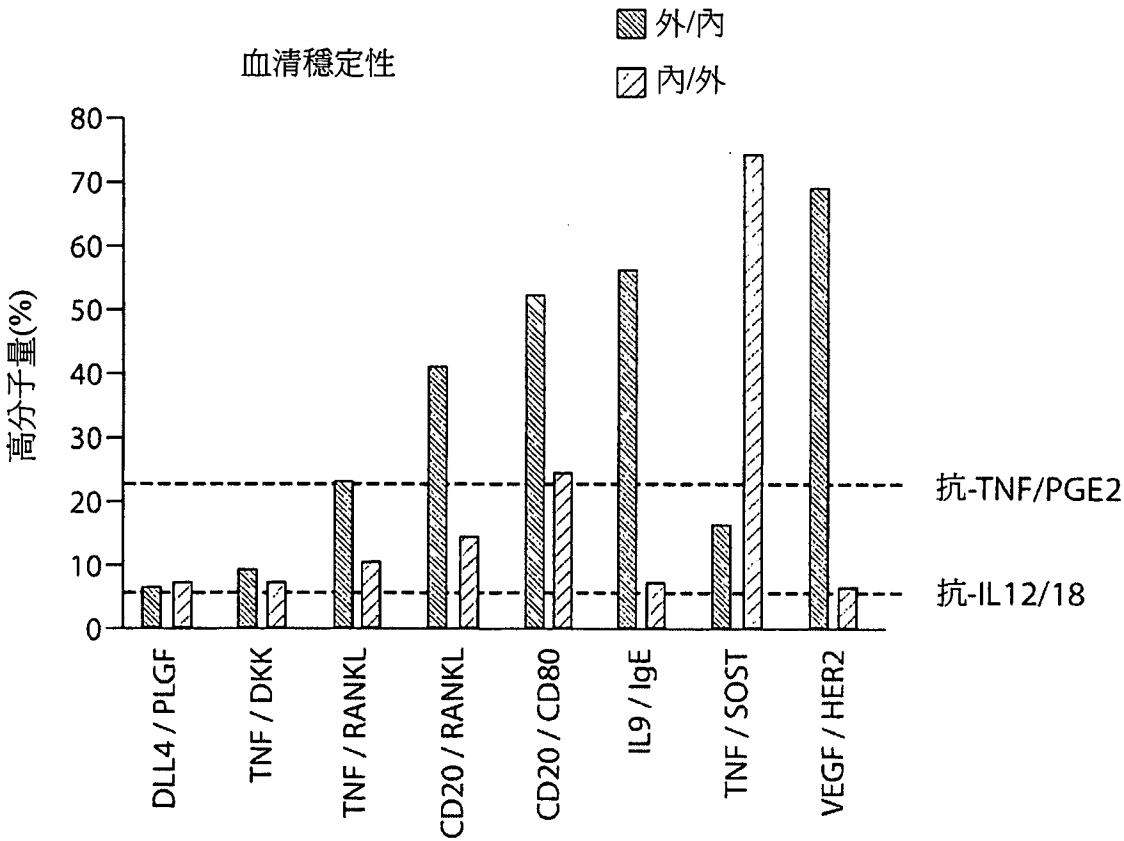


圖2A

區域取向構思

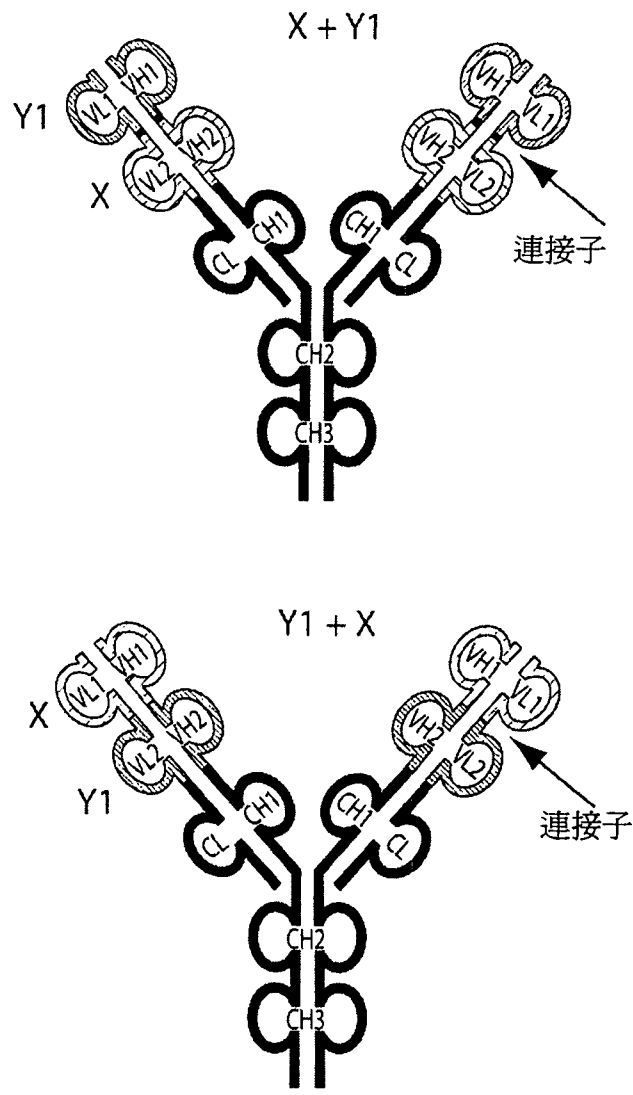


圖2B

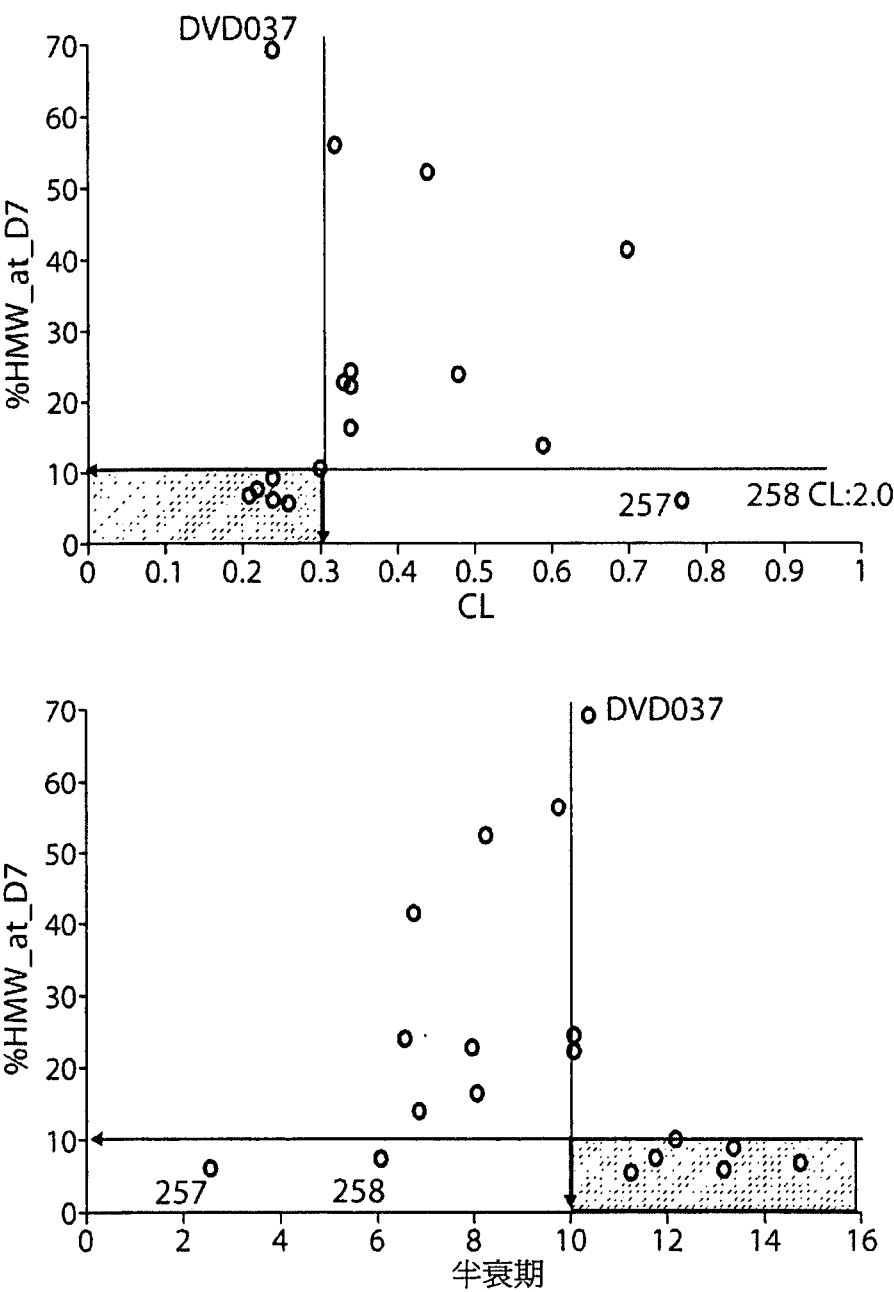


圖3

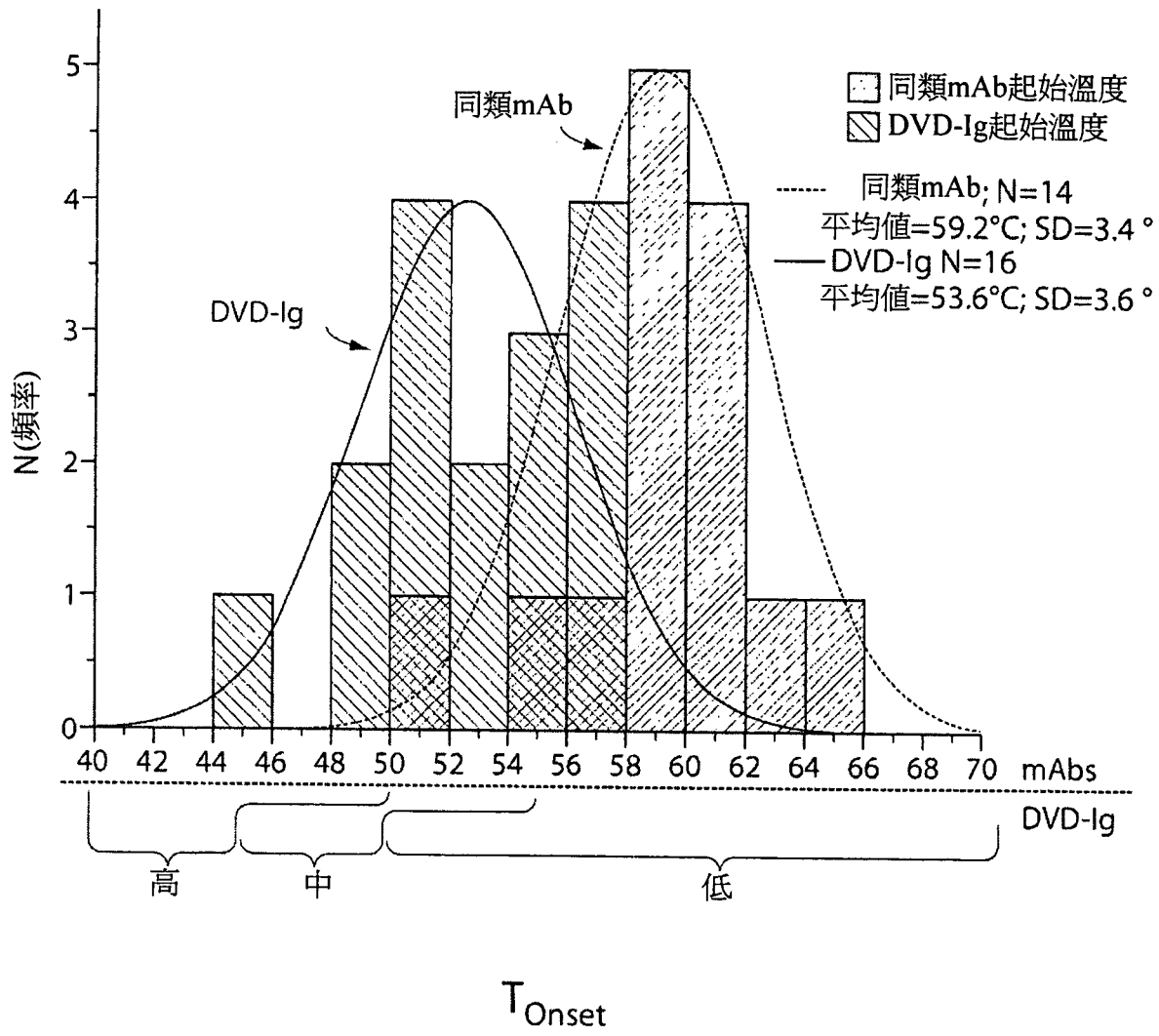


圖4

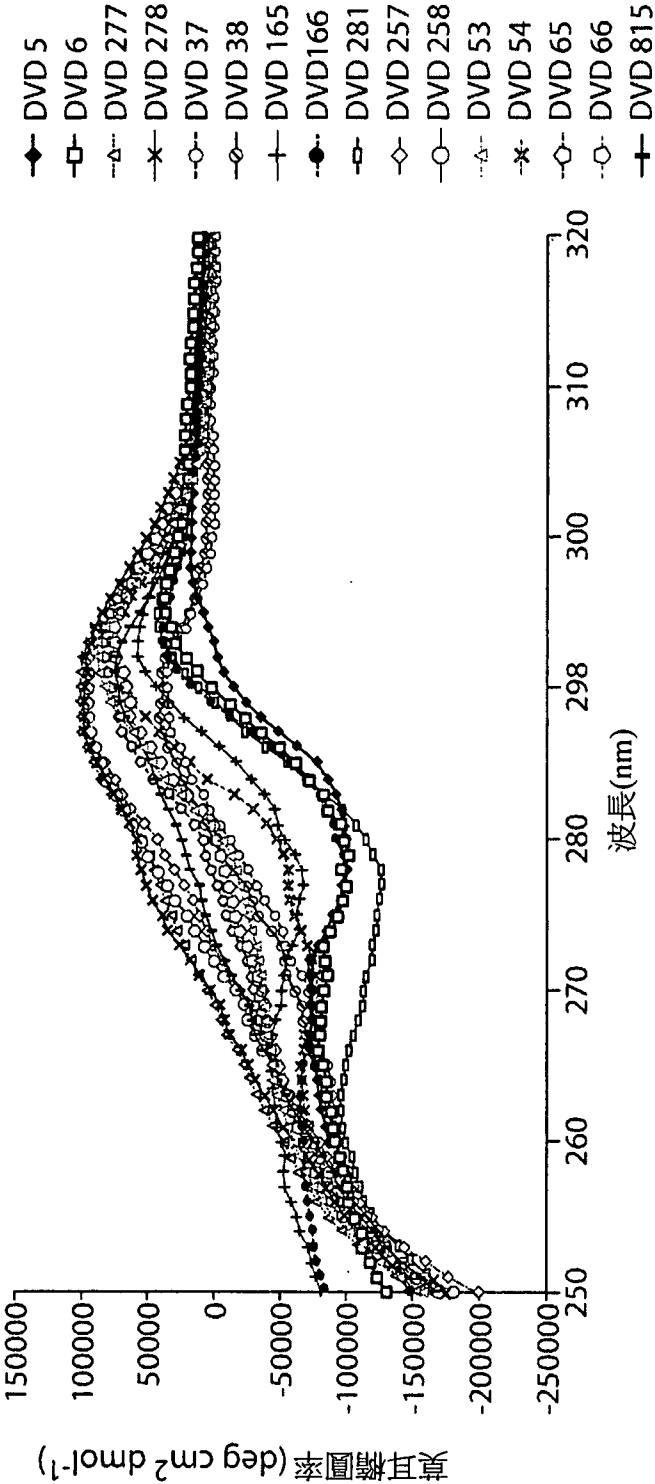


圖5