

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 95713745

※ 申請日期： 95.5.18

※IPC 分類：C07K(b/24)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗-GM-CSF抗體及其用途

ANTI-GM-CSF ANTIBODIES AND USES THEREFOR

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商莫菲西斯公司

MORPHOSYS AG

代表人：(中文/英文)

賽門 摩洛尼

MORONEY, SIMON

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國馬丁史瑞市雷那克里斯街48號

LENA-CHRIST-STRASSE 48, D-82152 MARTINSRIED, GERMANY

國 籍：(中文/英文)

德國 GERMANY

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 史蒂芬 史戴爾
STEIDL, STEFAN
2. 伊莉沙白 湯瑪森-沃夫
THOMASSEN-WOLF, ELISABETH

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2005年05月18日；60/682,009

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供對 GM-CSF 具有特異性之重組抗原結合區、抗體及其功能性片段，GM-CSF 在各種疾病與病症中扮演重要角色。因此此等抗體可用於治療(例如)發炎病症，諸如類風濕性關節炎。本發明抗體亦可用於診斷領域，以及用於進一步研究 GM-CSF 在各種疾病進展中的作用。本發明亦提供編碼前述抗體之核酸序列，含有該等核酸序列之載體、醫藥組合物及具有使用說明之套組。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(6)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗-GM-CSF抗體及其用途。

【先前技術】

顆粒球巨噬細胞群落刺激因子，GM-CSF，最初確定為造血生長因子。其藉由包括淋巴細胞、單核細胞、內皮細胞、纖維母細胞及某些惡性細胞(Metcalf等人，1986；Clark與Kamen，1987；Hart等人，1988；Metcalf等人，1986)之多種細胞類型產生。除對造血前驅體細胞具有生長刺激與分化作用之功能外，亦發現GM-CSF對於表現GM-CSF受體之免疫系統的細胞具有多種作用(參看：Hamilton, 2002; de Groot等人，1998)。此等功能中最重要的是在多種免疫與發炎過程中對單核細胞、巨噬細胞及粒細胞的活化(Gasson等人，1990b；Gasson等人，1990a；Hart等人，1988；Rapoport等人，1992)。

成熟GM-CSF為具有兩個糖基化位點之127個胺基酸之單體蛋白。糖基化之可變度導致分子量在14 kDa與35 kDa之間。非糖基化與糖基化GM-CSF展示類似活體外活性(Cebon等人，1990)。GM-CSF的晶體分析顯示由四個短 α 螺旋組成之桶狀結構(Diederichs等人，1991)。整體折疊類似於其他生長因子，如生長激素、介白素-2及介白素-4。

GM-CSF藉由結合至其受體發揮其生物活性(Kastelein與Shanafelt, 1993；Sisson與Dinarello, 1988)。GM-CSF受體(GM-CSF-R)表現之最重要位點在骨髓細胞與內皮細胞的

細胞表面上，而淋巴細胞為GM-CSF-R陰性。自然受體由至少兩個次單元(α 與 β)組成。 α 次單元賦予配位體特異性且以奈莫耳親和力結合GM-CSF (Gearing等人，1989；Gasson等人，1986)。 β 次單元亦為介白素-3與介白素-5受體錯合物之一部份且與GM-CSF受體 α 次單元與GM-CSF結合，導致以皮莫耳結合親和力形成錯合物(Hayashida等人，1990)。已定位GM-CSF上對於受體之結合域：GM-CSF經由GM-CSF的第一 α 螺旋內非常有限的區域與其受體之 β 次單元相互作用(Shanafelt等人，1991b；Shanafelt等人，1991a；Lopez等人，1991)。至 α 次單元之結合可定位至第三 α 螺旋，螺旋C，結合螺旋C與D之迴路之初始殘基，且定位至GM-CSF的羧基端尾部(Brown等人，1994)。

GM-CSF三聚受體錯合物的形成導致涉及JAK/STAT家族之分子、Shc、Ras、Raf、MAP激酶、磷脂酰肌醇-3-激酶及NF κ B之錯合物訊號級聯的活化，最終導致c-myc、c-fos及c-jun之轉錄。活化主要由受體的 β 次單元誘發(Hayashida等人，1990；Kitamura等人，1991；Sato等人，1993)。共用之 β 次單元亦為造成由IL-3、IL-5及GM-CSF所發揮之重疊功能的原因(參見：de Groot等人，1998)。

除其造血生長與分化刺激活性外，GM-CSF尤其起到前發炎性細胞激素的作用。巨噬細胞與單核細胞以及嗜中性球與嗜酸性球藉由GM-CSF變得活化，導致其他細胞激素與趨化細胞素、基質降解蛋白酶之釋放，增加之HLA表現

及細胞黏附分子或CC趨化細胞素受體增加之表現。後者導致發炎細胞向發炎組織增加之趨化性(Chantry等人, 1990; Hamilton, 2002; Sisson與Dinarello, 1988; Zhang等人, 1998; Hamilton等人, 1993; Lopez等人, 1986; Cheng等人, 2001; Gomez-Cambronero等人, 2003)。GM-CSF通常與其他發炎刺激因子協同發揮其活性, 如其他細胞激素或LPS, 例如用GM-CSF結合(例如)LPS處理之嗜中性球將展示增強之氧化爆發(Kaufman等人, 1989; Rapoport等人, 1992)。

GM-CSF作為抗發炎療法之目標：

由於其在免疫系統中之各種活化功能, GM-CSF可視作抗發炎療法之目標。慢性與急性發炎疾病, 如類風濕性關節炎(RA)、多發性硬化症(MS)、克羅恩氏(Crohn's)病、牛皮癬、哮喘、異位性皮膚炎或中風可很好地受益於對GM-CSF活性之阻斷與隨後GM-CSF響應細胞有害活性之減小(Hamilton, 1993; Zhang等人, 1998; Hamilton, 2002)。

關節炎：

多個組織展示GM-CSF以及其受體存在於關節炎患者的滑動關節內(Alvaro-Gracia等人, 1991; Xu等人, 1989; Haworth等人, 1991)。此外, 在用GM-CSF治療弗耳提氏(Felty's)徵候群中之嗜中性球減少症(Hazenberg等人, 1989)或化療後(de Vries等人, 1991)之患者中顯示GM-CSF造成類風濕性關節炎之紅腫。

阻斷GM-CSF之抗體對於治療關節炎之用途的首先提示

來自小鼠活體內研究(Campbell等人, 1997; Campbell等人, 1998; Cook等人, 2001)。具體而言, Cook等人展示GM-CSF的中和抗體在膠原蛋白誘發關節炎模型中展示功效。對GM-CSF之阻斷導致減輕與發炎、軟骨破壞及初始病肢中疾病進展或進展至其他肢疾病嚴重性。

抗GM-CSF療法具有若干作用, 類風濕性關節炎患者或其他發炎病症患者可受益於抗GM-CSF療法。

阻斷GM-CSF期望用於抑制或減輕:

a) 成熟單核細胞、巨噬細胞及嗜中性球之活化與數目。在滑液與滑膜中尤其存在大量嗜中性球與巨噬細胞。在滑膜中巨噬細胞之數目展示與RA關節中侵蝕程度相關(Mulherin等人, 1996; Burmester等人, 1997)。巨噬細胞為多種其他前發炎性細胞激素與基質降解蛋白酶之來源。藉由嗜中性球產生 H_2O_2 為在關節炎關節中發生之破壞過程的一部份(Babior, 2000)。

b) 骨髓樹狀細胞(DC)之分化與滑膜DC之活化(=滑液細胞)。GM-CSF上調節且保持DC與RA滑膜細胞上之HLA II類之表現(Alvaro-Gracia JM等人, 1991)。在關節內指示DC獲得與發炎T細胞選擇性活化相關之功能。特異HLA-DR等位基因與對RA敏感性相關, 且經由DC抗原呈現之T細胞的活化在此類型免疫疾病中可起重要作用(Santiago-Schwarz等人, 2001)。

多發性硬化症:

在多發性硬化症中, GM-CSF之高水平與MS之活動期相

關 (Carrieri 等人, 1998; McQualter 等人, 2001) 且在對於 MS、實驗性腦脊髓炎、EAE 之模型系統中, GM-CSF^{-/-} 小鼠未能形成疾病 (McQualter 等人, 2001)。

哮喘：

在哮喘中, 已報導在肺中增加量之 GM-CSF (Broide 與 Firestein, 1991)。同時嗜酸性球升高, 其上, GM-CSF 與介白素-5 以三種方式協同作用：i) 其刺激自母細胞至嗜酸性球之分化, ii) 其刺激彼等之功能性活化, 及 iii) 其延長嗜酸性球在肺中的存活 (Broide 等人, 1992; Yamashita 等人, 2002)。因此藉由阻斷 GM-CSF 減小嗜酸性球在哮喘氣管中的存活可改善疾病。抗 GM-CSF 中和抗體的使用進一步在鼠哮喘模型中展示, 其中投與該等抗體導致氣管過響反響及氣管發炎顯著減輕 (Yamashita 等人, 2002)。

在不同小鼠模型中, 肺的 LPS 依賴性發炎可藉由在小鼠中應用抗 GM-CSF 抗體 22E9 減輕 (Bozinovski 等人, 2003)。

毒性效應：

破壞粒細胞/巨噬細胞群落刺激因子 (GM-CSF) 基因的小鼠純合子正常生長且直至 12 週齡未展示較大造血功能擾動。雖然大多數 GM-CSF 缺乏小鼠表面上健康且有生殖能力, 但是皆形成具有經破壞且經減小之膠原蛋白束的紊亂血管細胞外基質及具有經損傷之肺表面活性物質清除及對肺中微生物病原體抗性減弱之不正常肺。後者之病理特徵類似人類疾病肺泡蛋白沉著症 (PAP)。GM-CSF 對於維持主要類型之成熟造血細胞及其在血液、骨髓與脾中前驅體之

正常水平似乎並不至關重要。然而，其暗示 GM-CSF 對於正常血管形成、肺生理學及對局部感染的抗性至關重要 (Stanley 等人，1994；Dranoff 等人，1994；Plenz 等人，2003；Shibata 等人，2001)。最近，自體抗體與具有 PAP 的 GM-CSF 之較強關聯另外暗示在人類 PAP 發病機理中 GM-CSF 訊號異常。總而言之，此等觀察展示 GM-CSF 對於肺中之表面活性劑動態平衡與肺泡巨噬細胞先天免疫功能的調節中起關鍵作用 (Bonfield 等人，2002；Trapnell 與 Whitsett，2002；Uchida 等人，2004；Kitamura 等人，1999)。

對 GM-CSF 具有阻斷活性之自體抗體的高滴定度在重症肌無力患者中描述。此等患者並未展示任何其他的自體免疫現象或造血缺陷或 "其他明顯臨床相關性" (Meager 等人，1999)。

化合物 E21R，拮抗 GM-CSF 作用的 GM-CSF 改質形式，已在 I 期安全試驗中評估且在癌症患者中發現具有良好安全概況 (Olver 等人，2002)。

因此，除了肺功能 (其應經緊密監視) 之外，當應用抗 GM-CSF 療法時，並未預期其他副作用。

迄今，僅產生源自非人類物種具有 GM-CSF 中和功能之抗體。例如，EP 0499161 A1 描述藉由使用寡肽使小鼠免疫所產生之抗體，其序列源自 GM-CSF。此外，該申請案揭示一種對有需要之哺乳動物減輕 GM-CSF 不良作用之方法，其包含投與該哺乳動物 GM-CSF 抑制量之免疫球蛋白

白。然而，該抗體為鼠抗體，使其不適於人類投藥。

另外，WO 03/068920揭示一種抑制嵌合小鼠/人類IgG1抗體。含有非人類序列之抗體可在人類患者引起免疫反應且不適於治療投藥。舉例而言，在需要長期治療之疾病中(例如慢性發炎疾病，如類風濕性關節炎、哮喘與多發性硬化症)，非人類治療劑之持續投藥增加嚴重發炎反應及產生可中和治療劑之人類抗體的可能性。

相應地，考慮到抗GM-CSF抗體療法之巨大潛力，仍極需要具有高親和力之人類抗GM-CSF抗體，其有效地阻斷GM-CSF/GM-CSF受體相互作用。另外，具有可與一或多個非人類物種之GM-CSF交叉作用的一或多個抗體以測試其在基於動物之活體內模型中的功效將係有益的。

本發明藉由提供全面高效抗GM-CSF抗體滿足此等及其他需要，其在下文中描述。

【發明內容】

本發明之一目的在於提供人類及人源化抗體，其可有效阻斷GM-CSF/GM-CSF受體相互作用。

本發明之另一目的在於提供對於人類投藥安全之抗體。

本發明之又一目的在於藉由使用本發明之一或多種抗體提供治療與GM-CSF存在相關之疾病及/或病症之方法。本發明之此等及其他目標在本專利說明書中更全面的描述。

在一態樣中，本發明提供對人類GM-CSF具有特異性之抗原結合區，其中經分離之人類或人源化抗體或其功能性片段可(i)在下列條件下至少50%阻斷0.5 $\mu\text{g/ml}$ 人類GM-

CSF與表現於約 2×10^5 CHO-K1細胞上之人類GM-CSF受體的 α 鏈的相互作用：(a)表現於CHO-K1細胞上之人類GM-CSF受體 α 鏈之濃度類似於表現於約 2×10^5 CHO-GMRa#11細胞上表現之人類GM-CSF受體 α 鏈的濃度，及(b)經分離之人類或人源化抗體或其功能性片段之濃度為約 $5 \mu\text{g/ml}$ ；及(ii)可以小於參考抗體BVD2-21C11及/或參考抗體MAB215至少五倍之 IC_{50} 值在TF-1增殖分析中中和 0.25 ng/ml 人類GM-CSF。如本專利說明書所用之"TF-1增殖分析"定義為大體本上如在實例5B中所述之分析。熟練技術者可藉由遵循本專利說明書所提供之以下教示獲得濃度類似於表現於約 2×10^5 CHO-GMRa#11細胞上之人類GM-CSF受體 α 鏈的濃度之表現人類GM-CSF受體 α 鏈之CHO-K1細胞。

本發明另外提供經分離人類或人源化抗體或功能性抗體片段，其含有如本專利說明書所揭示之抗原結合區。該抗體或其功能性片段可含有一抗原結合區，其含有描繪於SEQ ID NO: 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、49、50、51或52中之H-CDR3區；該抗原結合區可進一步包括描繪於SEQ ID NO: 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、49、50、51或52中之H-CDR2區；且該抗原結合區亦可含有描繪於SEQ ID NO: 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、49、50、51或52中之H-CDR1區。該抗體或其功能性片段可含有一抗原結合區，其含有描繪於SEQ ID NO: 11、12、13、14、15、16、17、

18、19、20、49、50、51或52中之可變重鏈。本發明之GM-CSF特異性抗體可含有一抗原結合區，其含有描繪於SEQ ID NO: 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、58、59、60或61中之L-CDR3區；該抗原結合區可進一步包括描繪於SEQ ID NO: 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、58、59、60或61中之L-CDR2區；且該抗原結合區亦可含有描繪於SEQ ID NO: 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、58、59、60或61中之L-CDR1區。該抗體或其功能性片段可含有一抗原結合區，其含有描繪於SEQ ID NO: 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、58、59、60或61中之可變輕鏈。

本專利說明書所揭示序列之肽變體亦涵蓋於本發明中。因此，本發明包括具有重鏈胺基酸序列之抗GM-CSF抗體，其中：在CDR區與描繪於SEQ ID NO: 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、49、50、51或52中之CDR區具有至少60%的序列一致性；及或在CDR區與描繪於SEQ ID NO: 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、49、50、51或52之CDR區具有至少80%的序列同源性。進一步包括具有輕鏈胺基酸序列之抗GM-CSF抗體，其中：在CDR區與描繪於SEQ ID NO: 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、58、59、60或61中之CDR區具有至少60%序列一致性；及或在CDR區與描繪於SEQ ID NO: 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、58、59、60或61中之CDR區具有至少80%序列同源性。

舉例而言，本發明之抗體可為IgG（例如IgG₁），而抗體片段可為（例如）Fab或scFv。因此，本發明之抗體片段可為或可含有以如本專利說明書所描述之一或多種方式作用的抗原結合區。

本發明亦係關於經分離之核酸序列，其各可編碼對GM-CSF具有特異性之人類或人源化抗體或功能性抗體片段的抗原結合區。該核酸序列可編碼經分離之人類或人源化抗體或其功能性片段之可變重鏈，其包含SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、44、45、46、47或48，或在高度嚴格條件下與SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、44、45、46、47或48之互補鏈雜交之核酸序列。核酸可編碼經分離人類或人源化抗體或其功能性片段之可變輕鏈，其包含SEQ ID NO: 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、53、54、55、56或57，或在高度嚴格條件下與SEQ ID NO: 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、53、54、55、56或57之互補鏈雜交的核酸序列。

核酸序列編碼對人類GM-CSF具有特異性之人類或人源化抗體或功能性抗體片段之抗原結合區，其中抗體或其功能性片段可(i)在下列條件下至少50%阻斷0.5 μg/ml人類GM-CSF與表現於 2×10^5 CHO-K1細胞上之人類GM-CSF受體α鏈之相互作用：(a)表現於該等CHO-K1細胞上之人類GM-CSF受體α鏈之濃度類似於表現於 2×10^5 CHO-GMRa#11細胞上之人類GM-CSF受體α鏈的濃度，及(b)該經分離之

人類或人源化抗體或其功能性片段濃度為約 5 $\mu\text{g/ml}$ ；及 (ii) 可以小於參考抗體 BVD2-21C11 及 / 或參考抗體 MAB215 至少五倍之 IC_{50} 值在 TF-1 增殖分析中中和 0.25 ng/ml 人類 GM-CSF。

本發明之核酸適於重組生產。因此，本發明亦係關於含有本發明之核酸序列的載體及宿主細胞。該等宿主細胞可為細菌或真核細胞。

本發明之組合物可用於治療或預防應用。因此本發明包括含有本發明之抗體(或功能性抗體片段)與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑之醫藥組合物。在一相關態樣中，本發明提供一種用於治療與表現 GM-CSF 或 GM-CSF 之細胞之不當存在相關疾病或病症之方法。該方法含有投與有需要之受檢者有效量的含有本專利說明書所述或所涵蓋之本發明之抗體的醫藥組合物。該疾病或病症可為發炎病症，諸如類風濕性關節炎、多發性硬化症、克羅恩氏病、牛皮癬、哮喘、異位性皮膚炎及中風。

本發明之人類或人源化抗體(及其功能性片段)可與大鼠及 / 或恆河猴(獼猴鼠) GM-CSF 交叉反應，如藉由溶液平衡滴定(SET)及 / 或 TF1 增殖分析所測定。

【實施方式】

本發明基於對 GM-CSF 具有特異性或對 GM-CSF 具有高親和力且具有一或多個其他新穎性質之新穎抗體的發現。較佳地，本發明之抗體可向受檢者傳遞治療益處。可為人類或人源化抗體之本發明之抗體可用於多種情形，其在本專

利說明書中全面描述。

"人類"抗體或功能性人類抗體片段在此定義為並非為嵌合(例如非"人源化")且並非來自(無論整體或部份)非人類物種之抗體。人類抗體或功能性抗體片段可源自人類或可為合成人類抗體。"合成人類抗體"在本專利說明書中定義為在整體上或部份上具有以電腦模擬源自基於已知人類抗體序列之合成序列之序列的抗體。人抗體序列或其片段之電腦模擬設計可(例如)藉由分析人類抗體或抗體片段序列之資料庫與利用自其獲得之資料設計多肽序列而達成。人類抗體或功能性抗體片段之另一實例為藉由自源於人類之抗體序列庫分離的核酸所編碼之抗體或抗體片段(意即，該庫基於取自人類自然源之抗體)。

"人源化抗體"或功能性人源化抗體片段在本專利說明書中定義為(i)源自非人類源之抗體或抗體片段(例如承載異源免疫系統之轉基因小鼠)，其抗體基於人生殖系序列；或者(ii)嵌合抗體或抗體片段，其中可變區源自非人類來源且恆定區源自人類來源或(iii)CDR移植抗體或抗體片段，其中可變區之CDR來自非人類來源，而可變區之一或多個構架為人類來源且恆定區(若存在)為人類來源。

由於結合特異性並非為絕對性質而係相對性質，若該抗體可區別該抗原與一或多個參考抗原，則如本專利說明書所用之抗體"特異結合至"、"對...具有特異性"或"特異識別"抗原(在本專利說明書中為GM-CSF)。在其最一般形式中(且當未提及界定之參考時)，"特異結合"係指抗體分辨相

關抗原與無關抗原之能力，如(例如)根據以下方法中之一者測定。該等方法包括(但不限於)西方墨點法、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-測試及肽掃描。例如可進行標準ELISA分析。可藉由標準顯色進行記分(例如二級抗體與辣根過氧化物及四甲基聯苯胺與過氧化氫)。在特定孔內之反應藉由光密度記分，例如在450 nm。典型背景(=負反應)可為0.1 OD；典型正反應可為1 OD。此意謂正/負差別可大於10倍。通常，結合特異性之測定並非藉由使用一單一參考抗原進行而是藉由使用一組約三至五個無關抗原進行，諸如奶粉、BSA、轉鐵蛋白或其類似物。

然而，"特異結合"亦可指抗體辨別目標抗原與一或多個緊密相關抗原之能力，一或多個緊密相關抗原係用作參考點，例如辨別GM-CSF與IL3、IL5、IL-4、IL13或M-CSF。此外，"特異結合"可關於抗體分辨其目標抗原之不同部份的能力，例如辨別GM-CSF之不同區域或辨別GM-CSF之一或多個關鍵胺基酸殘基或胺基酸殘基段。

同樣，如本專利說明書所用之"免疫球蛋白"(Ig)在此可定義為屬於類別IgG、IgM、IgE、IgA或IgD(或其任何子類)之蛋白質，且包括所有習知抗體與其功能性片段。因此抗體/免疫球蛋白之"功能性片段"在此可定義為保留抗原結合區之抗體/免疫球蛋白之片段(例如IgG之可變區)。抗體之"抗原結合區"通常發現於抗體之一或多個高度變化區，意即CDR-1、-2及/或-3區；然而，可變"架構"區亦可在抗原結合中起重要作用，諸如藉由提供CDR之骨架。較

佳地，"抗原結合區"包含至少可變輕鏈(VL)之胺基酸殘基4至103與可變重鏈(VH)之5至109，更較佳為VL之胺基酸殘基3至107與VH之4至111，且尤其較佳為完整VL與VH鏈(VL胺基酸位置1至109與VH之1至113；編碼根據WO 97/08320)。用於本發明之較佳免疫球蛋白種類為IgG。本發明之"功能性片段"包括F(ab')₂片段、Fab片段、scFv之域或包含單一免疫球蛋白可變區或單一區抗體多肽之結構，例如單一重鏈可變區或單一輕鏈可變區。F(ab')₂或Fab可經設計以最小化或完全移除在C_{H1}與C_L域之間發生的分子間二硫化物相互作用。

本發明之抗體可源自重組抗體庫，其基於經電腦模擬設計且藉由合形成之核酸編碼之胺基酸序列。抗體序列之電腦模擬設計(例如)藉由分析人類序列資料庫與利用自其所得資料設計多肽序列而達成。設計與獲得電腦模擬形成序列之方法描述於(例如)Knappik等人，J. Mol. Biol. (2000) 296:57；Krebs等人，J. Immunol. Methods. (2001) 254:67；及頒予Knappik等人的美國專利第6,300,064號，其以全文引用的方式併入本專利說明書中。

本發明之抗體

在本專利說明書中，參考以下本發明之代表抗體："抗體號"或"MOR" 03684、04251、03929、04252、04287、04290、04302、04350、04354、04357、03682、04283、04297及04342。MOR03684表示具有對應於SEQ ID NO:1 (DNA)/SEQ ID NO: 11 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ

ID NO:21 (DNA)/SEQ ID NO: 31 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04251表示具有對應於SEQ ID NO 2 (DNA)/SEQ ID NO: 12 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 22 (DNA)/SEQ ID NO: 32 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR03929表示具有對應於SEQ ID NO: 3 (DNA)/SEQ ID NO: 13 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 23 (DNA)/SEQ ID NO: 33 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04252表示具有對應於SEQ ID NO: 4 (DNA)/SEQ ID NO: 14 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 24 (DNA)/SEQ ID NO: 34 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04287表示具有對應於SEQ ID NO: 5 (DNA)/SEQ ID NO: 15 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 25 (DNA)/SEQ ID NO: 35 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04290表示具有對應於SEQ ID NO: 6 (DNA)/SEQ ID NO: 16 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 26 (DNA)/SEQ ID NO: 36 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04302表示具有對應於SEQ ID NO: 7 (DNA)/SEQ ID NO: 17 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 27 (DNA)/SEQ ID NO: 37 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04350表示具有對應於SEQ ID NO: 8 (DNA)/SEQ ID NO: 18 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 28 (DNA)/SEQ ID NO: 38 (蛋白質)之可變輕區之抗體。MOR04354表示具有對應於SEQ ID NO: 9 (DNA)/SEQ ID NO: 19 (蛋白質)之可變重區與對應於SEQ ID NO: 29

(DNA)/SEQ ID NO: 39 (蛋白質)之可變輕區之抗體。 MOR04357 表示具有對應於 SEQ ID NO: 10 或 48 (DNA)/SEQ ID NO: 20 (蛋白質)之可變重區與對應於 SEQ ID NO: 30 或 57 (DNA)/SEQ ID NO: 40 (蛋白質)之可變輕區之抗體。 MOR03682 表示具有對應於 SEQ ID NO: 44 (DNA)/SEQ ID NO: 49 (蛋白質)之可變重區與對應於 SEQ ID NO: 53 (DNA)/SEQ ID NO: 58 (蛋白質)之可變輕區之抗體。 MOR04283 表示具有對應於 SEQ ID NO: 45 (DNA)/SEQ ID NO: 50 (蛋白質)之可變重區與對應於 SEQ ID NO: 54 (DNA)/SEQ ID NO: 59 (蛋白質)之可變輕區之抗體。 MOR04297 表示具有對應於 SEQ ID NO: 46 (DNA)/SEQ ID NO: 51 (蛋白質)之可變重區與對應於 SEQ ID NO: 55 (DNA)/SEQ ID NO: 60 (蛋白質)之可變輕區之抗體。 MOR04342 表示具有對應於 SEQ ID NO: 47 (DNA)/SEQ ID NO: 52 (蛋白質)之可變重區與對應於 SEQ ID NO: 56 (DNA)/SEQ ID NO: 61 (蛋白質)之可變輕區之抗體。

在一態樣中，本發明提供具有可特異結合至 GM-CSF 或對 GM-CSF 具有高親和力之抗原結合區之抗體。若親和力量測為至少 100 nM (Fab 片段的單價親和力)，則說明抗體對抗原具有 "高親和力"。本發明之抗體或抗原結合區較佳可以約小於 100 nM 之親和力結合至 GM-CSF，更佳地小於約 60 nM，且仍更佳地小於約 30 nM。進一步較佳為以小於約 10 nM 的親和力結合至 GM-CSF 的抗體，且更佳地為小於

約 3 nM。舉例而言，本發明之抗體排斥 GM-CSF 的親和力可為 10.0 nM 或 1 pM (Fab 片段的單價親和力)。

表 1 提供本發明之代表性抗體親和力的總結，如藉由表面電漿共振 (Biacore) 與溶液平衡滴定 (SET) 分析測定：

表 1：抗體親和力

	Biacore	SET
MOR0	K _D (pM)	K _D (pM)
3684	6420	16000
4251	70	7.4
3929	4260	2000
4302	174	63.5
4287	nd	17.9
4252	55	6
4290	122	11.1
4350	19	1.1
4354	21	2.8
4357	7	0.4
3682	nd	11406
4283	nd	113
4297	nd	49.2
4342	nd	4.9

"nd"：未測定

參看表 1，MOR03684、04251、03929、04252、04357、04290、04302、04350 及 04354 之親和力藉由在固定重組 GM-CSF 上表面電漿共振 (Biacore) 量測。MOR03684、04251、03929、04252、04357、04290、04302、04350 及 04354 之 Fab 格式展示在約 6420 與 7 pM 間之範圍的單價親和力。

Fab 格式亦用於藉由溶液平衡滴定 (SET) 測定親和力。表格 1 之左行表示在此方法中 MOR 約 16000 與 0.4 pM 之間的結

合強度。

本發明之抗體較佳與人類及至少一種其他物種進行物種交叉反應，其他物種可為齧齒類物種或非人類靈長動物。非人類靈長動物可為恆河猴。齧齒類物種可為大鼠。與至少一種齧齒類物種交叉反應之抗體(例如)對於在具有相同抗體之多種物種內進行活體內研究目的可提供優於已知抗GM-CSF抗體之更大靈活性與益處。

較佳地，本發明之抗體僅可結合至GM-CSF，但亦可至少25%阻斷人類GM-CSF與在CHO-K1細胞上表現之人類GM-CSF受體之 α 鏈相互作用，較佳地至少50%，更為較佳地至少60%，更為較佳地至少70%，較佳地至少85%且最佳地至少100%。在一較佳實施例中，本發明之抗體可在以下條件下至少50%阻斷0.5 $\mu\text{g/ml}$ 人類GM-CSF與在約 2×10^5 CHO-K1細胞上表現的人類GM-CSF受體 α 鏈的相互作用：表現於CHO-K1細胞之人類GM-CSF受體 α 鏈的濃度類似於表現於約 2×10^5 CHO-GMRao #11細胞之人類GM-CSF受體 α 鏈的濃度，且本發明之抗體濃度為約5 $\mu\text{g/ml}$ 。

就此而言，熟習此項技術者可藉由(例如)以下方法獲得濃度類似於表現於約 2×10^5 CHO-GMRa#11細胞上之人類GM-CSF受體 α 鏈濃度的表現人類GM-CSF受體 α 鏈之CHO-K1細胞：用編碼GM-CSF受體 α 之適當表現載體轉染CHO-K1細胞的群體以產生表現界定水平GM-CSF受體 α 的不同穩定細胞株；隨後大體上根據在實例3C中所述協定，在FACS分析中分析該等穩定細胞株以測定GM-CSF受體 α 表

現水平；藉由比較該等經轉染細胞之中度螢光值(MFL)與在實例3C中所述之MFL值來確定以類似於表現於約 2×10^5 CHO-GMRa#11細胞上之人類GM-CSF受體 α 濃度之濃度表現人類GM-CSF受體 α 之細胞株。若經轉染細胞株之MFL值並不以兩倍因子偏離在實例3C中所述之對於CHO-GMRa#11細胞的MFL值，則如本專利說明書所用之細胞株定義為以"類似"於在約 2×10^5 CHO-GMRa#11細胞上所表現濃度之濃度表現GM-CSF受體 α 。

此外，本發明抗體在TF-1增殖分析中以低於參考BVD2-21C11及/或MAB215的 IC_{50} 值中和人類GM-CSF，較佳係低於至少5倍之 IC_{50} 值，更佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少10倍的 IC_{50} 值，更佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少15倍的 IC_{50} 值，更佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少20倍的 IC_{50} 值，更佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少30倍的 IC_{50} 值，更佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少50倍的 IC_{50} 值，更佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少100倍的 IC_{50} 值，且最佳地係低於參考BVD2-21C11及/或MAB215至少120倍的 IC_{50} 值。

肽變體

本發明抗體並不限於本專利說明書所提供之特定肽序列。相反，本發明亦包含此等多肽之變體。參看當前之揭示內容與習知可用技術與參考，熟習此項技術者可製備、測試並利用本專利說明書所揭示之抗體的功能性變體，同

時應瞭解具有阻斷 GM-CSF 與 GM-CSF 受體之 α 鏈相互作用之能力的變體系屬於本發明範疇。如本專利說明書所用之 "阻斷 GM-CSF 與 GM-CSF 受體之 α 鏈相互作用之能力" 意謂歸因於本發明抗 GM-CSF 抗體的功能性特徵。

(例如) 與本專利說明書所揭示之肽序列相比，變體可包括具有至少一個更改之互補判定區 (CDR) (高度變化的) 及 / 或構架 (FR) (可變的) 域 / 位置之抗體。為了更好地說明此概念，在下文中簡短描述抗體結構。

抗體係由兩個肽鏈組成，各含有一個 (輕鏈) 或三個 (重鏈) 恆定域與可變區 (VL、VH)，後者在所有情況下由四個 FR 區與三個間隙 CDR 組成。抗原結合位點由一或多個 CDR 形成，而 FR 區提供 CDR 之結構構架且亦可在抗原結合中起重要作用。藉由改變 CDR 或 FR 區之一或多個胺基酸殘基，熟習此項技術者可以例行性方式產生經突變的或多樣化的抗體序列，該等經突變的或多樣化的抗體序列可 (例如) 根據抗原進行篩選，以用於新穎或經改良性質。

表 2a(VH) 與 2b(VL) 描繪本發明之特定抗體之 CDR 與 FR 區並在給定位置比較彼此與相應一致或 "主宰基因" 序列的胺基酸 (如美國專利第 6,300,064 號所述)：

VH

		Framework 3																				CDR 3										Framework 4									
		8																				10										11									
		9																				Bst-H1										Sbf									
		EagI																				W										W									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A										W G Q G T L V T V S									
		T A V Y C A																				R W G G G D G G F V A																			

VL

		Framework 3										Framework 4									
		COR 3																			
Position		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
SEQ ID NO 42	VL3	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 31	3684	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 32	4251	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 33	3929	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 36	4290	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 35	4287	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 34	4252	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 37	4302	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 38	4350	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 39	4354	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 40	4357	I P E R F S	G S	N S G N T A T L T I S G T Q A	E D	E A D Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	V F G G G T K	L T	V L G Q											
SEQ ID NO 63	VL41	V P S R F S	G S	G T D F T L T I S S L Q P E D	F A	T W Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	T F G Q	G T K V E I K R T												
SEQ ID NO 58	3682	V P S R F S	G S	G T D F T L T I S S L Q P E D	F A	V Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	T F G Q	G T K V E I K R T												
SEQ ID NO 59	4283	V P S R F S	G S	G T D F T L T I S S L Q P E D	F A	V Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	T F G Q	G T K V E I K R T												
SEQ ID NO 60	4297	V P S R F S	G S	G T D F T L T I S S L Q P E D	F A	T Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	T F G Q	G T K V E I K R T												
SEQ ID NO 61	4342	V P S R F S	G S	G T D F T L T I S S L Q P E D	F A	T Y Y C	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	T F G Q	G T K V E I K R T												

原始 HuCAL[®] 主宰基因已用其真正 N-末端建構，例如 VL λ 3 在位置 1 與 2 含有胺基酸 "SY"；且 VH3 在位置 1 含有胺基酸 "E"。在建構 HuCAL[®] Fab 庫 (包括 HuCAL GOLD[®] 庫) 期間，首先的兩個胺基酸在 VL λ 3 鏈已變為 "DI"；且第一個胺基酸在 VH3 鏈已變為 "Q"。

熟練技術者可使用表 2a 與 2b 中之資料來設計在本發明之範疇內的肽變體。較佳地，變體藉由在一或多個 CDR 區內改變胺基酸來建構；變體亦可具有一或多個變更之架構區。參考新穎抗體彼此之比較，可改變之候選殘基包括 MOR04251 之 (例如) 可變輕鏈的殘基 27 或 51 與 (例如) 可變重鏈之殘基 32 或 56，因為其為關於彼此變化之位置。亦可在架構區進行變更。舉例而言，肽 FR 域可在與生殖系序列相比在殘基中存在偏差的地方進行變更。

參看新穎抗體與相應一致或 "主宰基因" 序列之比較，可改變之候選殘基包括與 VL λ 3 相比 MOR04251 之 (例如) 可變輕鏈的殘基 27、50 或 90 及與 VH3 相比 MOR04251 之 (例如) 可變重鏈之殘基 33、52 或 96。或者，熟練技術者可使用例如藉由 Knappik 等人 (2000) 與頒予 Knappik 等人之美國專利第 6,300,064 號所述之程序，藉由比較本專利說明書所揭示之胺基酸序列與該等抗體之相同種類的已知序列來做出相同分析。

此外，可藉由使用一 MOR 作為最優化之起始點，藉由使 MOR 中之一或多個胺基酸殘基變化，較佳地使在一或多個 CDR 中之胺基酸殘基變化且藉由在所得抗體變體之集合中

篩選帶有改良性質之變體來獲得變體。尤其較佳地使在VL之CDR-3、VH之CDR-3、VL之CDR-1及/或VH之CDR-2中之一或多個胺基酸變化。可藉由使用三核苷酸誘變(TRIM)技術來合成DNA分子的集合來完成變化(Virnekäs等人, 1994)。

保守胺基酸變體

可使多肽變體保留本專利說明書所述之抗體肽序列的整體分子結構。利用個別胺基酸的性質, 熟練技術者將識別某些合理之替代。可(例如)基於所涉及殘基之極性、電荷、溶解度、疏水性、親水性及/或兩性性質之一致性進行胺基酸取代, 意即"保守取代"。

例如, (a)非極性(疏水性)胺基酸包括丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及甲硫胺酸; (b)極性中性胺基酸包括甘胺酸、絲胺酸、酰胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天冬醯胺酸及麩醯胺酸; (c)正電荷(鹼性)胺基酸包括精胺酸、離胺酸及組胺酸; 及(d)負電荷(酸性)胺基酸包括天冬胺酸及麩胺酸。通常, 取代可在群(a)-(d)中進行。此外, 甘胺酸與脯胺酸可基於其分裂 α 螺旋之能力彼此取代。同樣, 某些胺基酸, 諸如丙胺酸、半胱胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸及離胺酸更通常發現於 α 螺旋中, 而纈胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及酰胺酸更通常發現於 β 折疊中。甘胺酸、絲胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺酸及脯胺酸通常發現於翻轉中。某些較佳取代可在以下群中進行: (i) S與

T；(ii) P與G；及(iii) A、V、L及I。利用遺傳密碼及重組與合成DNA技術，熟練科學家可易於建構編碼保守胺基酸變體之DNA。

如本專利說明書所用之兩多肽序列間之"序列一致性"表示兩序列間相同胺基酸的百分比。"序列同源性"表示相同或表示保守胺基酸取代之胺基酸的百分比。本發明之較佳多肽序列在CDR區具有至少60%序列一致性，更為較佳地至少70%或80%，仍更佳地至少90%且最佳地至少95%。較佳抗體亦在CDR區具有至少80%序列同源性，更佳為90%且最佳為95%。

本發明之DNA分子

本發明亦係關於編碼本發明之抗體的DNA分子。此等序列包括(但不限於)圖1a與2a中所述之彼等DNA分子。

本發明之DNA分子並不限於本專利說明書所揭示之序列，而是亦包括其變體。在本發明內，DNA變體可參考其在雜交中之物理性質描述。因此熟習此項技術者將認識到可利用核酸雜交技術使用DNA來確定其補體(由於DNA為雙鏈)、其均等物或同系物。亦將認識到雜交可以小於100%之互補性發生。然而，利用條件之適當選擇，雜交技術可基於DNA序列與特定探針的結構關聯性用於區別DNA序列。對於關於該等條件之指導參見：Sambrook等人，1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F.與Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA)及

Ausubel等人，1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons)。

兩個多核苷酸序列之結構一致性可作為兩序列彼此雜交條件之"嚴格程度"的函數。如本專利說明書所用之術語"嚴格程度"係指不利於雜交條件之程度。嚴格條件嚴重地不利於雜交且在該等條件下僅在結構上最相關之分子彼此雜交。相反，非嚴格條件有利於展示更低程度之結構關聯性的分子雜交。因此雜交嚴格程度直接與兩核酸序列之結構關係相關。以下關係適於將雜交與關聯性聯繫起來(其中 T_m 為核酸雙鏈體之熔化溫度)：

- a. $T_m = 69.3 + 0.41(G+C)\%$
- b. 隨著不匹配鹼基對數目每增加1%，雙鏈體DNA之 T_m 降低1°C。
- c. $(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18.5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$
其中 $\mu 1$ 與 $\mu 2$ 為兩溶液之離子強度。

雜交嚴格程度為多種因子之函數，包括總DNA濃度、離子強度、溫度、探針大小與分裂氫鍵結之試劑的存在。促進雜交之因子包括高DNA濃度、高離子強度、低溫、更長之探針大小與分裂氫鍵結之試劑的存在。雜交通常在兩個階段執行："結合"階段與"洗滌"階段。

首先，在結合階段，在有利於雜交之條件下將探針結合至目標。通常在此階段藉由改變溫度來控制嚴格程度。對

於較高嚴格程度，除非使用短(< 20 nt)寡核苷酸探針，否則溫度通常在65°C與70°C之間。代表性雜交溶液包括6X SSC, 0.5% SDS, 5X迪哈特(Denhardt)溶液與100 µg非特異性載體DNA。參見 Ausubel 等人，第2.9節，附錄27 (1994)。當然，許多不同但在功能上等效之緩衝條件為已知的。其中關聯性程度愈低，可選擇之溫度越低。低嚴格程度結合溫度為約25°C與40°C之間。中嚴格程度在至少約40°C至小於約65°C之間。高嚴格程度為至少約65°C。

其次，藉由洗滌移除過量探針。在此階段通常應用更嚴格之條件。因此，在經由雜交決定關聯性中此"洗滌"階段最為重要。洗滌溶液通常含有更低之鹽濃度。一例示性中等嚴格程度溶液含有2X SSC與0.1% SDS。高嚴格程度洗滌溶液含有(在離子強度上)小於約0.2X SSC之等效物，且較佳嚴格程度之溶液含有約0.1X SSC。與各種嚴格程度相關之溫度與上文對於"結合"所討論者相同。在洗滌期間，亦通常多次替換洗滌溶液。舉例而言，典型高嚴格程度洗滌條件包括在55°C下洗滌兩次，歷時30分鐘與在60°C下洗滌三次歷時15分鐘。

因此，本發明包括在高嚴格結合與洗滌條件下與圖1a與2a所述分子雜交之核酸分子，其中該等核酸分子編碼具有如本專利說明書所述之性質的抗體或其功能性片段。較佳分子為(自mRNA角度)與在本專利說明書所述之DNA分子中一者具有至少75%或80% (較佳至少85%，更佳至少90%且最佳至少95%)同源性或序列一致性之彼等分子。

在功能上等效之變體

認識到本專利說明書所提供之DNA分子之變體可以多種不同方式建構。舉例而言，其可作為完全合成DNA建構。有效合成在20至約150核苷酸範圍之寡核苷酸的方法為方便易得的。見Ausubel等人，2.11節，附錄21 (1993)。重疊寡核苷酸可以Khorana等人，J. Mol. Biol. 72:209-217 (1971)首先報告之方法合成與組合；亦參見Ausubel等人，上文，8.2節。合成DNA較佳地利用在基因的5'與3'端設計之便利限制點進行設計以幫助選殖入適當載體內。

如所說明，產生變體之方法為自本專利說明書所揭示之DNA中之一者起始且隨後進行定點誘變。參見Ausubel等人，上文，第8章，附錄37(1997)。在一典型方法中，將目標DNA選殖入單鏈DNA噬菌體媒劑內。單鏈DNA經分離且與含有所要核苷酸變更之寡核苷酸雜交。合成互補鏈且將雙鏈噬菌體引入宿主中。某些所得後代將含有所要的突變體，其可使用DNA定序確定。此外，可利用增加後代噬菌體為所要突變體之可能性的各種方法。此等方法對於熟習此項技術者係熟知的且用於產生該等突變體之套組為市售。

重組DNA結構與表現

本發明進一步提供包含一或多個本發明之核苷酸序列之重組DNA結構。本發明之重組DNA結構結合載體使用，該載體諸如質體、噬粒、噬菌體或病毒載體，其中編碼本發明之抗體的DNA分子插入其內。

所編碼之基因可藉由在 Sambrook 等人，1989 與 Ausubel 等人，1989 中所述之技術生產。或者，DNA 序列可使用（例如）合成器化學合成。參見（例如）描述於 OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (1984, Gait 編，IRL Press, Oxford) 中之技術，其以全文引用之方式併入本專利說明書中。本發明之重組結構包括表現載體，其可表現所編碼 DNA 之 RNA 及 / 或蛋白質產物。載體可進一步包括調節序列，包括可操作地連接至開放解讀碼組 (ORF) 之啟動子。載體可進一步包含可選擇標記序列。亦可需要特定起始與細菌分泌訊號來有效轉譯編碼序列之插入目標基因。

本發明進一步提供含有本發明之 DNA 中之至少一者的宿主細胞。宿主細胞實際上可為表現載體可利用之任何細胞。其可為（例如）高級真核宿主細胞（諸如哺乳動物細胞）、低級真核宿主細胞（諸如酵母細胞）或原核細胞（諸如細菌細胞）。可藉由磷酸鈣轉染、DEAE、葡聚糖介導之轉染、電穿孔或噬菌體感染實現將重組結構引入宿主細胞。

細菌表現

細菌用途之適用表現載體藉由在可操作讀取階段使用功能性啟動子插入編碼所要蛋白質之結構 DNA 序列以及適當轉譯起始與終止訊號進行建構。載體將包含一或多個表現型可選擇標記與複製起始點以確保保持載體且（若需要）在宿主內提供擴增。用於轉化之適當原核宿主包括大腸桿菌 (*E. coli*)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 及在假單胞菌屬、鏈黴菌屬及葡

萄球菌屬中之類細菌。

細菌載體可(例如)基於噬菌體、質體或噬粒。此等載體可含有可選擇標記與源自通常含有熟知選殖載體pBR322之要素的市售質體(ATCC 37017)的細菌複製起始點。在適當宿主菌株之轉化與宿主菌株生長至適當細胞密度後，藉由適當方法去抑制/誘發選定啟動子(例如溫度變化或化學誘發)且將細胞培育額外時期。通常藉由離心採集細胞，藉由物理或化學方法破裂細胞且保留所得粗提取物用於進一步純化。

在細菌系統中，取決於所表現之蛋白質的期望用途可有利地選擇多種表現載體。例如，當欲產生大量蛋白質時，為了產生抗體或為了篩選肽庫，(例如)指導易於純化之高水平融合蛋白質產物表現的載體可為所要的。

治療方法

治療方法涉及投與需要治療之受檢者治療有效量之本發明涵蓋之抗體。本專利說明書之"治療有效"量定義為抗體之量，其為(作為單次劑量或根據多劑量療法，單獨或與其他藥劑組合)足以在受檢者之治療區域有效阻斷GM-CSF與其受體間相互作用之量，其導致不良狀況減輕，但該量在毒理學上係可耐受的。受檢者可為人類或非人類動物(例如大鼠或恆河猴)。

本發明之抗體可與已知藥劑共同投藥且在某些情況下抗體自身可經改質。例如，抗體可與免疫毒素或放射性同位素相結合以潛在地進一步提高功效。

本發明之抗體可在其中 GM-CSF 經不當表現或發現之多種情況中用作治療或診斷工具。尤其適於以本發明之抗體治療之疾病與病症為發炎疾病，諸如類風濕性關節炎 (RA)、多發性硬化症、克羅恩氏病、牛皮癬、哮喘、異位性皮炎或中風。

為治療前述疾病中之任一者，可使用一或多種生理學上可接受之載劑或賦形劑以習知方式調配根據本發明使用之醫藥組合物。本發明之抗體可藉由任何適當方法投藥，其可視治療之疾病類型發生變化。可能投藥途徑包括非經腸投藥 (例如肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下)、肺內及鼻內，且 (若需要) 用於局部免疫抑制治療、病灶內投藥。此外，本發明之抗體可藉由脈動輸液以 (例如) 減小劑量之抗體投藥。較佳地，藉由注射給藥，最佳經靜脈內或皮下注射，部份取決於投藥為短期或長期。投藥之量將取決於多種因子，諸如臨床症狀、個體重量、是否投與其他藥物。熟練技術者將認識到投藥途徑將視欲治療之疾病或病症而變化。

根據本發明，新穎多肽之治療有效量之決定將主要取決於特定患者特徵、投藥途徑及所治療疾病之性質。通用指南可發現於 (例如) International Conference on Harmonisation 公開案與 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第 27 與 28 章，第 484-528 頁 (第 18 版，Alfonso R. Gennaro 編，Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990) 中。更具體而言，治療有效量之決定將取決於諸如該藥劑之毒性與

功效之因子。毒性可使用在此項技術中熟知的且見於前述參考中之方法進行測定。可利用相同指南結合在下文實例中所述之方法測定功效。

診斷方法

GM-CSF藉由各種細胞類型表現，包括淋巴細胞、單核細胞、內皮細胞、纖維母細胞及某些惡性細胞；因此可採用本發明之抗GM-CSF抗體以使在患者不同組織中GM-CSF可積聚之點成像或顯現。就此而言，可經由使用放射性同位素、親和標記(諸如生物素、抗生物素蛋白等)、螢光標記、順磁性原子等對抗體進行可偵測標記。完成該標記之程序在此項技術中為熟知的。抗體在診斷成像中之臨床應用藉由Grossman, H. B., Urol. Clin. North Amer. 13:465-474 (1986)), Unger, E. C等人，Invest. Radiol. 20:693-700 (1985))，及Khaw, B. A.等人，Science 209:295-297 (1980))評述。

該可偵測地標記抗體之變異區的偵測可(例如)表現出發炎位點。在一實施例中，藉由移除組織或血液樣品並在可偵測標記抗體之存在下培育該等樣品來完成此檢驗。在一較佳實施例中，此技術經由使用磁成像、螢光攝影術等以非侵入性方法進行。該診斷測試可用於監控疾病治療成果，其中GM-CSF的存在與否為一相關指示劑。本發明亦涵蓋抗GM-CSF抗體之用途，如本專利說明書所述在體外裝置中用於診斷。

治療與診斷組合物

本發明之抗體可根據已知方法調配以製備醫藥學上有用之組合物，其中本發明之抗體(包括其任何功能性片段)與醫藥學上可接受之載體媒劑組合為混合物。適當媒劑及其調配物描述於例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (第18版，Alfonso R. Gennaro編，Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990)。為了形成適於有效投藥之醫藥學上可接受之組合物，該等組合物將含有有效量之本發明之一或多種抗體，以及適當量之載體媒劑。

可適當地調配製劑以得到活性化合物控釋。控釋製劑可藉由使用聚合物以錯合或吸收抗GM-CSF抗體而達成。可藉由選擇適當巨分子(例如聚酯、聚胺基酸、聚乙烯、吡咯啉酮、乙烯醋酸乙烯酯、甲基纖維素、羥甲基纖維素或魚精蛋白、硫酸酯)及巨分子之濃度以及為了控釋之結合方法來實施控制傳遞。藉由控釋製劑控制作用持續時間的另一可能方法為將抗GM-CSF抗體併入聚合材料之粒子內，諸如聚酯、聚胺基酸、水凝膠、聚(乳酸)或乙烯醋酸乙烯酯共聚物。或者，代替該等試劑併入聚合粒子內，可將該等材料裹入(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合而製備之微囊內，例如分別為羥甲基纖維素或明膠微囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊，或裹入膠體藥物傳遞系統，例如，脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米粒子及奈米囊中或裹入巨乳液中。該等技術揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)中。

該等化合物可經調配用於藉由注射之非經腸投藥，例如

藉由快速注射或連續輸液。用於注射之調配物可與添加之防腐劑以單位劑型形式呈現，例如於安瓿內或多劑量容器內。組合物可為諸如在油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式且可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，活性成份可為粉劑形式以在使用前與適當媒劑(例如無菌無熱源水)調配。

若需要，該等組合物可存在於包裝袋內或分配器裝置內，其可含有一或多個含有活性成份之單位劑型。包裝袋可(例如)包含金屬或塑料箔，諸如發泡包裝袋。包裝袋或分配器裝置可附有投藥說明書。

藉由參考以下工作實例來進一步理解本發明，該等工作實例僅用於說明目的且因此並不限制本發明。

實例

實例1：自HuCAL GOLD[®]庫產生人類GM-CSF特異抗體

A. 噬粒拯救、噬菌體擴增與純化

在含有34 $\mu\text{g/ml}$ 氯黴素與1%葡萄糖(2xYT-CG)之2xYT培養基中擴增HuCAL GOLD[®]庫。在以0.5 OD₆₀₀ (在37°C下無振盪30分鐘；在37°C以250 rpm振盪30分鐘)之輔助噬菌體感染(VCSM13)之後，將細胞下旋(spun down) (4120 g; 5 min; 4°C)，再懸浮於2xYT/34 $\mu\text{g/ml}$ 氯黴素/50 $\mu\text{g/ml}$ 康黴素/0.25 mM IPTG中且在22°C下生長隔夜。噬菌體自上清液PEG沉澱，再懸浮於PBS/20%甘油中且在-80°C下儲存。在兩次淘選間之噬菌體擴增按照以下方式進行：用溶離噬菌體感染中對數期大腸桿菌TG1細胞且塗至補充有1%葡萄

糖與 34 $\mu\text{g/ml}$ 氯黴素之 LB 瓊脂上。在 30°C 下培育隔夜後，刮掉群落且用於接種 2xYT-CG 直至達到 0.5 之 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 且如上文所述添加輔助噬菌體。

B. 用 HuCAL GOLD® 進行淘選

為選擇識別人類 GM-CSF 之抗體，應用多種淘選策略。總之，將 HuCAL GOLD® 抗體噬菌體分為三個包括不同 VH 主宰基因之庫。此等庫個別地經受 a) 將生物素標記人類 GM-CSF 蛋白質 (由 R&D Systems 定製，Minneapolis, MN) 淘選之固相直接塗覆於經中性鏈親和素塗覆之 96 孔盤 (Pierce, Rockford, IL) 上作為固體支撐體用於三輪，或者 b) 將生物素標記人類 GM-CSF 蛋白質淘選之溶液捕獲至經抗生蛋白鏈菌素塗覆之 Dynabead (Dynal, Oslo, Norway) 上用於三輪。

詳言之，對於在固定生物素標記 GM-CSF 上之淘選，中性鏈親和素盤上之孔用 300 μl PBS 洗滌三次。在 PBS 中將抗原稀釋至 3 $\mu\text{g/ml}$ (200 nM) 之濃度且在室溫下每孔塗覆 0.1 ml，歷時 2 小時。在使用 300 μl PBS 之兩個洗滌步驟之後，用含有 2x Chemiblocker (Chemicon, Temecula, CA) 在 PBS 中稀釋為 1:1 之阻斷緩衝液培育該等孔。

在選擇之前，在室溫下在含有 0.4 μl 25% Tween20 之 100 μl 阻斷緩衝液中預吸附 100 μl HuCAL GOLD® 噬菌體 0.5 小時。在室溫下，以 100 μl 等分試樣將經阻斷噬菌體轉移至中性鏈親和素盤之孔內保持 0.5 小時。重複此步驟兩次以進行預吸附。

在洗滌($2 \times 300 \mu\text{l}$ PBS)經塗覆與經阻斷中性鏈親和素微量滴定盤之後，將 0.1 ml 預吸附噬菌體添加至經塗覆孔內且在室溫下輕輕振盪培育 1.5 小時。培育之後，在室溫下用PBS/ 0.05% Tween20洗滌 10 次。

藉由在室溫下在每孔內添加 $120 \mu\text{l}$ 20 mM DTT之 10 mM Tris pH 8.0 溶液使經結合之噬菌體溶離 10 分鐘。移除洗出液且將其添加至生長至 $0.6-0.8$ 之 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 之 14 ml 大腸桿菌TG1。另外用 $200 \mu\text{l}$ PBS洗滌孔且亦將此溶液添加至TG1細胞。允許大腸桿菌之噬菌體感染在 37°C 下無振盪情況下進行 45 分鐘。另外，生長至 $0.6-0.8$ 之 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 之 $200 \mu\text{l}$ TG1細胞添加至選擇孔，在 37°C 下無振盪情況下保持 45 分鐘。將此等TG-1細胞添加至已含有自第一溶離步驟之噬菌體的 14 ml 培養液中。在以 5000 rpm 離心 10 分鐘之後，將細菌離心塊各再懸浮於 $500 \mu\text{l}$ $2 \times \text{YT}$ 培養基中，塗於 $2 \times \text{YT-CG}$ 瓊脂盤上且在 30°C 下培育隔夜。隨後自盤上刮下群落且拯救噬菌體且如上文所述進行擴增。

第二與第三輪選擇以與第一輪選擇相同之方法進行，唯一區別為在噬菌體結合後之洗滌條件更為嚴格。此外，在第三輪選擇中，噬菌體在經抗生蛋白鏈菌素塗覆之珠粒(Dynabeads M-280; Dynal)上經受額外預吸附步驟。用Chemiblocker溶液藉由在室溫下培育 30 分鐘阻斷離心管。對於每一噬菌體庫，將 0.3 ml 噬菌體與含有 0.05% Tween20之 $2 \times \text{Chemiblocker}$ 溶液 $1:1$ 混和且在一旋轉器上在經阻斷離心管內在室溫下培育 1 小時。隨後，將經阻斷之噬菌體轉

移至新經阻斷離心管且添加 50 μ l Dynabeads M-280，再保持 30 分鐘以進行預吸附。使用磁裝置(Dynal MPC-E)移除珠粒。隨後將 150 μ l 噬菌體之等分試樣轉移至中性鏈親和素盤用於進一步預吸附，如第一輪與第二輪(參見上文)。

對於使用偶合至 Dynabead 之生物素標記 GM-CSF 之溶液淘選，應用以下協定：在 4°C 下將 1.5 ml 離心管用 1.5 ml 2xChemiblocker (用 PBS 1:1 稀釋)阻斷隔夜。用 200 μ l PBS 洗滌 200 μ l 抗生蛋白鏈菌素塗覆之磁珠粒(Dynabeads M-280; Dynal)1 次且再懸浮於 200 μ l 1xChemiblocker (稀釋於 1x PBS 中)中。在 4°C 下在預阻斷管中將珠粒阻斷隔夜。在室溫下，將用於每一淘選條件稀釋於 500 μ l PBS 中之噬菌體與 500 μ l 2xChemiblocker/0.1% 吐溫混和 1 小時(旋轉器)。進行兩次噬菌體預吸附：將 50 μ l 經阻斷抗生蛋白鏈菌素磁珠粒添加至經阻斷噬菌體且在室溫下在旋轉器上培育 30 分鐘。在經由磁性裝置(Dynal MPC-E)分離珠粒之後，將噬菌體上清液(~1ml)轉移至新阻斷管且在 50 μ l 經阻斷珠粒上重複預吸附 30 分鐘。隨後，將 200 nM 生物素標記 hGM-CSF 添加至在新經阻斷 1.5 ml 管內的經阻斷噬菌體且在室溫下在旋轉器上培育 1 小時。將 100 μ l 經阻斷抗生蛋白鏈菌素磁珠粒添加至各淘選噬菌體庫且在室溫下在旋轉器上培育 10 分鐘。結合至生物素標記 GM-CSF 且因此固定至磁珠粒之噬菌體藉由磁性粒子分離器(Dynal MPC-E)收集。隨後使用旋轉器在 PBS/0.05% Tween 中洗滌珠粒 7 次，隨後用 PBS 再洗滌三次。進行噬菌體自 Dynabead 之溶離，

向各管添加 300 μ l 20 mM DTT於 10 mM Tris/HCl pH值 8 中之溶液保持 10 分鐘。藉由磁性粒子分離器移除 Dynabead 且將上清液添加至生長至 0.6-0.8 OD_{600 nm}之 14 ml 大腸桿菌 TG-1 培養液中。隨後用 200 μ l PBS 洗滌珠粒一次且將含有額外經移除噬菌體之 PBS 添加至 14 ml 大腸桿菌 TG-1 培養液中。

在以 5000 rpm 離心 10 分鐘之後，將細菌離心塊各懸浮於 500 μ l 2xYT 培養基中，塗於 2xYT-CG 瓊脂盤上且在 30°C 下培育隔夜。隨後，自盤上刮下群落且拯救噬菌體並如上文所述擴增。

除了增加洗滌程序之嚴格程度外，根據第一次淘選之協定在生物素標記 GM-CSF 上進行第二與第三輪溶液淘選。

C. 選定 Fab 片段之次選殖及可溶 Fab 片段之表現

將選定 HuCAL GOLD[®] 噬粒之 Fab 編碼插入部份次選殖入表現載體 pMORPH[®]X9_Fab_FH (圖 5) 內以幫助可溶 Fab 之快速表現。選定純系之 DNA 經 XbaI 與 EcoRI 消化，藉此切斷 Fab 編碼插入部份 (ompA-VLCL 與 phoA-Fd)，且選殖入經 XbaI/EcoRI 消化載體 pMORPH[®]X9_Fab_FH 內。在此等載體內表現之 Fab 承載兩個 C-末端標記 (分別為 FLAG[™] 與 6xHis) 用於偵測與純化。

D. HuCAL GOLD[®] Fab 抗體在大腸桿菌內之微表現

在次選殖入 pMORPH[®]X9_Fab_FH 後獲得之單一群落用於接種每孔含有 100 μ l 2xTY/Cm/1% Glu 培養基的無菌 96 孔微量滴定盤之孔且在 37°C 下生長隔夜。將 5 μ l 各 TG-1 大

腸桿菌培養液轉移至每孔含有100 μ l 2xTY/Cm/0.1% Glu培養基之新無菌96孔微量滴定盤。在30°C下在微盤振盪器上以400 rpm振盪培育微量滴定盤直至培養液以0.5之OD_{600 nm}略微混濁(~2-4小時)。

向此等表現盤每孔添加20 μ l 2xYT/Cm/3 mM IPTG (最終濃度0.5 mM IPTG)，用透氣膠帶密封且以400 rpm振盪在30°C培育隔夜。

整體細胞溶解液之產生(BEL萃取物)

在表現盤之各孔添加含有2.5 mg/ml溶菌酶之40 μ l BEL緩衝液(2xBBS/EDTA: 24.7 g/l硼酸、18.7 g NaCl/l、1.49 g EDTA/l、pH值8)且在微量滴定盤振盪器(400 rpm)上在22°C下培育1小時。將BEL萃取物用於藉由ELISA或BioVeris M-series® 384分析器之結合分析(參見實例2)。

E. HuCAL® GOLD Fab抗體在大腸桿菌中之表現與純化

藉由pMORPH®X9_Fab_FH編碼之Fab片段在TG-1細胞中之表現在具有補充有34 μ g/ml氯黴素之1公升2xYT培養基的搖瓶培養液中進行。在用0.5 mM IPTG誘發之後，使細胞在22°C下生長16小時。細胞離心塊之整體細胞提取物藉由法式壓碎機與藉由鎳/NTA層析(Qiagen, Hilden, 德國)分離之Fab片段製備。由UV-分光光度計測定濃度(Krebs等人, 2001)。

實例2：hGM-CSF特異抗體之鑒別

藉由上述淘選策略選定之個別大腸桿菌純系的BEL萃取物藉由ELISA或BioVeris (BioVeris M-series® 384分析器)分

析以鑒別編碼 hGM-CSF 特異 Fab 之純系。

A. 酵素結合免疫吸附分析(ELISA)技術

在室溫下，以 1.5 µg/ml PBS 溶液將人類重組生物素標記 GM-CSF (R&D Systems) 塗覆至中性鏈親和素微量滴定盤上 2 小時。

在塗覆抗原之後，在室溫下將孔用 PBS/0.05% Tween (PBS-T) 與 1% BSA 阻斷 1 小時。在用 PBS-T BEL 萃取物洗滌孔之後，在 PBS 中稀釋純化 HuCAL[®] Fab 或對照 IgG，添加至孔且在室溫下培育 1 小時。為偵測初級抗體，應用以下二級抗體：鹼性磷酸酶 (AP) 共軛 AffiniPure F(ab')₂ 片段、山羊抗人類、抗小鼠或抗大鼠 IgG (Jackson Immuno Research)。為偵測 AP 共軛物，根據製造商說明書，使用如 AttoPhos (Roche) 之螢光基質。在所有培育步驟之間，用 PBS-T 洗滌微量滴定盤的孔三次且在用二級抗體最終培育後洗滌三次。在 TECAN 微量滴定盤讀取器內 (Spectrafluor plate reader) 量測螢光。

B. 基於電化學發光(BioVeris)之結合分析用於偵測在溶胞物中之 GM-CSF 結合 Fab

代替用於偵測在大腸桿菌溶胞物 (BEL 萃取物) 中 GM-CSF 結合 Fab 抗體之 ELISA 實驗，在 BioVeris M-SERIES[®] 384 分析器 (Analyzer BioVeris, Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 中，對結合進行分析。

在分析緩衝液 (PBS/0.05% Tween 20/0.5% BSA) 中以最小 1:50 且最大 1:1000 稀釋此最終 BEL 萃取物以用於 BioVeris 篩

檢。以 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度將生物素標記 GM-CSF (R&D Systems) 偶合至經抗生蛋白鏈菌素塗覆之順磁珠粒，Dynabead (Dyna) 。96 或 384 孔盤每孔使用 25 或 15 μl Dynabead 儲備溶液之 1:25 稀釋液。在室溫下在振盪器上添加生物素標記 GM-CSF 30 分鐘之前將珠粒用分析緩衝液洗滌三次。隨後，珠粒用分析緩衝液洗滌三次且最終再懸浮於新分析緩衝液中。使用 BV-tagTM (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 對抗人類 (Fab)'₂ (Dianova) 進行釘標記。在即將使用前將此二級抗體添加至濃度為 6 $\mu\text{g/ml}$ 之經 GM-CSF 偶合珠粒。將含有 Fab 抗體之大腸桿菌表現培養液之 100 μl 或 60 μl 經稀釋 BEL 萃取液 (見上文) 分別注入 96 或 384 孔盤之孔內，向各孔添加 25 或 15 μl 經 GM-CSF 偶合珠粒與抗 Fab-BV-tagTM 二級抗體之混合物且在盤振盪裝置上在室溫下培育 2 小時。在 BioVeris M-SERIES[®] 384 分析器內分析該等盤。

在序列分析後，七十四 (74) 個獨特純系經鑑別，其展示足夠強之結合 (在 ELISA 中訊號: 雜訊比大於 10:1 或者在 BioVeris 中 50:1)。此等純系經表現、純化，並在功能性分析中經測試。

C. 經選定抗 hGM-CSF Fab 之分子特異性與物種交叉反應性之的測定

對以下分析物測定抗 hGM-CSF 抗體之交叉反應性：大鼠與小鼠 GM-CSF、人類 IL-3、人類 IL-4、人類 IL-5、人類 IL-13、人類 M-CSF (皆來自 Peprotech, London, UK)。此係

藉由表面電漿共振(Biacore 3000, Uppsala, Sweden)在捕獲裝置中執行。

使用標準EDC-NHS胺偶合化學，將CM5晶片(Biacore, Sweden)塗覆5000-6000RU抗F(ab)₂ (Dianova, Affinipure F(ab)₂片段山羊抗人類IgG，F(ab)₂片段特異)；80 µg/ml 10 mM乙酸緩衝液(所有4個流槽中pH值為4)。在流槽2-4上，捕獲特異GM-CSF Fab (20 µl 500 nM Fab 流率為5 µl/ml，300-400RU)。在捕獲特異Fab後，注射緩衝液以測定抗Fab/Fab的相互作用之解離。在隨後循環中，以15與2000 nM間之濃度範圍注射分析物生長因子(20 µl，流率20 µl/min)以測定特異訊號。隨後，自特異訊號中手動減去所得緩衝液感應圖。在各循環後，流槽用100 mM HCl (5µl)進行再生。

測試包括MOR03684與MOR03682之七個HuCAL[®]抗hGM-CSF抗體，該等抗體對人類GM-CSF具有特異性，且並不會結合至其他細胞激素或小鼠或大鼠GM-CSF中之任一者。相反地，Fab MOR03929對大鼠GM-CSF顯示具有顯著交叉反應性。

實例3：抑制GM-CSF與GM-CSF受體 α 間之相互作用的抗人類GM-CSF Fab候選者之鑒別

74個選自HuCAL GOLD[®]庫之不同hGM-CSF特異抗體經測試對抑制hGM-CSF與其受體間之相互作用的效力。以兩種方式測試相互作用，(i)一種為使用GM-CSF依賴性TF-1細胞株之增殖分析(Kitamura等人，1989)且(ii)另一種為使

用表現 GM-CSF 受體 α 鏈之重組 CHO 細胞株的 FACS 分析。在 TF-1 增殖分析中，抗 GM-CSF 抗體阻斷 GM-CSF 與由 α 與 β 鏈組成之內因性 GM-CSF 受體之相互作用的能力經分析導致細胞增殖之減少。在 FACS 分析中，測定 GM-CSF 與 GM-CSF 受體 α 鏈間相互作用之特異抑制。

A. 獼猴 (*macaca mulatta*) 與人類 GM-CSF 之選殖與表現

藉由基因合成 (geneART GmbH, Regensburg, 德國) 來合成獼猴 GM-CSF 全長 cDNA (GenBank accession no; AY007376) 且選殖入 pCR-Script-Amp 載體內 (Stratagene, LaJolla, CA, USA)。隨後，將 cDNA 選殖入真核表現載體 pcDNA3.1(+) 內 (Invitrogen, Paisley, UK) 得到 pcDNA-macGM-CSF。將人類 GM-CSF 之 cDNA (GenBank accession no. NP_000749) 藉由自 Qiagen (Hilden, 德國) 之 RNeasy 套組藉由 RT-PCR 技術自從 1×10^7 TF-1 細胞分離之 RNA 選殖。在藉由 PCR 進行 GM-CSF cDNA 擴增之後，使用隨機六聚體 (Gibco) 藉由 SuperscriptII 套組進行逆轉錄。將所得 PCR 產物選殖入表現載體 pcDNA3.1(+) 內得到 pcDNA-huGM-CSF。

使用 lipofectamine (Stratagene, LaJolla, USA) 分別藉由此等表現載體瞬時轉染 HEK293 細胞。在轉染後 4 天採集含有分泌重組獼猴或人類 GM-CSF 之培養基。

B. 使用人類或獼猴 GM-CSF 藉由抗 hGM-CSF Fab 抑制 TF-1 細胞之 GM-CSF 依賴性增殖

根據供應者協定 (DSMZ, Braunschweig, 德國; DSMZ

No. ACC 334)生長TF-1 (Kitamura等人, 1989)細胞。用RPMI1640培養基(10% FCS)洗滌TF-1細胞兩次且隨後在平底96孔細胞培養盤內以 2×10^5 個細胞/毫升之濃度以50 μ l每孔進行播種。0.5 ng/ml之人類重組GM-CSF ("Leucomax", ESSEX Pharma, München)與HuCAL[®] Fab抗體(200ng/ml-200 μ g/ml稀釋於RPMI1640培養基中, 10% FCS)混和30分鐘且將50 μ l混合物添加至TF-1細胞, 使得GM-CSF之最終濃度為0.25 ng/ml。以0.25 ng/ml最終GM-CSF濃度培育TF-1細胞, 不添加抗體, 量測最大細胞增殖(0%抑制)。藉由自分析中省去GM-CSF且保持細胞僅在RPMI1640培養基(10% FCS)中量測對TF-1增殖之100%抑制。隨後在37°C下, 在潮濕腔室內用5% CO₂培育TF1細胞72小時。根據製造商建議藉由添加MTT或XTT試劑(Roche, Mannheim, 德國)量測細胞活力。一共鑒別19個Fab, 其對TF-1增殖展示顯著抑制。黏合劑MOR03682、MOR03684及MOR03929在2 μ M之濃度展示對TF1細胞增殖大於50%的一致抑制。此等非最佳化Fab之抑制活性並不足夠強以測定IC₅₀劑量, 因為不能達成完全抑制。相比較而言, 單株抗體BVD2-21C11 (BD Biosciences Pharmingen; Cat#554503) 與MAB215(R&D Systems; Cat#MAB215)可完全抑制TF-1增殖。

另外, 在TF-1增殖分析中測試MOR03682與MOR03684至自然人類GM-CSF之結合。代替向TF-1細胞添加純化人類重組GM-CSF, 將分泌自然人類GM-CSF之5637細胞

(DSMZ No. ACC 35)的上清液添加至所用培養基內。自比較重組人類 GM-CSF 與 5637 上清液之不同稀釋液之作用的劑量效應曲線，測定培養基含有約 5 ng/ml 之自然人類 GM-CSF。藉由用抗人類 GM-CSF Fab MOR03682 或 MOR03684 預培育 5637 上清液，自然人類 GM-CSF 至 TF-1 細胞之結合經阻斷使得與重組人類 GM-CSF 的實驗相比細胞生存力經減弱。因此 MOR03684 與 MOR03682 結合至自然人類 GM-CSF。在此分析中未測試 Fab MOR03929。

此外，在 TF-1 增殖分析中測試對獼猴 GM-CSF 的交叉反應性。代替添加純化人類 GM-CSF 至 TF-1 細胞，將分泌重組獼猴 GM-CSF 之經轉染 HEK293 細胞之上清液添加至所用培養基內。

在含有獼猴 GM-CSF 之上清液存在下而非在自非轉染 HEK293 細胞的上清液存在下 TF-1 細胞增殖。自比較重組人類 GM-CSF 與 HEK-293 培養基之不同稀釋液之作用的劑量反應曲線，測定經轉染細胞之培養基含有約 2 µg/ml 獼猴 GM-CSF。藉由用抗人類 GM-CSF Fab MOR03682 或 MOR03684 預培育獼猴 GM-CSF 上清液，獼猴 GM-CSF 至 TF-1 細胞之結合經阻斷使得細胞生存力顯著減小。因此 MOR03682 及 MOR03684 與獼猴 GM-CSF 進行交叉反應。在此分析中並未測試 Fab MOR03929。

C. 藉由抗 hGM-CSF Fab 阻斷 GM-CSF 至 GM-CSF 受體 α 的結合

為測試 GM-CSF 至表現 GM-CSF 受體 α 鏈之細胞表面的結

合，將cDNA選殖入表現載體內且穩定轉染至CHO-K1細胞內(DSMZ ACC 110)。

表現GM-CSF受體之 α 鏈的穩定CHO-K1細胞株之選殖

人類GM-CSF受體 α 鏈的cDNA (GenBank accession no. M64445)使用自Qiagen (Hilden, 德國)的RNeasy套組藉由RT-PCR技術自從 1×10^7 TF-1細胞分離之RNA選殖。使用隨機六聚體(Gibco)藉由SuperscriptII套組進行逆轉錄。隨後使用以下引子擴增GM-CSF受體 α 鏈cDNA：

5':N-GCRa-plusSS:TTCTCTGGATCCGCCACCATGCTTCTC
CTGGTGACAAGCC與3':C-flGCRa:ACCCTCCAATTGTCAG
GTAATTTTCCTTCACGGTC。

PCR反應產生約1250 bp之產物，其經EcoRI與BamHI (New England BioLabs)消化。使用相同酶消化表現載體pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Paisley, UK)。在純化經消化載體與PCR產物之後，藉由電穿孔將片段接合並轉移至大腸桿菌DH10B細胞內。在製備質體DNA且定序之後，確定正確之純系。正確純系(pcDNA3.1(+)-GM-CSFR α)含有全長人類GM-CSF受體 α cDNA。

根據供應者協定(DSZM, Braunschweig, 德國; DSMZ No. ACC 110)生長CHO-K1細胞。對於轉染，細胞在6孔盤內生長至80% 融合且用5 μ g混有10 μ l Lipofectamine 2000試劑(Invitrogen)之pcDNA3.1(+)-GM-CSFR α 的DNA培育。在48小時後，向細胞饋入1 mg/ml之G418 (Gibco)且在另外24小時後，用含有2 mg/ml G418之培養基代替培養

基。在兩星期後，將單細胞接種至96孔培養盤之孔內。單純系成長且各純系之 5×10^5 個細胞藉由FACS分析使用濃度為1 $\mu\text{g/ml}$ 之鼠IgG MAB1006 (Chemicon International, Temecula, CA)作為初級抗體與以1:200稀釋之山羊抗小鼠IgG (Dianova)作為二級抗體測試GM-CSFR- α 表現。初級與二級抗體循序與細胞培養1小時，同時在此等步驟之間用FACS緩衝液(PBS, 3% FCS)洗滌細胞。使用FACSCalibur系統(Becton Dickinson)在FL2通道內量化染色細胞之螢光。

在純系中，所分析之純系CHO-GMRa#11展示最高之中螢光強度。對於CHO-GMRa#11測定中螢光值(MFL值)為157 (圖6)。

結合至表現於CHO-GMRa#11上之GM-CSF受體 α 的GM-CSF之FACS分析

在添加至細胞前，在室溫下在FACS緩衝液(PBS/3% FBS/ NaN_3 0.05%)中，將增加濃度(0.1至100 $\mu\text{g/ml}$)之抗體與生物素標記GM-CSF(0.5 $\mu\text{g/ml}$)共培育30分鐘。

所有染色在圓底96孔培養盤(Nalge Nunc)中以每孔 1.5×10^5 個細胞進行。在每孔含有FACS緩衝液之50 μl 抗體/GM-CSF中溶解 2×10^5 個CHO-GMRa#11細胞且在4°C下培育1小時。隨後以150 μl FACS緩衝液/孔洗滌細胞一次且在已於FACS緩衝液中1:400稀釋之10.0 μl 經藻紅素標記之抗生蛋白鏈菌素(BD Biosciences Pharmingen)中溶解。在4°C下培育1小時後，用FACS緩衝液洗滌細胞兩次，再懸浮於10.0 μl FACS緩衝液中且在FACSCalibur (Becton Dickinson)

中經由細胞FL2螢光強度量測生物素標記GM-CSF之結合。自使用GraphPad Prism v3.03軟體應用非線性回歸曲線擬合所得之劑量反應曲線測定IC₅₀值。

Fab抗體MOR03682、MOR03684及MOR03929展示對結合至表現GM-CSF受體 α 之細胞表面之GM-CSF的顯著抑制。

實例4：藉由逐步交換CDR盒之選定Fab的親和力成熟

A. 親和力成熟Fab庫之產生與淘選

為了增加抗GM-CSF Fab片段之親和力及抑制活性，使純系MOR03682、MOR03684及MOR03929經受親和力成熟。就此而言，藉由使用三核苷酸引導之誘變(trinucleotide directed mutagenesis) (Virnekäs 等人，1994；Nagy等人，2002)之盒式誘變使CDR區最佳化。序列分析顯示在所分析之三個親本純系的CDR間無序列同源性。表2a與2b提供對於親本純系MOR03682、MOR03684及MOR03929之六個CDR肽序列。

以下簡要描述用於Fab最佳化之協定。自表現載體pMORPH[®]X9Fab_FH之Fab片段經選殖入噬粒載體內(US 6,753,136)。隨後應用兩個不同策略來最佳化親本Fab之親和力與功效。

首先產生一噬菌體抗體Fab庫，其中各親本之L-CDR3藉由個別 λ 輕鏈CDR3序列庫代替。在第二庫中，H-CDR2區藉由個別重鏈CDR2序列庫代替。

藉由將變化純系轉移至大腸桿菌TOP10F' (Invitrogen)內

產生親和力成熟庫。如實例 1A 所述製備噬菌體。MOR03684 與 MOR03682 之 L-CDR3 庫皆經儲集且源自 MOR03684 與 MOR03682 之 H-CDR2 庫皆經儲集，而源自 MOR03929 之 L-CDR3 與 H-CDR2 庫則在選擇程序期間分別保存。大體上如實例 1B 中所述在溶液中生物素標記 GM-CSF 上進行三輪淘選且應用更嚴格之選擇條件。

B. 基於電化學發光(BioVeris)之結合分析用於偵測溶胞物中改良之 GM-CSF 結合 Fab

為偵測在大腸桿菌溶胞物(BEL 萃取物)中之 GM-CSF 結合 Fab 抗體，大體上如實例 2B 所述在 BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 中對結合進行分析。

純化具有最高 ECL 值之 Fab 且藉由溶液平衡滴定 (SET; Haenel 等人，2005) 與表面電漿共振 (Biacore) 使其經受親和力量測 (參見實例 4D)。

C. 經改良 VL(L-CDR3) 與經改良 VH(H-CDR2) 之 X 選殖

為進一步改良親和力，自源自相同親本純系之成熟 Fab 的獨立最佳化 H-CDR2 及 L-CDR3 經組合，因為此組合存在導致親和力之進一步增加的極大可能 (Yang 等人，1995；Schier 等人，1996；Chen 等人，1999)。由於具有改良親和力之 Fab 自 H-CDR2 與 L-CDR3 庫鑒別，因此稱作 X 選殖之此程序應用於源自親本純系 MOR03929 之黏合劑。此藉由將自 L-CDR3 最佳化供體純系之整個輕鏈 (XbaI/SphI 片段) 轉移至 H-CDR2 最佳化受體純系而達成。

表 3：X選殖組合

親本	VH供體		VL供體	在X選殖後親和力改良之Fab
MOR03929	MOR04287 MOR04290 MOR04252	x	MOR04302	MOR04350 MOR04354 MOR04357
MOR03682	MOR04283	x	MOR04297	MOR04342

對於所得4個Fab，VL與VH經定序以確定將正確VL轉移至個別H-CDR2改良載體主鏈。表2a與2b展示MOR03929與3682之所有衍生物(其列於表3中)的VH與VL蛋白質序列。

D. 使用溶液平衡滴定(SET)與表面電漿共振(Biacore)測定皮莫耳親和力

對於 K_D 測定，使用Fab之單體部份(至少90%單體含量，藉由分析SEC分析；Superdex75, Amersham Pharmacia)。基本上如Haenel等人，2005: A constant amount of Fab was equilibrated with different concentrations (serial 5ⁿ dilutions) of human GM-CSF (Leucomax) in solution所述在溶液中進行基於電化學發光(ECL)之親和力測定與資料評估。添加偶合至順磁珠粒(M-280 Streptavidin, Dynal)及BV-tag™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)標記抗人類(Fab)'₂(Dianova)之生物素標記人類GM-CSF (R&D Systems)且培育15至30分鐘。隨後，使用M- SERIES® 384分析儀(BioVeris Europe)經由ECL偵測量化未結合Fab之濃度。

根據Friguet等人，1985，要小心以防止在偵測期間顯衡變化著平偏向固相。

使用上文所述之分析條件，測定Fab親和力，其在表4中展示。

另外，使用標準EDC-NHS胺偶合化學在10 mM乙酸鈉pH值4.5中在塗覆有密度為約100 RU之重組人類GM-CSF (Peprotech)的F1晶片(Biacore, Sweden)上進行動力SPR分析。將個別量之HAS固定於參考流槽上。PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄ pH值7.4)+ 0.005% Tween20用作電泳緩衝液。以20 µl/min之流動速率以6.3–200 nM之濃度系列應用Fab。將締合相設為60 s且將解離相設為120 s (親本)或高達600 s (親和力優化)。為經更長時期監控解離相，使用基本上根據Drake等人(2004)之以下條件：以200 nM之單一濃度應用Fab；流動速率設為100 µl/min且解離相為6000-18.000 s。基於在此等分析條件下測定之下降率(off-rate)，評估Fab親和力，其在表4中展示。

表4：藉由Biacore與溶液平衡滴定(SET)測定之抗hGM-CSF Fab親和力

Biacore		SET
MOR0	K _D (pM)	K _D (pM)
3684	6420	16000
4251	70	7.4
3929	4260	2000
4302	174	63.5
4287	nd	17.9
4252	55	6
4290	122	11.1
4350	19	1.1
4354	21	2.8
4357	7	0.4
3682	nd	11406
4283	nd	113
4297	nd	49.2
4342	nd	4.9

E. 使用溶液平衡滴定(SET)測定對大鼠GM-CSF之親和力

使用大鼠GM-CSF (Peprotech)作為溶液中的分析物而非人類GM-CSF，基本上如實例4D所述進行對大鼠GM-CSF的親和力測定。根據Haenel等人(2005)計算親和力。在此分析中，Fab MOR04357對大鼠GM-CSF的親和力被測定為KD=1.0 nM。

實例5：抑制GM-CSF與GM-CSF受體 α 鏈間相互作用之最佳化抗人類GM-CSF Fab之特徵化

A. GM-CSF受體 α 結合分析

如上文所述(實例3C)使用0.5 μ g/ml (35 nM)生物素標記GM-CSF進行GM-CSF受體結合分析。GM-CSF至CHO-GMRa#11細胞之最大結合(0%抑制)藉由在0.5 μ g/ml之生物標記GM-CSF的最終GM-CSF濃度而不添加抗體培育細胞量

測。藉由自分析省略 GM-CSF 量測 GM-CSF 結合之 100% 抑制。自使用 GraphPad Prism v3.03 軟體應用非線性回歸曲線擬合所得之劑量反應曲線量測 IC_{50} 值。

分析具有改良親和力之 Fab、親本 Fab 及單選殖參考 IgG。表 5 總結在此等分析中獲得之 IC_{50} 值。在 5 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度所達到的抑制% 亦在表 5 中給出。

表 5：在受體抑制分析中抗 hGM-CSF Fab 之 IC_{50} 值

MOR0#	4251	4357	4354	4350	4252	4287	4290	4302	3684	3929	Mab215	21C11
IC_{50} (nM)	53	26	26	24	26	25	27	24	>400	35	無匹配*	9
在 5 $\mu\text{g/ml}$ 抗體之抑制%	~100%	~75%	~75%	~75%	~75%	~75%	~75%	~75%	~25%	~60%	~50%	~100%

*在此情況下無 S 形劑量反應曲線可擬合

此分析在質量上展示自親和力成熟與 X 選殖獲得之 Fab 防止 GM-CSF 結合至受體 α 鏈且因此保持其親本 Fab 之阻斷機制。需用濃度為 35 nM (0.5 $\mu\text{g/ml}$) 之生物素標記 GM-CSF 進行分析以在 FACS 中獲得顯著訊號。因此理論上需要 17.5 nM Fab (或 8.75 nM IgG) 阻斷 50% GM-CSF，因此對 IC_{50} 值之測定設定一限度。

B. 使用人類 GM-CSF 藉由抗 hGM-CSF Fab 對 TF-1 之 GM-CSF 依賴性增殖之抑制

如在實例 3B 中所述進行 TF-1 增殖分析。分析具有改良親和力之 Fab 與親本 Fab 以及單選殖參考 IgG。自使用 GraphPad Prism v3.03 軟體應用非線性回歸曲線擬合所得之劑量反應曲線量測 IC_{50} 值。表 6 總結在此等分析中所得之 IC_{50} 值。

表 6：在 TF-1 增殖分析中抗 hGM-CSF Fab 與對照 IgG 之 IC₅₀ 值

MOR0#	4251	4357	4354	4350	4252	4287	4290	4302	3684	3929	Mab215	BVD2-21C11
IC ₅₀ (pM)	463	90	56	82	2010	3382	696	10678	>200000	>200000	4315	6560
與 Mab215 相比 IC ₅₀ x-倍改良	9.3	47.9	77.1	52.6	2.1	1.3	6.2	-	-	-	-	-
與 BVD2-21C11 相比 IC ₅₀ x-倍 改良	14.2	72.9	117.1	80.0	3.2	1.9	9.4	-	-	-	1.5	-

在另一組實驗中，測定在 TF-1 增殖分析中親本 Fab MOR03682、其親和力成熟衍生物 MOR04283、MOR04297 及 x 選殖變體 MOR04342 之 IC₅₀ 值。表 7 總結在此等分析中所得之 IC₅₀ 值。

表 7：在 TF-1 增殖分析中抗 hGM-CSF Fab 之 IC₅₀ 值

MOR0#	4342	4283	4297	3682
IC ₅₀ (PM)	80	17293	13975	>200000

此等實驗展示在親和力成熟與 X 選殖後在 IC₅₀ 值中達成較大之改良。例如，MOR04357、MOR04350、MOR04354 與其親本 MOR03929 相比展示大於 2000 倍之改良 IC₅₀ 值且超過 BVD2-21C11 與 Mab215 之效力。

實例 6：MOR04357 至人類 IgG1 格式之轉變

A. 用於在哺乳動物表現系統中表現之 Fab DNA 序列的基因最佳化

為最佳化用於哺乳動物基因表現之 MOR04357 的 VH 與 VL 之 DNA (例如改變密碼子用途、GC 含量等)，將 Geneart (Regensburg, 德國) 之 GeneOptimizer™ 軟體用於界定該等最佳化 VH 及 VL DNA 序列，其在 Geneart (Regensburg, 德國) 上進行基因合成且選殖入 pPCR-Script 載體內得到

055906pPCR-Script與055907pPCR-Script。SEQ ID NO: 48展示個別VH序列，而SEQ ID NO: 57展示個別VL序列。

B. Fab MOR04357至人類IgG1格式內之選殖及IgG1表現

為表現全長免疫球蛋白(Ig)，將基因最佳化重鏈(VH)與輕鏈(VL)之可變域片段自pPCR-Script載體(實例5a)次選殖入用於人類IgG1之pMORPH[®]2_h_Ig載體系列內。MOR04357之密碼子最佳化VH經由NheI/B1pI消化自055906pPCR-Script分離且插入用相同限制酶內切之pMorph2_h_IgG1f主宰載體內。此載體已含有人類 γ 1恆定區。所得表現質體稱作pMorph2_h_IgG1f_MOR04357_co。MOR04357之密碼子最佳化VL經由NheI/HpaI消化自055907pPCR-Script分離且插入用相同限制酶內切之pMorph2_h_Iglambda2主宰載體內。此載體早已含有人 λ 恆定區。所得表現質體稱作pM2_h_Iglambda2_MOR04357_co。

C. 人類IgG之瞬時表現與純化

真核HKB11細胞用等克分子量之IgG重鏈與輕鏈表現載體DNA轉染。在轉染後3至7天採集細胞培養上清液。在調整上清液pH值至8.0並濾除菌後，溶液經受標準蛋白質A親和力層析(rProteinA FF或MabSelect SURE, GE Healthcare)。將緩衝液更換為1 x Dulbcecco's PBS(pH 7.2, Invitrogen)且將樣品進行過濾除菌(0.2 μ m)。MOR04357 IgG1在1 x Dulbcecco's PBS (pH 6.5, Invitrogen)中滲析。在SDS-PAGE中在變性、還原條件下或藉由使用Agilent BioAnalyzer且在天然狀態下藉由SE-HPLC分析IgG之純

度。

D. 使用溶液平衡滴定(SET)測定皮莫耳親和力

對於 K_D 測定，使用IgG1單體部份(至少90%單體含量，由分析SEC分析；Superdex75, Amersham Pharmacia)。基本上如Haenel等人2005所述且如實例4B所述進行溶液中的基於電化學發光(ECL)之親和力測定及資料評估。測定MOR04357 IgG1抵抗人類重組GM-CSF之 K_D 值為1.1 pM。

E. 使用溶液平衡滴定(SET)測定對大鼠GM-CSF之親和力

基本上如實例4D所述使用大鼠GM-CSF (Peprotech)作為在溶液中之分析物而非人類GM-CSF進行對大鼠GM-CSF的親和力測定。根據Haenel等人(2005)計算親和力。測定MOR04357 IgG1抵抗大鼠重組GM-CSF之 K_D 值為130 pM。

實例7：衍生自最佳化抗人類GM-CSF Fab的MOR04357 IgG1的特徵化

A. 使用人類與恆河猴GM-CSF藉由抗hGM-CSF IgG抑制TF-1之GM-CSF依賴性增殖

如實例3B所述進行TF-1增殖分析。MOR04357在IgG1格式中進行分析且作為對照單選殖參考IgG進行分析。自使用GraphPad Prism v3.03軟體應用非線性回歸曲線擬合所得之劑量反應曲線測定 IC_{50} 值。表8總結在此等分析中獲得之 IC_{50} 值。在此分析中使用GM-CSF的三個不同變體：第一，濃度為0.25 ng/ml的重組人類GM-CSF，在大腸桿菌中產生；第二，自HEK293之培養上清液，其已使用pcDNA-huGM-CSF瞬時轉染(參見實例3A)，含有重組人類GM-

CSF；及第三，自 HEK293 細胞的培養上清液，其已使用 pcDNA-macGM-CSF 瞬時轉染 (參見實例 3A)，含有重組獼猴 (恆河猴) GM-CSF。對於 TF-1 增殖分析，HEK293 培養上清液用作稀釋液中個別 GM-CSF 之來源，在該等稀釋液中 TF-1 細胞與在大腸桿菌內所產生之界定濃度 0.25 ng/ml 的純化重組人類 GM-CSF 得到之增殖相比展示相似增殖。

表 8：MOR04357 IgG 與對照 IgG 在 TF-1 增殖分析中之 IC₅₀ 值

	IC ₅₀ (pM)		
	人類 GM-CSF (大腸桿菌)	人類 GM-CSF (HEK293)	獼猴 GM-CSF (HEK293)
MOR04357 IgG1	48	11	15
21C11	1668	144	128
Mab215	625	54	190

此實驗展示在親和力成熟與 X 選殖後 IC₅₀ 值達成較大提高，其中在自 Fab 至 IgG1 格式轉化後經保持。與 Fab MOR03929 相比，IgG1 MOR04357 展示大於 2000 倍之經提高之 IC₅₀ 值且超過 BVD2-21C11 與 Mab215 之效力。

文獻：

Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Brown CB, Kaushansky K 及 Firestein GS. (1991). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol 146, 3365-3371.

Babior, B. (2000). Phagocytes and oxidative stress. Am J Med 109, 33-44.

Bonfield, T.L., Kavuru, M.S. 及 Thomassen, M.J. (2002). Anti-GM-CSF titer predicts response to GM-CSF therapy in pulmonary alveolar

proteinosis. Clin Immunol 105, 342-350.

Bozinovski,S., Jones,J., Beavitt,S.J., Cook,A.D., Hamilton,J.A. 及 Anderson,G.P. (2003). Innate immune responses to lipopolysaccharide in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.

Broide,D.H.及 Firestein,G.S. (1991). Endobronchial allergen challenge in asthma. Demonstration of cellular source of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by in situ hybridization. J Clin Invest 88, 1048-1053.

Broide,D.H., Paine,M.M.及 Firestein,G.S. (1992). Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. J Clin Invest 90, 1414-1424.

Brown,C.B., Pihl,C.E.及 Kaushansky,K. (1994). Mapping of human granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor domains interacting with the human granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor-receptor alpha-subunit. Eur J Biochem 225, 873-880.

Burmester,G.R., Stuhlmuller,B., Keyszer,G. 及 Kinne,R.W. (1997). Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind 或 workhorse in arthritis? Arthritis Rheum 40, 5-18.

Campbell,I.K., Bendele,A., Smith,D.A. 及 Hamilton,J.A. (1997). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice. Ann Rheum Dis 56, 364-368.

Campbell,I.K., Rich,M.J., Bischof,R.J., Dunn,A.R., Grail,D. 及 Hamilton,J.A. (1998). Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. J Immunol 161, 3639-3644.

Carrieri,P.B., Provitera,V., De Rosa,T., Tartaglia,G., Gorga,F. 及 Perella,O. (1998). Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. Immunopharmacol Immunotoxicol. 20, 373-382.

Cebon,J., Nicola,N.A., Ward,M., Gardner,I., Dempsey,P.J., Layton,J.E., Dührsen,U., Burgess,A., Nice,E.C. & Morstyn,G. (1990). Granulocyte-macrophage stimulating factor from human lymphocytes. *J Biol Chem* 265, 4483-4491.

Chantry,D., Turner,M., Brennan,F., Kingsbury,A. & Feldmann,M. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes. *Cytokine* 2, 60-67.

Chen Y., Wiesmann C., Fuh G., Li B., Christinger H.W., McKay .P, de Vos A.M., Lowman H.B. (1999)
Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen.
J Mol Biol. 293, 865-81.

Cheng,S.S., Lai,J.J., Lukacs,N.W. & Kunkel,S.L. (2001). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J Immunol* 166, 1178-1184.

Clark,S.C. & Kamen,R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236, 1229-1237.

Cook,A.D., Braine,E.L., Campbell,I.K., Rich,M.J. & Hamilton,J.A. (2001). Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res* 3, 293-298.

de Groot,R.P., Coffey,P.J. & Koenderman,L. (1998). Regulation of proliferation,differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal.* 10, 619-628.

de Vries,E.G., Willemse,P.H., Biesma,B., Stern,A.C., Limburg,P.C. & Vellenga,E. (1991). Flare-up of rheumatoid arthritis during GM-CSF treatment after chemotherapy. *Lancet* 338, 517-518.

Diederichs,K., Boone,T. & Karplus,P.A. (1991). Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor. *Science* 254, 1779-1782.

Drake A.W., Myszka D.G., Klakamp S.L. (2004)

Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic and equilibrium-based methods. *Anal Biochem.* 328, 35-43.

Dranoff,G., Crawford,A.D., Sadelain,M., Ream,B., Rashid,A., Bronson,R.T., Dickersin,G.R., Bachurski,C.J., Mark,E.L. 及 Whitsett,J.A. (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 713-716.

Friguet B., Chaffotte A..F, Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. (1985),

Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods.* 77,305-19.

Gasson,J.C., Baldwin,G.C., Sakamoto,K.M.及 DiPersio,J.F. (1990a). The biology of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Prog Clin Biol Res* 352, 375-384.

Gasson,J.C., Fraser,J.K.及 Nimer,S.D. (1990b). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): regulation of expression. *Prog Clin Biol Res* 338, 27-41.

Gasson,J.C., Kaufman,S.E., Weisbart,R.H., Tomonaga,M. 及 Golde,D.W. (1986). High-affinity binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to normal and leukemic human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 669-673.

Gearing,D.P., King,J.A., Gough,N.M. 及 Nicola,N.A. (1989). Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J.* 12, 3667-3676.

Gomez-Cambronero,J., Horn,J., Paul,C.C.及 Baumann,M.A. (2003). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol* 171, 6846-6855.

Haenel, C., Satzger, M., Della Ducata, D., Ostendorp, R. 及 Brocks, B. (2005). Characterization of high-affinity antibodies by electrochemiluminescence-based equilibrium titration. *Analytical Biochemistry*, 339, 1, 182-184.

Hamilton, J.A. (1993). Rheumatoid arthritis: opposing actions of hemopoietic growth factors and slow acting anti-rheumatic drugs. *Lancet* 342, 536-539.

Hamilton, J.A. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23, 403-408.

Hart, P.H., Whitty, G.A., Piccoli, D.S. 及 Hamilton, J.A. (1988). Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. *J Immunol* 141, 1516-1521.

Haworth, C., Brennan, F.M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R.N. 及 Feldmann, M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 21, 2575-2579.

Hayashida, K., Kitamura, T., Gorman, D.M., Arai, K., Yokota, K. 及 Miyajima, A. (1990). Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9655-9659.

Hazenber BP, Van Leeuwen MA, Van Rijswijk MH, Stern AC 及 Vellenga E (1989). Correction of granulocytopenia in Felty's syndrome by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Simultaneous induction of interleukin-6 release and flare-up of the arthritis. *Blood* 74, 2769-2780.

Kastelein, R.A. 及 Shanafelt, A.B. (1993). GM-CSF receptor: interactions and activation. *Oncogene* 8, 231-236.

Kaufman, S.E., DiPersio, J.F. 及 Gasson, J.C. (1989). Effects of human GM-CSF on neutrophil degranulation in vitro. *Exp Hematol* 17, 800-

804.

Kitamura,T., Sato,N., Arai,K. 及 Miyajima,A. (1991). Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66, 1165-1174.

Kitamura,T., Tanaka,N., Watanabe,J., Uchida, Kanegasaki,S., Yamada,Y. 及 Nakata,K. (1999). Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190, 875-880.

Kitamura T., Tange T., Terasawa T., Chiba S., Kuwaki T., Miyagawa K., Piao Y.F., Miyazono K., Urabe A., Takaku F. (1989).

Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin *J Cell Physiol.* 140, 323-34.

Knappik,A., Ge,L., Honegger,A., Pack,P., Fischer,M., Wellnhofer,G., Hoess,A., Wolle,J., Pluckthun,A. 及 Virnekas,B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.

Krebs,B., Rauchenberger,R., Reiffert,S., Rothe,C., Tesar,M., Thomassen,E., Cao,M., Dreier,T., Fischer,D., Hoss,A., Inge,L., Knappik,A., Marget,M., Pack,P., Meng,X.Q., Schier,R., Sohlmann,P., Winter,J., Wolle,J. 及 Kretzschmar,T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.

Lopez,A.F., Williamson,D.J., Gamble,J.R., Begley,C.G., Harlan,J.N., Klebanoff,S.J., Waltersdorff,A., Wong,G., Clark,S.C. 及 Vadas,M.A. (1986). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* 78, 1220-1228.

McQualter,J.L., Darwiche,R., Ewing,C., Onuki,M., Kay,T.W., Hamilton,J.A., Reid,H.H. 及 Bernard,C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 873-882.

Meager,A., Wadhwa,M., Bird,C., Dilger,P., Thorpe,R., Newsom-Davis,J.及 Willcox,N. (1999). Spontaneously occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with autoimmune disease. *Immunology* 97, 526-532.

Metcalf,D., Begley,C.G., Johnson,G.R., Nicola,N.A., Vadas,M.A., Lopez,A.F., Williamson,D.J., Wong,G.G., Clark,S.C. 及 Wang,E.A. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 67, 37-45.

Mulherin,D., Fitzgerald,O. 及 Bresnihan,B. (1996). Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 115-124.

Nagy Z.A., Hubner B., Lohning C., Rauchenberger R., Reiffert S., Thomassen-Wolf E., Zahn S., Leyer S., Schier E.M., Zahradnik A., Brunner C., Lobenwein K., Rattel B., Stanglmaier M., Hallek M., Wing M., Anderson S., Dunn M., Kretzschmar T., Tesar M. (2002) Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.* 8, 801-7

Olver,I.N., Hercus,T., Lopez,A., Vadas,M., Somogyi,A.A., Doyle,I., Foster,D.J., Keefe,D., Taylor,A., Brown,M., To,L.B., Cole,J., Rawling,T., Cambareri,B., Myers,M., Olszewski,N., Bastiras,S., Senn,C., Hey,A., Verma,M. 及 Wigley,P. (2002). A phase I study of the GM-CSF antagonist E21R. *Cancer Chemother Pharmacol* 50, 171-178.

Plenz,G., Eschert,H., Beissert,S., Arps,V., Sindermann,J.R., Robenek,H. 及 Völker,W. (2003). Alterations in the vascular extracellular matrix of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-deficient mice. *FASEB J.* 17, 1451-1457.

Rapoport,A.P., Abboud,C.N. 及 DiPersio,J.F. (1992). Granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev* 6, 43-57.

Rauchenberger,R., Borges,E., Thomassen-Wolf,E., Rom,E., Adar,R., Yaniv,Y., Malka,M., Chumakov,I., Kotzer,S., Resnitzky,D., Knappik,A., Reiffert,S., Prassler,J., Jury,K., Waldherr,D., Bauer,S., Kretzschmar,T., Yayon,A.及 Rothe,C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem*.

Santiago-Schwarz F, Anand P,L.S.及 Carsons SE (2001). Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. *J Immunol* 167, 1758-1768.

Sato,N., Sakamaki,K., Terada,N., Arai,K. 及 Miyajima,A. (1993). Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *EMBO J* 12, 4181-4189.

Schier R., McCall A., Adams G.P, Marshall K.W., Merritt H., Yim M., Crawford R.S., Weiner L.M., Marks C., Marks J.D. (1996)

Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol.* 8, 263:551-67.

Shanafelt,A.B., Johnson,K.E.及 Kastelein,R.A. (1991a). Identification of critical amino acid residues in human and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and their involvement in species specificity. *J Biol Chem* 266, 13804-13810.

Shanafelt,A.B., Miyajima,A., Kitamura,T.及 Kastelein,R.A. (1991b). The amino-terminal helix of GM-CSF and IL-5 governs high affinity binding to their receptors. *EMBO J* 10, 4105-4112.

Shibata,Y., Berclaz,P.-Y., Chroneos,Z., Yoshida,H. 及 Trapnell,B.C.

(2001). GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU. *Immunity* 15, 557-567.

Sisson, S.D. 及 Dinarello, C.A. (1988). Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 72, 1368-1374.

Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V. 及 Dunn, A.R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5592-5596.

Trapnell, B.C. 及 Whitsett, J.A. (2002). GM-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* 64, 775-802.

Uchida, K., Nakata, K., Trapnell, B.C., Terakawa, T., Hamano, E., Mikami, A., Matsushita, I., Seymour, J.F., Oh-Eda, M., Ishige, I., Eishi, Y., Kitamura, T., Yamada, Y., Hanaoka, K. 及 Keicho, N. (2004). High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103, 1089-1098.

Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G. & Moroney, S.E., (1994). *Nucleic Acids Research* 22, 5600-5607.

Xu, W.D., Firestein, G.S., Taetle, R., Kaushansky, K. 及 Zvaifler, N.J. (1989). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. II. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid synovial effusions. *J Clin Invest* 83, 876-882.

Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Kaneko, F., Nakano, J., Kato, H., Horiuchi, T. 及 Ohta, K. (2002). Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of GM-CSF. *Cell Immunol* 219, 92-97.

Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R., Barbas C.F. 3rd. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity

maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol.* 254, 392-403

Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K. 及 Wahl, L.M. (1998). Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- α , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 β through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 161, 3071-3076.

【圖式簡單說明】

圖 1a 提供各種新穎抗體可變重鏈區之核酸序列。

圖 1b 提供各種新穎抗體可變重鏈區之胺基酸序列。CDR 區 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3 以粗體自 N-至 C-末端表示。

圖 2a 提供各種新穎抗體可變輕鏈區之核酸序列。

圖 2b 提供各種新穎抗體可變輕鏈區之核酸序列。CDR 區 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 以粗體自 N-至 C-末端表示。

圖 3 提供基於一致之 HuCAL[®] 抗體主宰基因序列之可變重鏈區的胺基酸序列。CDR 區 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3 以粗體自 N-至 C-末端表示。

圖 4 提供基於一致之 HuCAL[®] 抗體主宰基因序列之可變輕鏈區的胺基酸序列。CDR 區 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 以粗體自 N-至 C-末端表示。

圖 5 提供表現 pMORPH[®]X9_MOR03929_FH 之載體之 DNA 序列的一個實例 (SEQ ID NO: 43)。

圖 6 提供 GM-CSF 受體 α 之表現程度，如使用 GM-CSF 受體 α 特異抗體 MAB1006 藉由 FACS 分析所測定。CHO-GMRa#11 (實線) 與 CHO-K1 (虛線) 相比較展示。X 軸表示相對螢光值 (RFL)，在 FL2 通道中量測；y 軸表示細胞數。

序列表

<110> 德商莫菲西斯公司

<120> 抗-GM-CSF抗體及其用途

<130> N1479 PCT S3

<140> TW095117745

<141> 2006-05-18

<150> US 60/682,009

<151> 2005-05-18

<160> 61

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 1

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tctcattgga tgtcttgggt gcgccaagcc 120

cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcaat ggtatctttt ctgatggtag cgctacctat 180

tatgcggata gcgtgaaagg ccgttttacc atttcacgtg ataattcgaa aaacaccctg 240

tatctgcaaa tgaacagcct gcgtgcggaa gatacggccg tgtattattg cgcgcgtttt 300

cagggttatg gtgggtggtt tgattattgg ggccaaggca ccctggtgac ggtagctca 360

<210> 2

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 2

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60

```

agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tctcattgga tgtcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atttggcgtg gtccttatat ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg ttttcagggt 300
tatggtgggtg gttttgatta ttggggccaa ggcaccctgg tgacggttag ctca 354

```

<210> 3
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

```

<400> 3
cagggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggg atctcttatt ctggtagcga gacctattat 180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtttt 300
ggtactgatt tttggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

```

<210> 4
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

```

<400> 4
cagggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggg attgagaata agtatgctgg tggtagctact 180
tattatgctg cttctgttaa gggtcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
ggttttggta ctgatttttg gggccaaggc accctggtga cggtagctc a 351

```

<210> 5
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 5
 caggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctgggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgg attgagaata agcgtgctgg tgggtgctact 180
 ttttatgctg cttccgttaa gggtcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
 ggttttggta ctgatttttg gggccaaggc accctggatga cggftagctc a 351

<210> 6
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 6
 caggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctgggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgg attgagtcta agtgggctgg tgggtgctact 180
 tattatgctg ctgggtgttaa gggtcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
 ggttttggta ctgatttttg gggccaaggc accctggatga cggftagctc a 351

<210> 7
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 7

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggc atctcttatt ctggtagcga gacctattat	180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaa caccctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtttt	300
ggtactgatt ttggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca	345

<210> 8

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 8

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggc attgagaata agcgtgctgg tgggtgctact	180
ttttatgctg cttccgttaa gggtcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc	240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt	300
ggttttggta ctgatttttg gggccaaggc accctggtga cggtagctc a	351

<210> 9

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 9

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggc attgagtcta agtgggctgg tgggtgctact	180

tattatgctg ctggtgttaa gggtcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
 ggttttggta ctgatttttg gggccaaggc accctgggtga cggtttagctc a 351

<210> 10
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 10
 caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccgatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgg attgagaata agtatgctgg tgggtgtact 180
 tattatgctg cttctgttaa gggtcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
 ggttttggta ctgatttttg gggccaaggc accctgggtga cggtttagctc a 351

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 11

Gln 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 Ser His
 20 25 30

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

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

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

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

Cys Ala Arg Phe Gln Gly Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 12

Gln 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 Ser His
20 25 30

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

Ser Asn Ile Trp Arg Gly Pro Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Phe Gln Gly Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 13

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Glu 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 Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 14

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Glu Asn Lys Tyr Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 15

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Glu Asn Lys Arg Ala Gly Gly Ala Thr Phe Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 16

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Glu Ser Lys Trp Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 17

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Glu 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 Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 18
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 18

Gln 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Glu Asn Lys Arg Ala Gly Gly Ala Thr Phe Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 19

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Glu Ser Lys Trp Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 20

Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Glu Asn Lys Tyr Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 21
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
tcgtgtagcg gcgataatct tcctggtaag tatgttcatt ggtaccagca gaaacccggg 120
caggcgccag ttcttgtgat ttattatgat tctaatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
gacgaagcgg attattattg ccagtctcgt actcagacta ctatttgttt tggcggcggc 300
acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324

<210> 22
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 22
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60

tcgtgtagcg gcgataatct tcctggtaag tatgttcatt ggtaccagca gaaacccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttattatgat tctaatacgtc cctcaggcat cccggaacgc	180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa	240
gacgaagcgg attattattg ccagtctcgt actcagacta ctattgtgtt tggcggcggc	300
acgaagttaa ccgttcttgg ccag	324

<210> 23
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 23	
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcgatc	60
tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgctttagc	180
ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa	240
gcggattatt attgctcttc ttgggattct actggtcttg tgtttggcgg cggcacgaag	300
ttaaccgttc ttggccag	318

<210> 24
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 24	
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcgatc	60
tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgctttagc	180
ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa	240
gcggattatt attgctcttc ttgggattct actggtcttg tgtttggcgg cggcacgaag	300
ttaaccgttc ttggccag	318

<210> 25
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 25
 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttcac caggtcagac cgcgcgatc 60
 tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgcttttagc 180
 ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa 240
 gcggattatt attgctcttc ttgggattct actggtcttg tgtttggcgg cggcacgaag 300
 ttaaccgttc ttggccag 318

<210> 26
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 26
 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttcac caggtcagac cgcgcgatc 60
 tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgcttttagc 180
 ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa 240
 gcggattatt attgctcttc ttgggattct actggtcttg tgtttggcgg cggcacgaag 300
 ttaaccgttc ttggccag 318

<210> 27
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 27

gatatcgaac tgacccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcgatc	60
tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgctttagc	180
ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa	240
gcggattatt attgctctgc ttgggggtgat aagggtatgg tgtttggcgg cggcacgaag	300
ttaaccgttc ttggccag	318

<210> 28

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 28

gatatcgaac tgacccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcgatc	60
tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgctttagc	180
ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa	240
gcggattatt attgctctgc ttgggggtgat aagggtatgg tgtttggcgg cggcacgaag	300
ttaaccgttc ttggccag	318

<210> 29

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 29

gatatcgaac tgacccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcgatc	60
tcgtgtagcg gcgattctat tggtaagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgctttagc	180

ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa 240
gcggattatt attgctctgc ttgggggtgat aagggtatgg tgtttggcgg cggcacgaag 300
ttaaccgttc ttggccag 318

<210> 30
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 30
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgatc 60
tcgtgtagcg gcgattctat tggtagaag tatgcttatt ggtaccagca gaaacccggg 120
caggcgccag ttcttgtgat ttataagaag cgtccctcag gcatcccga acgctttagc 180
ggatccaaca gcggcaacac cgcgaccctg accattagcg gcactcaggc ggaagacgaa 240
gcggattatt attgctctgc ttgggggtgat aagggtatgg tgtttggcgg cggcacgaag 300
ttaaccgttc ttggccag 318

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 31

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Gly Lys Tyr Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Thr Gln Thr Thr Ile Val
85 90 95

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

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 32

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Gly Lys Tyr Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Thr Gln Thr Thr Ile Val
85 90 95

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

<210> 33
<211> 106

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 33

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Ser Thr Gly Leu Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 34
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 34

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Ser Thr Gly Leu Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 35
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 35

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Ser Thr Gly Leu Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 36

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Ser Thr Gly Leu Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 37

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Asp Lys Gly Met Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 38

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 38

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Asp Lys Gly Met Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 39
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 39

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Asp Lys Gly Met Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 40

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Asp Lys Gly Met Val Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 41

Gln 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 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 Ala Ile Ser 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 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
115 120

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 42

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Val

85

90

95

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

<210> 43

<211> 4986

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 43

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtagcgcag	60
gccgatatcg aactgaccca gccgccctca gtgagcggtg caccagggtca gaccgcgcgt	120
atctcgtgta gcggcgattc tatttgtaag aagtatgctt attggtacca gcagaaaccc	180
gggcaggcgc cagtctctgt gatttataag aagcgccct caggcatccc ggaacgcttt	240
agcggatcca acagcggcaa caccgcgacc ctgaccatta gcggcactca ggcggaagac	300
gaagcggatt attattgctc ttcttgggat tctactggtc ttgtgtttgg cggcggcacg	360
aagttaaccg ttcttggcca gccgaaagcc gcaccgagtg tgacgctgtt tccgccgagc	420
agcgaagaat tgcaggcgaa caaagcgacc ctgggtgtgcc tgattagcga cttttatccg	480
ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagccccg tcaaggcggg agtggagacc	540
accacaccct ccaaacaaag caacaacaag tacgcggcca gcagctatct gaggctgacg	600
cctgagcagt ggaagtccca cagaagctac agctgccagg tcacgcatga ggggagcacc	660
gtggaaaaaa ccgttgcgcc gactgaggcc tgataagcat gcgtaggaga aaataaaatg	720
aaacaaagca ctattgcact ggcactctta ccgttgctct tcaccctgt taccaaagcc	780
cagggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctgggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	840
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttattgga tgaattgggt gcgccaagcc	900
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggc atctcttatt ctggtagcga gacctattat	960
gcggatagcg tgaagggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	1020
ctgcaaatga acagccitcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtttt	1080
ggtactgatt tttggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcgtc gaccaaaggt	1140

ccaagcgtgt ttccgctggc tccgagcagc aaaagcacca gcggcggcac ggctgccctg 1200
ggctgcctgg ttaaagatta ttccccgaa ccagtcaccg tgagctggaa cagcggggcg 1260
ctgaccagcg gcgtgcatac ctttccggcg gtgctgcaaa gcagcggcct gtatagcctg 1320
agcagcgttg tgaccgtgcc gagcagcagc ttaggcactc agacctatat ttgcaacgtg 1380
aaccataaac cgagcaacac caaagtggat aaaaaagtgg aaccgaaaag cgaattcgac 1440
tataaagatg acgatgacaa aggcgcgccg caccatcatt accatcactg ataagcttga 1500
cctgtgaagt gaaaaatggc gcagattgtg cgacatTTTT tttgtctgcc gtttaattaa 1560
aggggggggg gggccggcct gggggggggg gtacatgaaa ttgtaaacgt taatatTTTg 1620
ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaatt agtcatTTTT ttaaccaata ggccgaaatc 1680
ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt 1740
tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg tcaaaggcg aaaaaccgtc 1800
tatcagggcg atggcccact acgagaacca tcaccctaatt caagTTTTTt ggggtcgagg 1860
tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc gathtagagc ttgacgggga 1920
aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg 1980
ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta accaccacac ccgccgcgct taatgcgccg 2040
ctacagggcg cgtgctagac tagtgTTTTa accggaccgg gggggggcct aagtgggctg 2100
caaaacaaaa cggcctcctg tcaggaagcc gcttttatcg ggtagcctca ctgcccgtt 2160
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc atcagtgaat cggccaacgc gcggggagag 2220
gcggtttcgc tattgggagc cagggtgggt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 2280
tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcggccac gctggtttgc 2340
cccagcaggc gaaaatcctg ttgatgggtg gtcagcggcg ggatataaca tgagctgtcc 2400
tcggtatcgt cgtatccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgagccc ggactcggtg 2460
atggcacgca ttgcgccag cgccatctga tcgttggaac ccagcatcgc agtgggaacg 2520
atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 2580
tccggttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 2640
cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg ccagctaaca gcgcgatttg ctggtggccc 2700
aatgcgacca gatgctccac gccagtcgc gtaccgtcct catgggagaa aataatactg 2760
ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 2820

tccacagcaa tagcatcctg gtcattccagc ggatagttaa taatcagccc actgacacgt	2880
tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc	2940
gacacgacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc	3000
gacggcgcggt gcagggccag actggagggtg gcaacgcaa tcagcaacga ctgtttgccc	3060
gccagttgtt gtgccacgcg gttaggaatg taattcagct ccgccatcg cgcttccact	3120
ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctgggtca ccacgcggga aacggtctga	3180
taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc	3240
ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaagggttt gcgccattcg	3300
atgctagcca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg	3360
ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt	3420
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc	3480
ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct	3540
tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc	3600
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta	3660
tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca	3720
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag	3780
tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgtag	3840
ccagttaact tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt	3900
agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa	3960
gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg	4020
attttggta gatctagcac caggcgctta agggcaccaa taactgcctt aaaaaatta	4080
cgccccgccc tgccactcat cgcagtactg ttgtaattca ttaagcattc tgccgacatg	4140
gaagccatca caaacggcat gatgaacctg aatcgccagc ggcatcagca ccttgtcgcc	4200
ttgcgtataa tatttgccca tagtgaaaac gggggcgaag aagttgtcca tattggctac	4260
gtttaaatca aaactgggtga aactcaccca gggattggct gagacgaaaa acatattctc	4320
aataaacctt ttagggaaat aggccaggtt ttcaccgtaa cacgccacat cttgcgaata	4380
tatgtgtaga aactgccgga aatcgtcgtg gtattcactc cagagcgatg aaaacgtttc	4440

```

agtttgc tca tggaaaacgg tgaacaagg gtgaacacta tcccatatca ccagctcacc 4500
gtctttcatt gccatacggg actccgggtg agcattcatc aggcggggcaa gaatgtgaat 4560
aaaggccgga taaaacttgt gcttatTTTT ctttacggtc tttaaaaagg ccgtaatatc 4620
cagctgaacg gtctgggtat aggtacattg agcaactgac tgaaatgcct caaatgttc 4680
tttacgatgc cattgggata tatcaacggg ggtatatcca gtgatttttt tctccatttt 4740
agcttcctta gctcctgaaa atctcgataa ctcaaaaaat acgcccggta gtgatcttat 4800
ttcattatgg tgaaagttag aacctcaccg gacgtctaag gtgagtttag tcactcatta 4860
ggcaccaccg gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg 4920
ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaatttctag ataacgaggg 4980
caaaaa 4986

```

<210> 44
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

```

<400> 44
caggtgcaat tggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagt 60
agctgcaaag cctccggagg cacittta tctttctta tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagt gatggcggt atcattccga tttttggcac tgcgaattac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatt accgcgatg aaagcaccag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtaagttt 300
atttctgatt cttggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

```

<210> 45
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

```

<400> 45
caggtgcaat tggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagt 60

```

```

agctgcaaag cctccggagg cacttttaat tcttttctta tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcgct atttctcctt gggatgggtg tactggttat 180
gtcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatt accgcggatg aaagcaccag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtaagttt 300
atttctgatt cttggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

```

<210> 46
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

```

<400> 46
caggtgcaat tggttcagtc tggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cctccggagg cacttttaat tcttttctta tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt atcattccga ttttggcac tgcgaattac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatt accgcggatg aaagcaccag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtaagttt 300
atttctgatt cttggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

```

<210> 47
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

```

<400> 47
caggtgcaat tggttcagtc tggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cctccggagg cacttttaat tcttttctta tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcgct atttctcctt gggatgggtg tactggttat 180
gtcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatt accgcggatg aaagcaccag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtaagttt 300

```

atttctgatt cttagggcca aggcaccctg gtgacggta gctca

345

<210> 48
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 48
caggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgaactgggt gaggcaggcc 120
cctggcaagg gcctggagtg ggtgtccggc atcgagaaca agtatgccgg cggagccacc 180
tactacgccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagaacacc 240
ctgtacctgc agatgaacag cctgagggcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgccagg 300
ggcttcggca ccgatttctg gggccagggc accctggtga cagtcagctc a 351

<210> 49
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 49

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Lys Phe Ile Ser Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 50

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Lys Phe Ile Ser Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 51
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 51

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Lys Phe Ile Ser Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 52
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 52

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Lys Phe Ile Ser Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 53
gatatccaga tgaccagag cccgtctagc ctgagcgca gcgtgggtga tcgtgtgacc 60
attacctgca gagcgagcca gactattaat aattatctga attggtacca gcagaaacca 120
ggtaaagcac cgaaactatt aatttatact gcttctaatt tgcaaagcgg ggtcccgtcc 180
cgttttagcg gctctggatc cggcactgat ttaccctga ccattagcag cctgcaacct 240
gaagactttg cggtttatta ttgccagcag tattctgggt ctcctatgac ctttggccag 300
ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacg 327

<210> 54
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 54
 gatatccaga tgacccagag cccgtctagc ctgagcgca gcgtgggtga tcgtgtgacc 60
 attacctgca gagcgagcca gactattaat aattatctga attggtacca gcagaaacca 120
 ggtaaagcac cgaaactatt aatttatact gcttctaatt tgcaaagcgg ggtcccgtcc 180
 cgtttttagcg gctctggatc cggcactgat ttaccctga ccattagcag cctgcaacct 240
 gaagactttg cggtttatta ttgccagcag tattctgggt ctcctatgac ctttggccag 300
 ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacg 327

<210> 55
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 55
 gatatccaga tgacccagag cccgtctagc ctgagcgca gcgtgggtga tcgtgtgacc 60
 attacctgca gagcgagcca gactattaat aattatctga attggtacca gcagaaacca 120
 ggtaaagcac cgaaactatt aatttatact gcttctaatt tgcaaagcgg ggtcccgtcc 180
 cgtttttagcg gctctggatc cggcactgat ttaccctga ccattagcag cctgcaacct 240
 gaagactttg cgacctatta ttgccagcag tattcttggg ttcctcatat ctttggccag 300
 ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacg 327

<210> 56
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 56
gatatccaga tgacccagag cccgtctagc ctgagcgcga gcgtgggtga tcgtgtgacc 60
attacctgca gagcgagcca gactattaat aattatctga attggtacca gcagaaacca 120
ggtaaagcac cgaaactatt aatttatact gcttctaatt tgcaaagcgg ggtcccgtcc 180
cgttttagcg gctctggatc cggcactgat tttaccctga ccattagcag cctgcaacct 240
gaagactttg cgacctatta ttgccagcag tattcttggg ttcctcatac ctttggccag 300
ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacg 327

<210> 57
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 57
gacatcgagc tgacccagcc ccccagcgtg tctgtggccc ctggccagac cgcccggatc 60
agctgctccg gcgacagcat cggcaagaag tacgcctact ggtatcagca gaagcccggc 120
caggcccccg tgctggtgat ctacaagaag cggcccagcg gcatccccga gcggttcagc 180
ggcagcaaca gcggcaacac cgccaccctg accatcagcg gcacccaggc cgaggacgag 240
gccgactact actgctccgc ctggggcgac aagggcatgg tgtttggcgg cggaacaaag 300
ttaaccgtgc tggggcag 318

<210> 58
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 58
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 Thr Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Thr Ala Ser Asn 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 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Ser Pro Met
85 90 95

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

<210> 59
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 59

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 Thr Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Thr Ala Ser Asn 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 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Ser Pro Met
85 90 95

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

<210> 60
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 60

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 Thr Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Thr Ala Ser Asn 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Trp Val Pro His
85 90 95

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

<210> 61
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列之描述：合成構築物"

<400> 61

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 Thr Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Thr Ala Ser Asn 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Trp Val Pro His
85 90 95

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

公告

十、申請專利範圍

1. 一種對人類 GM-CSF 具有特異性之經分離抗體或其功能性片段，其包含述於選自 SEQ ID NO: 12、18、19、20 及 52 所組成之群中之一的胺基酸序列中之 H-CDR1、H-CDR2 及 H-CDR3，及述於選自 SEQ ID NO: 32、38、39、40 及 61 所組成之群中之一胺基酸序列中之 L-CDR1、L-CDR2 及 L-CDR3。
2. 如請求項 1 之經分離抗體或其功能性片段，其中該功能性片段為 Fab 或 scFv 抗體片段。
3. 如請求項 1 之經分離抗體或其功能性片段，其為 IgG。
4. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 之經分離抗體或其功能性片段，及為其醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
5. 如請求項 1 之經分離抗體或其功能性片段，其為合成人類抗體。
6. 如請求項 1 之經分離抗體或其功能性片段，其中該經分離抗體或其功能性片段與大鼠 GM-CSF 交叉反應、與恆河猴 GM-CSF 交叉反應或與大鼠 GM-CSF 及恆河猴 GM-CSF 交叉反應。
7. 如請求項 1 之經分離抗體或其功能性片段，其中該 H-CDR1、H-CDR2 及 H-CDR3 為述於 SEQ ID NO: 12 中者，及該 L-CDR1、L-CDR2 及 L-CDR3 為述於 SEQ ID NO: 32 中者。
8. 如請求項 7 之經分離抗體或其功能性片段，其包含述於 SEQ ID NO: 12 中之可變重鏈，及述於 SEQ ID NO: 32 中之可變輕鏈。

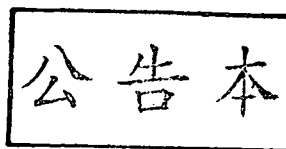
9. 如請求項1之經分離抗體或其功能性片段，其中該H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3為述於SEQ ID NO: 18中者，及該L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3為述於SEQ ID NO: 38中者。
10. 如請求項9之經分離抗體或其功能性片段，其包含述於SEQ ID NO: 18中之可變重鏈，及述於SEQ ID NO: 38中之可變輕鏈。
11. 如請求項1之經分離抗體或其功能性片段，其該H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3為述於SEQ ID NO: 19中者，及該L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3為述於SEQ ID NO: 39中者。
12. 如請求項11之經分離抗體或其功能性片段，其包含述於SEQ ID NO: 19中之可變重鏈，及述於SEQ ID NO: 39中之可變輕鏈。
13. 如請求項1之經分離抗體或其功能性片段，其該H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3為述於SEQ ID NO: 20中者，及該L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3為述於SEQ ID NO: 40中者。
14. 如請求項13之經分離抗體或其功能性片段，其包含述於SEQ ID NO: 20中之可變重鏈，及述於SEQ ID NO: 40中之可變輕鏈。
15. 如請求項1之經分離抗體或其功能性片段，其該H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3為述於SEQ ID NO: 52中者，及該L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3為述於SEQ ID NO: 61中者。

16. 如請求項15之經分離抗體或其功能性片段，其包含述於SEQ ID NO: 52中之可變重鏈，及述於SEQ ID NO: 61中之可變輕鏈。
17. 一種對人類GM-CSF具有特異性之經分離抗體或其功能性片段，其包含可變重鏈，該可變重鏈包含選自SEQ ID NO: 12、18、19、20及52所組成之群的胺基酸序列。
18. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該功能性片段為Fab或scFv抗體片段。
19. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其為IgG。
20. 一種醫藥組合物，其包含如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，及為其醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
21. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其為合成人類抗體。
22. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該經分離抗體或其功能性片段與大鼠GM-CSF交叉反應、與恆河猴GM-CSF交叉反應或與大鼠GM-CSF及恆河猴GM-CSF交叉反應。
23. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含選自SEQ ID NO: 32、38、39、40及61所組成之群的胺基酸序列之可變輕鏈。
24. 如請求項23之經分離抗體或其功能性片段，其為IgG。
25. 一種醫藥組合物，其包含如請求項23之經分離抗體或其功能性片段，及為其醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
26. 如請求項23之經分離抗體或其功能性片段，其為合成人類抗體。

27. 如請求項23之經分離抗體或其功能性片段，其中該經分離抗體或其功能性片段與大鼠GM-CSF交叉反應、與恆河猴GM-CSF交叉反應或與大鼠GM-CSF及恆河猴GM-CSF交叉反應。
28. 如請求項23之經分離抗體或其功能性片段，其中該功能性片段為Fab或scFv抗體片段。
29. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變重鏈包含SEQ ID NO: 12。
30. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變重鏈包含SEQ ID NO: 18。
31. 如請求項30之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 38中之L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3。
32. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變重鏈包含SEQ ID NO: 19。
33. 如請求項32之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 39中之L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3。
34. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變重鏈包含SEQ ID NO: 20。
35. 如請求項34之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 40中之L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3。
36. 如請求項17之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變重鏈包含SEQ ID NO: 52。

37. 如請求項29之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 32中之L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3。
38. 如請求項36之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 61中之L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3。
39. 一種對人類GM-CSF具有特異性之經分離抗體或其功能性片段，其包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含選自SEQ ID NO: 32、38、39、40及61所組成之群的胺基酸序列。
40. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其中該功能性片段為Fab或scFv抗體片段。
41. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其為IgG。
42. 一種醫藥組合物，其包含如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，及為其醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
43. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其為合成人類抗體。
44. 如請求項39經分離抗體或其功能性片段，其中該經分離抗體或其功能性片段與大鼠GM-CSF交叉反應、與恆河猴GM-CSF交叉反應或與大鼠GM-CSF及恆河猴GM-CSF交叉反應。
45. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 32。
46. 如請求項45之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 12中之H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3。

47. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 38。
48. 如請求項47之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 18中之H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3。
49. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 39。
50. 如請求項49之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 19中之H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3。
51. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 40。
52. 如請求項51之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 20中之H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3。
53. 如請求項39之經分離抗體或其功能性片段，其中該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 61。
54. 如請求項53之經分離抗體或其功能性片段，其進一步包含述於SEQ ID NO: 52中之H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3。



十一、圖式：

可變重鏈DNA

3684_VH3 (SEQ ID NO: 1):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTCATTGGATGTCTTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCAATGGTATCTTTTCTGATGGTAGCGCT
ACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAAAC
ACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGC
GCGTTTTCAGGGTTATGGTGGTGGTTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACG
GTTAGCTCA

4251_VH3 (SEQ ID NO: 2):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTCATTGGATGTCTTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCAATATTTGGCGTGGTCCTTATATTTATT
ATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAAACACCCTGT
ATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTTT
CAGGGTTATGGTGGTGGTTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT
CA

3929_VH3 (SEQ ID NO: 3):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTTATTCTGGTAGCGAGACC
TATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAAACACC
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4252_VH 3 (SEQ ID NO: 4):

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGTATGCTGGTGGT
GCTACTTATTATGCTGCTTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAA

圖1a

ACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC
GCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4287_ VH3 (SEQ ID NO: 5):

CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGCGTGCTGGTGGT
GCTACTTTTTATGCTGCTTCCGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAA
ACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC
GCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4290_ VH3 (SEQ ID NO: 6):

CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGTCTAAGTGGGCTGGTGGT
GCTACTTATTATGCTGCTGGTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAA
AACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTG
GCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4302_ VH3 (SEQ ID NO: 7):

CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTTATTCTGGTAGCGAGACC
TATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAAACACC
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4350_ VH3 (SEQ ID NO: 8):

CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGCGTGCTGGTGGT
GCTACTTTTTATGCTGCTTCCGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAA

圖 1a

ACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC
GCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4354_ VH3 (SEQ ID NO: 9):

CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGTCTAAGTGGGCTGGTGGT
GCTACTTATTATGCTGCTGGTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAA
AACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTG
GCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4357_ VH3 (SEQ ID NO: 10):

CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGAATTGGGTGCGCCA
AGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTGAGAATAAGTATGCTGGTGGT
GCTACTTATTATGCTGCTTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAA
ACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC
GCGCGTGGTTTTGGTACTGATTTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

3682_ VH1A (SEQ ID NO: 44)

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGT
GAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGG
GTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCGAT
TTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGC
GGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAG
ATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4283_ VH1A (SEQ ID NO: 45)

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGT
GAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGG

圖 1a

GTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGCTATTTCTCCTTG
GGATGGTGTACTGGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATTACCGC
GGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAG
ATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4297_VH1A (SEQ ID NO: 46)

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGT
GAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGG
GTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCGAT
TTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGC
GGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAG
ATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4342_VH1A (SEQ ID NO: 47)

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGT
GAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTTTCTTATTTCTTGG
GTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGCTATTTCTCCTTG
GGATGGTGTACTGGTTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATTACCGC
GGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAG
ATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTAAGTTTATTTCTGATTCTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

4357_VH密碼子最佳化 (SEQ ID NO: 48)

CAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGATGAAC
TGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCGAGA
ACAAGTATGCCGGCGGAGCCACCTACTACGCCGCCAGCGTGAAGGGCCGGTTC
ACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCT

圖 1a

GAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGGGGCTTCGGCACCGATT
TCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCAGCTCA

圖 1a

可變重鏈肽
(CDR區為粗體)

3684_VH3 (SEQ ID NO: 11):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSSH**WMSWVRQAPGKGLEWVSNGIFSDGSAT
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**FQGYGGG**FDYWGGGTLTVSS

4251_VH3 (SEQ ID NO: 12):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSSH**WMSWVRQAPGKGLEWVSNWVRGPYIYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**FQGYGGG**FDYWGGGTLTVSS

3929_VH3 (SEQ ID NO: 13):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSS**YWMNWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSETY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG**FGTDF**WGQGTLTVSS

4252_VH 3 (SEQ ID NO: 14):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSS**YWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYAGG
ATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG**FGTDF**WGQGTLTVSS

4287_VH 3 (SEQ ID NO: 15):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSS**YWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKRAGG
ATFYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG**FGTDF**WGQGTLTVSS

4290_VH 3 (SEQ ID NO: 16):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GF****TFSS**YWMNWVRQAPGKGLEWVSGIESKWAGG
ATYYAAGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG**FGTDF**WGQGTLTVSS

圖1b

4302_VH 3 (SEQ ID NO: 17):

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSETY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS**

4350_VH 3 (SEQ ID NO: 18):

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKRAGG
ATFYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS**

4354_VH 3 (SEQ ID NO: 19):

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIESKWAGG
ATYYAAGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS**

4357_VH 3 (SEQ ID NO: 20):

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYAGG
ATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS**

3682_VH1A (SEQ ID NO: 49)

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARKFISDSWGQGT
LVTVSS**

4283_VH1A (SEQ ID NO: 50)

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGAISPW
DGV TGYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARKFISDSWGQGT
LVTVSS**

圖 1b

4297_VH1A (SEQ ID NO: 51)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARKFISDSWGQGTLVT
VSS

4342_VH1A (SEQ ID NO: 52)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSFLISWVRQAPGQGLEWMGAISPW
DGVGTGYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARKFISDSWGQGT
LVTVSS

圖1b

可變重鏈DNA

3684_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 21):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATAATCTTCCTGGTAAGTATGTTTCATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATTATGATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGA
ACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG
GCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTCGTACTCAGACTACTATTGTGTTTGG
CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4251_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 22):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATAATCTTCCTGGTAAGTATGTTTCATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATTATGATTCTAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGA
ACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG
GCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTCGTACTCAGACTACTATTGTGTTTGG
CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

3929_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 23):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4252_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 24):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

圖2a

4287_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 25):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4290_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 26):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATTCTACTGGTCTTGTGTTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4302_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 27):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTGTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4350_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 28):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTGTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

圖2a

4354_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 29):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

4357_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 30):

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGCGTA
TCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAAGAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAACCC
GGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATAAGAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT
TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGA
AGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTGCTTGGGGTGATAAGGGTATGGTGTTTGGCGGCG
GCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

3682_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 53)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCG
TGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTAC
CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGC
AAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCC
TGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTA
TTCTGGTTCTCCTATGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACG

4283_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 54)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCG
TGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTAC
CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGC
AAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCC
TGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTA
TTCTGGTTCTCCTATGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACG

圖2a

4297_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 55)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCG
TGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTAC
CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGC
AAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCC
TGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGT
ATTCTTGGGTTCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTAC
G

4342_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 56)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCG
TGTGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGACTATTAATAATTATCTGAATTGGTAC
CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATACTGCTTCTAATTTGC
AAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCC
TGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGT
ATTCTTGGGTTCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTAC
G

4357_VL密碼子最佳化 (SEQ ID NO: 57)

GACATCGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCTGTGGCCCCTGGCCAGACCG
CCCGGATCAGCTGCTCCGGCGACAGCATCGGCAAGAAGTACGCCTACTGGTAT
CAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCGTGCTGGTGATCTACAAGAAGCGGCCCA
GCGGCATCCCCGAGCGGTTTCAGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCT
GACCATCAGCGGCACCCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCCGCCT
GGGGCGACAAGGGCATGGTGTTTGGCGGGCGGAACAAAGTTAACCGTGCTGGG
GCAG

圖2a

可變輕鏈肽
(CDR區為粗體)

3684_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 31):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DNLP**KGKYVHWYQQKPGQAPVLVIYY**DSNR**PSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**QSRTQT**TIVFGGGTKLTVLGQ

4251_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 32):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DNLP**KGKYVHWYQQKPGQAPVLVIYY**DSNR**PSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**QSRTQT**TIVFGGGTKLTVLGQ

3929_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 33):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DSIG**KKYAYWYQQKPGQAPVLVIY**KKRP**SGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWDST**GLVFGGGTKLTVLGQ

4252_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 34):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DSIG**KKYAYWYQQKPGQAPVLVIY**KKRP**SGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWDST**GLVFGGGTKLTVLGQ

4287_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 35):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DSIG**KKYAYWYQQKPGQAPVLVIY**KKRP**SGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWDST**GLVFGGGTKLTVLGQ

4290_ VL lambda 3 (SEQ ID NO: 36):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSG**DSIG**KKYAYWYQQKPGQAPVLVIY**KKRP**SGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYC**SSWDST**GLVFGGGTKLTVLGQ

圖2b

4302_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 37):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

4350_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 38):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

4354_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 39):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

4357_VL lambda 3 (SEQ ID NO: 40):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

3682_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSGSPMTFGQGTKVEIKRT

4283_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 59)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSGSPMTFGQGTKVEIKRT

4297_VL kappa 1 (SEQ ID NO: 60)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASNLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSWVPHFTFGQGTKVEIKRT

圖2b

4342 VL_kappa 1 (SEQ ID NO: 61)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQTINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASN~~LN~~QSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~SL~~LPEDFATYYCQQYSWVPHTFGQGTKVEIKRT

圖2b

可變重鏈一致序列
(CDR區為粗體)

VH3一致 (SEQ ID NO: 41):

QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS SYAM**SWVRQA PGKGLEWVSA
IS**GSGGSTYY ADSVKGRFTI** SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**WG**
GDGFYAMDYW GQGTLVTVS S

圖3

可變輕鏈一致序列

(CDR區為粗體)

VL_λ3 一致 (SEQ ID NO: 42):

DIELTQPPSV SVAPGQTARI **SCSGDALGDK** YASWYQQKPG QAPVLVIYDD
SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYC**QQH** YTPPVFGGG
 TKLTVLG

圖4

Fab表現載體pMORPH®X9_MOR03929_FH SEQ ID NO:43之DNA序列之實例

atgaaaaagacagctatcgcgattgcagtggcactggctgggttcgctaccgtagcgcaggccgatatcgaactgacc
cagccgccttcagtgcggtgcaccagggtcagaccgcgcgtatctcgtgtagcggcgattctattggaagaagtatg
cttattggtaccagcagaaacccgggcaggcgccagttctgtgattataagaagcgtccctcaggcatcccgaac
gcttagcggatccaacagcggcaacaccgcgacccctgaccattagcggcactcaggcgggaagacgaagcggatt
attattgctctcttgggattctactggtctgtgttggcggcgccacgaagtaaccgttcttggccagccgaaagccgca
ccgagtgtgacgctgttccgccgagcagcgaagaattgcaggcgaacaaagcgaccctgggtgtgcctgattagcga
ctttatccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgaggaccaccac
accctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcca
cagaagctacagctgccagggtcacgcatgaggggagcaccgtggaaaaaacgttgcgcgactgaggcctgata
agcatgcgtaggagaaaaataaaatgaaacaaagcactattgcactggcactctaccgttgccttaccctgttacc
aaagcccagggtgcaattgggtgaaagcggcgggcggtggtgcaaccggcgccagcctgcgtctgagctgcgcg
gcctccggattacctttctcttattggtgaattgggtgcgcaagcccctgggaagggtctcagagtgggtgagcgg
atctctattctgttagcgcgagacctattatgcggatagcgtgaaaggccgtttaccatttcacgtgataattcga
ccccgtatctgcaaatgaacagcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgctggttttggtactgatt
gggccaaggcaccctgggtgacgggtagctcagcgtcgaccaaagggtccaagcgtgttccgctggctccgagcagc
aaaagcaccagcggcgccagcggctgcctgggtgctgctgtaagattattcccggaaccagtcaccgtgagctg
gaacagcggggcgctgaccagcggcgctgcataccttccggcggtgctgcaagcagcggcctgtatagcctgagc
agcgtgtgaccgtgcgagcagcagcttaggcactcagacctatattgcaacgtgaaccataaacgagcaacac
caaagtggataaaaaagtgaaccgaaaaagcgaattcgactataaagatgacgatgacaaaggcgcgcgcgacc
atcatcaccatcactgataagcttgacctgtgaagtgaaaaaatggcgcagattgtgcgacattttttgtctgcggtta
aaagggggggggggcgccctgggggggggtgtacatgaaatgtaaacgttaataattttgttaaaatcgcggttaa
attttgtaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaatccctataaatcaaaagaatagaccgaga
taggggtgagtgtgtccagtttgaacaagagtccactataaagaacgtggactccaacgtcaaaggcgaaaaa
ccgtctatcaggcgatggccactacgagaaccatcacctaatacagtttttgggtcgaggtgccgtaaagcact
aaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaa
gggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacac
ccgccgcgttaatgcgcccgtacagggcgctgtagactagtggttaaacgggaccgggggggggcttaagtggg
ctgcaaaacaaaacggcctctgtcaggaagccgctttatcggttagcctcactgccgcttccagtcgggaaacct
gtcgtgccagctgcatcagtgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattgggagccaggggtgttttct
ttcaccagtgagacggggaacagctgattgccctcaccgcctggccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgct
ggtttgccccagcaggcgaaaaatcctgttggtggtcagcggcgggatataacatgagctgtcctcggtatcgtcgt
atcccactaccgagatgtccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcacgcattgcgcccagcgcctatg
atcgttggcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcattcagcattgcatggttgtgaaaaccggacatggca
ctccagtcgccttccggtccgctatcggtgaattgattgcgagtgagatattatgccagccagccagacgcagacg
cgccgagacagaacttaattggccagctaacagcgcgatttgcgtgggccaatgcgaccagatgtccacgccc
agtcgctgaccgtcctcatgggagaaaaataactgttgatgggtgtcgttcagagacatcaagaaataacgcccga
acattagtgcaggcagcttccacagcaatagcatcctgggtcatccagcggatagttaataatcagcccactgacagct
gcgcgagaagattgtgcaccgcccgtttacaggcttcgacgcccgttcgttctaccatcgacacgaccagcgtggcac
ccagttgatcggcgagatttaacgcccgcgacaattgcgacggcgctgcagggccagactggaggtggcaac
gccaatcagcaacgactgttggccgagttgtgtccacgcggttaggaatgtaattcagctccgcatcgccgctt
ccacttttcccgcttttcgagaaacgtggctggcctggttaccacgcgggaaacgggtctgataagagacaccgg
catactctgcgacatcgataacgttactggttccattcaccaccctgaattgactcttccggggcgctatcatgccata
ccgcaaaaggtttgcgcatcagtgctagccatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaag
gccgctgtcgtggcttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcagcgtcaagtgcagaggtgg
cgaaaccgacaggactataaagataccaggcgttccccctggaagctccctcgtgcgctcctgttccgaccctgc
cgcttaccggatacctgtccgcttctccctcggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcg

圖5

gtgtagggtcggtcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggtcagcccgaccgctgctgccttatccggttaact
 atcgtcttgagttccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcg
 aggtatgtaggcgggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatgtgtatctg
 cgctctgctgtagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaccaccgctggtagcggg
 ggtttttgggttgaagcagcagattacgctgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtctg
 acgctcagtggaaacgaaaactcacgttaagggatttgggtcagatctagcaccaggcggttaagggcaccaataactg
 ccttaaaaaaattacgccccgccctgccactcatcgagtagtctgttaattcattaagcattctgccgacatggaagcc
 atcacaacggcatgatgaacctgaatcgccagcggcatcagcacctgtcgccttgctgataatattgcccatagtg
 aaaacggggggaagaagttgtccatattggctacgtttaaatcaaaactggtgaaactcaccagggttggtga
 gacgaaaaacatattctcaataaaccttttagggaaataggccaggtttcaccgtaacacgccacatcttgcaatat
 atgtgtagaaactgccggaatcgctgtggtattcacctccagagcgatgaaaacgtttcagtttgcattggaacggg
 gtaacaagggtgaacactatcccatatcaccagctcaccgtctttcattgccatacggaaactccgggtgagcattcatc
 aggcggggaagaatgtgaataaaggccggataaaaactgtgcttattttctttacgggtctttaaaggccgtaatatcc
 agctgaacgggtctggttataggtagcattgagcaactgactgaaatgcctcaaaatgttctttacgatgccattgggatata
 tcaacgggtgtatatccagtgtttttctcatttttagcttcttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaaatagccc
 ggtagtgatcttattcattatggtgaaagttggaacctcaccgacgtctaagtgtgagttagctcactcattaggcacccc
 aggccttacactttatgcttccggctcgatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatga
 ccatgattacgaatttctagataacgagggcaaaaa

圖5

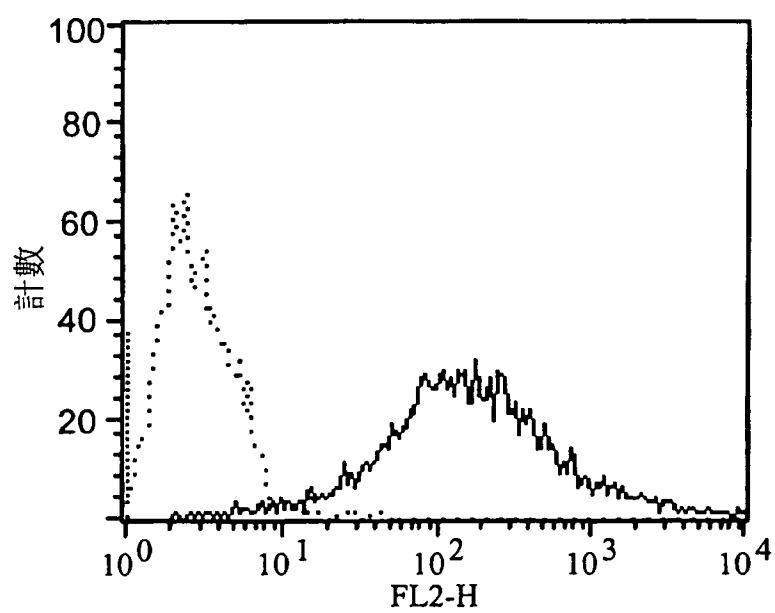


圖6