

申請日期	90 6 29
案 號	90115048
類 別	C12N15/13, C07K16/24, G101N33/68

公告本

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	二元專一性之抗體及其製法及用途
	英 文	DUAL SPECIFICITY ANTIBODIES AND METHODS OF MAKING AND USING
二、發明 創作人	姓 名	1. 喬治 艾吉力諾斯 GEORGE AVGERINOS 2. 艾柏特 可林森 ALBERT COLLINSON 3. 理察 W. 迪克森 RICHARD W. DIXON 4. 塔力克 格哈優 TARIQ GHAYUR 5. 茲拉 凱馬卡蘭 ZEHR KAYMAKALAN
	國 籍	1. 2. 3. 5. 均美國 4. 巴基斯坦
三、申請人	住、居所	1. 美國麻州沙貝利市哈莫德圓環15號 2. 美國麻州馬柏羅市歐佛路克大道21號 3. 美國麻州北格拉夫頓市沙莫爾大道6號 4. 美國麻州哈力斯頓市華盛頓街1014號 5. 美國麻州威斯特柏羅市皮卡迪利街4號
	姓 名 (名稱)	美商亞培公司 ABBOTT LABORATORIES
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國伊利諾州亞培公園市亞培公園路100號
	代 表 人 姓 名	查理士. 姆. 布魯克 CHARLES M. BROCK

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

C6
D6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ☒有 ☐無主張優先權

美國 2000年6月29日 60/215,379

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要（發明之名稱：二元專一性之抗體及其製造及用途）

本發明係提供對兩種不同的、但在結構上有關聯之抗原具有二元專一性的抗體。抗體可以是，例如完全的人類抗體、重組抗體或單株抗體。較佳的抗體對IL-1 α 和IL-1 β 具有二元專一性，並在活體外和在活體內，中和IL-1 α 和IL-1 β 之活性。本發明之抗體可以是全長的抗體，或其抗原-結合部份。亦提供本發明之抗體的製造方法和使用方法。本發明之抗體或抗體部份，可用來檢測兩種不同的、但在結構上有關聯的抗原(例如IL-1 α 和IL-1 β)，並抑制該抗原之活性，例如在罹患其中IL-1 α 及/或IL-1 β 活性是有害之障礙的人類個體中。

英文發明摘要（發明之名稱：DUAL SPECIFICITY ANTIBODIES AND METHODS OF MAKING AND USING）

Antibodies having dual specificity for two different but structurally related antigens are provided. The antibodies can be, for example, entirely human antibodies, recombinant antibodies, or monoclonal antibodies. Preferred antibodies have dual specificity for IL-1 α and IL-1 β and neutralize IL-1 α and IL-1 β activity *in vitro* and *in vivo*. An antibody of the invention can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. Methods of making and methods of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antibody portions, of the invention are useful for detecting two different but structurally related antigens (*e.g.*, IL-1 α and IL-1 β) and for inhibiting the activity of the antigens, *e.g.*, in a human subject suffering from a disorder in which IL-1 α and/or IL-1 β activity is detrimental.

五、發明說明(1)

發明背景

哺乳動物免疫系統包括B淋巴細胞，其總共表現由數百數兆個不同抗體專一性所組成的抗體譜(antibody repertoire)。對特定抗原的正常免疫反應，涉及從該功能部分中選出一或多個專一地與該抗原結合的抗體，且免疫反應的成功，至少一部份是基於這些抗體專一地認出(且最後排除)刺激抗原，並"忽視"在抗體周遭其他分子的能力。

專一地認出一種特定抗原之抗體的效用，導致單株抗體技術的發展。目前，標準融合瘤的技術，容許製備對感興趣之抗原具有單一專一性的抗體。最近，已經發展了重組抗體技術，像是篩選在活體外的抗體庫。這些技術亦容許產製對感興趣之抗原具有單一專一性的抗體。

對單一標靶抗原具有專一性的抗體，至少在某些環境下，可能對其他抗原顯示出不想要的交叉-反應性或背景結合。然而，該交叉-反應性或背景結合通常是不可預測的(也就是不可能預測那個抗原將與抗體進行交叉-反應)。此外，這通常可與專一的抗原結合作用區別，因為它通常僅代表極少部份的抗體結合能力(例如總抗體結合作用的1%或更少)，且通常僅在高抗體濃度下觀察到(例如比觀察到專一性抗原結合所需之濃度更高1000倍或更高)。雖然有數個抗原，可能屬於在結構上有關聯的蛋白質家族，但抗體對特定家族成員的反應仍是高度專一的。此外，有數個蛋白質家族成員的實例(例如IL-1和TNF家族的成員)，其與相同的受體、受體組份或在結構上有關聯的蛋白質結合，卻沒

五、發明說明(2)

有對一個家族成員升高，但對其他家族成員未顯示出高度交叉反應性的單株抗體。MAbs對各種家族成員缺少交叉反應性，可能有兩個原因。首先，在標準融合瘤產製中，僅對少數對標靶抗原具有高專一性/親和力的抗體進行搜索，然後檢查少數選出之抗體的交叉反應性或背景結合作用。其次，雖然在家族中的蛋白質在結構上是有關聯的，但它們可能具有獨特的、非-部份重疊的免疫優勢之抗原決定位。因此，藉著使用全長蛋白質而使其升高的MAbs，可能不與其他在結構上有關聯的蛋白質產生交叉反應。

亦有對一個物種的抗原升高，且將專一地與在其他物種中相同功能之抗原結合的單株抗體的實例。例如，抗-老鼠X抗體可迅速與得自人類的抗原X結合。這是因為它們共享重要的序列和結構類似性，雖然它們是不相同的。然而，這類物種-交叉-反應性的抗體，並不構成"二元專一性"抗體，因為它們對的自不同物種的相同抗原具有專一性。

因此，仍需要具有可預測之二元或多元專一性的單株抗體，也就是說，抗體對二或多個不同抗原具有真的專一性。

發明概要

本發明提供製造對至少兩個在結構上-有關聯，但不同的抗原具有二元專一性之抗體的方法。該方法通常涉及提供抗原，其包括兩個不同的但在結構上有關聯之分子的共同結構特徵；使抗體譜暴露在該抗原下；並從該譜中選出專一地與這兩個不同的但在結構上有關聯之分子結合的抗體，藉此獲得二元專一性抗體。在臨床環境中，

五、發明說明(3)

相同家族蛋白質的數個成員可能提供疾病過程的各種徵候。因此，使用本發明的二元專一性抗體，其與相同家族蛋白質的成員結合，阻斷該蛋白質家族一個以上成員的功能，可能有利於改善疾病徵候，或中斷該疾病本身的進行。此外，這類本發明的二元專一性抗體，可用來檢測在結構上有關聯的抗原，純化在結構上有關聯的抗原，並可用於涉及在結構上有關聯之抗原的診斷測定。

在較佳的具體實施例中，以在兩個不同但在結構上有關聯之分子之間同一性的連結拓樸區域為基礎來設計抗原。例如，兩個不同的但在結構上有關聯之分子可以是蛋白質，而抗原可以是肽，包括在這兩個蛋白質之間同一性的相鄰拓樸區域之胺基酸序列。

在另一個具體實施例中，以在結構上模仿兩個不同但在結構上有關聯之分子的共同折疊環為基礎來設計抗原。例如抗原可以是環狀的肽，其在結構上模仿兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質的共同折疊環。

在另一個具體實施例中，以將兩個不同但在結構上有關聯之分子之交替及/或部份重疊的部份接合在一起為基礎來設計抗原，產生雜種分子。例如，抗原可以是藉著將兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質之交替及/或部份重疊之胺基酸序列接合在一起，所製造出的雜種肽。

在另一個具體實施例中，抗原可包括兩個不同但在結構上有關聯之分子的其中一個，且該方法涉及選擇專一地認出這兩個有關聯之分子的抗體。

五、發明說明(4)

在本發明之方法中，可在活體內或在活體外將抗體譜暴露在感興趣的抗原下。例如，在一個具體實施例中，使譜暴露在抗原下涉及在活體內以該抗原免疫接種動物。在活體內的方法可進一步涉及從動物的淋巴細胞中製備融合瘤的名單，並選擇分泌專一地與兩個不同但在結構上有關聯之分子結合之抗體的融合瘤。被免疫接種的動物可以是例如老鼠、大鼠、兔子或山羊，或任何前述動物之基因轉殖的版本，像是以人類免疫球蛋白基因轉殖的老鼠，使得當抗原刺激時，該老鼠便製造人類的抗體。其他可免疫接種的動物類型，包括帶有重症性聯合免疫缺陷病(SCID)的老鼠，其已經利用人類的周圍血液單核細胞(hu-PBMC-SCID嵌合型老鼠)或淋巴細胞或其前驅細胞重建，且該老鼠已經利用致命的整體照射處理過，接著利用重症性聯合免疫缺陷病(SCID)老鼠之骨髓細胞的放射性保護(radioprotection)，接著移植具有功能的人類淋巴細胞(Trimera系統)。可免疫接種的其他類型動物是已經針對編碼感興趣之抗原(群)的內源基因(群)，"擊倒"其基因組的動物(例如老鼠)(例如藉著同種重組作用)，其中當以感興趣之抗原(群)免疫接種時，該KO動物便認出外來的抗原(群)。

在另一個具體實施例中，藉著以抗原篩選重組的抗體庫，在活體外使抗體譜暴露在該抗原之下。可在例如噬菌體表面上，或在酵母菌細胞的表面上，或在細菌細胞的表面上，表現重組的抗體庫。在種種不同的具體實施例中，重組的抗體庫是例如scFv庫或Fab庫。在另一個具體實施例中

五、發明說明(5)

，抗體庫是以RNA-蛋白質融合形式表現的。

另一個製備二元專一性抗體的方法，涉及在活體內和在活體外方法的組合，像是藉著在活體內以抗原免疫接種動物，使抗體譜暴露在該抗原之下，接著在活體外以該抗原篩選從該動物之淋巴細胞來製備的重組抗體庫。另一種方法涉及藉著在活體內以抗原免疫接種動物，使抗體譜暴露在該抗原之下，接著是在活體外從該動物之淋巴細胞來製備之重組抗體庫的親和力成熟作用。另一種方法涉及藉著在活體內以抗原免疫接種動物，使抗體譜暴露在該抗原之下，接著選出分泌感興趣之抗體的單一抗體產生細胞，從這些選出的細胞中(例如藉著PCR)回收重-和輕鏈可變區cDNAs，並在活體外，在哺乳動物宿主細胞中表現該重-和輕鏈可變區(稱為選擇淋巴細胞抗體法，或SLAM)，藉此容許進一步選擇和操縱選出的抗體基因序列。更進一步，可藉著表現選殖，藉著在哺乳動物細胞中表現重和輕鏈抗體基因，並對分泌具有必要之結合親和力的抗體的哺乳動物細胞進行選擇，來選擇單株抗體。

本發明之方法容許製備各種不同類型之二元專一性抗體，包括完全的人類抗體、嵌合型抗體和CDR-移植的抗體，及其抗原-結合部份。亦提供根據本發明之方法製備的二元專一性抗體。本發明較佳之二元專一性抗體是專一地結合介白素-1 α 和介白素-1 β 者。可在檢測IL-1 α 或IL-1 β 的方法中使用這類二元專一性抗體，包括使IL-1 α 或IL-1 β 與該二元專一性抗體，或其抗原-結合部份接觸，而得以檢測IL-1 α

五、發明說明(6)

或IL-1 β 。亦可在抑制IL-1 α 或IL-1 β 活性的方法中使用中和二元專一性抗體，包括使IL-1 α 或IL-1 β 與該二元專一性抗體，或其抗原-結合部份接觸，而得以抑制IL-1 α 或IL-1 β 之活性。亦可在治療介白素-1-相關之障礙的方法中使用這類二元專一性抗體，包括對罹患介白素-1-相關之障礙的個體投與該二元專一性抗體，或其抗原-結合部份。

在另一個具體實施例中，本發明提供藉著進行下列步驟，來製造抗體或其抗原結合部份庫的方法：

a)從由於暴露在第一個抗原下而產生的抗體譜中，獲得重組的重鏈或其抗原結合部份庫A；b)從由於暴露在第一個抗原下而產生的抗體譜中，獲得重組的輕鏈或其抗原結合部份庫B；c)從由於暴露在第二個抗原下而產生的抗體譜中，獲得重組的重鏈或其抗原結合部份庫C；d)從由於暴露在第二個抗原下而產生的抗體譜中，獲得重組的輕鏈或其抗原結合部份庫D；以及e)將重組的重鏈或其抗原結合部份庫A與重組的輕鏈或其抗原結合部份庫D混合，獲得抗體或其抗原結合部份庫X，並/或將重組的重鏈或其抗原結合部份庫C與重組的輕鏈或其抗原結合部份庫B混合，獲得抗體或其抗原結合部份庫Y。

在本發明另一個具體實施例中，本發明緊接前述的方法尚包括將抗體或其抗原結合部份庫X與抗體或其抗原結合部份庫Y混合，獲得抗體或其抗原結合部份庫Z的步驟。

在進一步的具體實施例中，本發明係針對抗體或其抗原

五、發明說明(7)

結合部份庫X、Y和Z。

在另一個具體實施例中，本發明之方法容許從庫X、Y及/或Z中選擇與第一個和第二個抗原結合的抗體或其抗原結合部份，來確認二元專一性抗體或其抗原結合部份。

在進一步的具體實施例中，本發明係針對藉著任何本發明之方法，製造及/或選擇二元專一性抗體。

在另一個具體實施例中，本發明亦針對編碼庫X、Y和Z中每個抗體成員或其抗原結合部份的核苷酸序列；以及二元專一性抗體或其抗原結合部份，包括前述之核苷酸序列的載體，以及利用前述之載體轉移感染的宿主細胞。

在較佳的具體實施例中，該第一個和第二個抗原分別選自包括蛋白質、多肽和肽，其限制條件為該第一個和第二個抗原不是相同的。在進一步的具體實施例中，該蛋白質、多肽和肽是分泌性蛋白質或表面受體，且該分泌性蛋白質係選自包括IFN、TNF、介白素、IP-10、PF4、GRO、9E3、EMAP-II、CSF、FGF和PDGF。在另一個較佳的具體實施例中，第一個抗原為IL-1 α ，而第二個抗原為IL-1 β 。

發明詳細說明

本發明係關於設計和使用抗原，產生二元專一性的抗體，也就是對至少兩個不同但在結構上有關聯之分子具有專一性的抗體，以及這類二元專一性抗體的選擇、製備和用途。本發明之抗原的結構關係，遍及整個抗原(例如蛋白質)或僅在某些在結構上有關聯的區域。本發明提供獲得二元專一性抗體的方法，其專一地與兩個不同但在結構上有關

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明(8)

聯之分子結合，其中該方法涉及：

提供抗原，其包括兩個不同但在結構上有關聯之分子的共同結構特徵；

使抗體譜暴露在該抗原之下；並

從該譜中選擇專一地與兩個不同但在結構上有關聯之分子結合的抗體，藉此獲得二元專一性抗體。

應注意的是雖然在本文中從認出兩個不同但在結構上有關聯之抗原的觀點來描述本發明，應瞭解"二元專一性抗體"一詞企圖包括專一地認出比兩種更多的不同但有關聯之抗原的抗體，像是認得三、四、五或更多個在結構上有關聯但不同之抗原的抗體。此外，"不同的但在結構上有關聯之抗原"一詞企圖包括其整體結構相關的抗原(例如蛋白質)，以及共享一或多個在結構上有關聯之區域，但其他方面無關的抗原。因此，"不同的但在結構上有關聯之"抗原，可以是例如兩個蛋白質，其為相同蛋白質家族的成員，具有共同的整體結構，或可以是例如兩個蛋白質，其整體結構是不類似的(無關的)，但分別含有在結構上有關聯的功能部位。

可使用各種類型的抗原來誘發本發明之抗體，並可應用各種製造抗體的方法，獲得本發明之二元專一性抗體，如同在下列之細目中討論的細節。

I. 二元專一性抗原

欲製備本發明之二元專一性抗體，使對抗能夠誘發二元專一性抗體之抗原的抗體升高。在本文中，通常將這類抗

五、發明說明(9)

原稱為二元專一性抗原。在本發明中可使用各種不同類型的二元專一性抗原，並在下列的細目中進一步說明各種類型之二元專一性抗原的設計。

A. 相鄰的拓樸區域

在一個具體實施例中，本發明之二元專一性抗原包括在兩個不同但在結構上有關聯之分子之間同一性及/或類似性的相鄰拓樸區域，二元專一性抗體可對其升高。抗原最好包括在兩個不同但在結構上有關聯之分子之間同一性及/或類似性的最大(例如最長的)相鄰拓樸區域。較佳的是，兩個不同但在結構上有關聯之分子是蛋白質，且該二元專一性抗原包括相當於在這兩個蛋白質之間同一性及/或類似性的最大(例如最長)相鄰拓樸區域的直線肽。選擇同一性/類似性的適當區域，最好是受體或配體結合區，雖然亦可使用同一性/類似性的其他區域。

欲判定在兩個分子(例如蛋白質)之間同一性的相鄰拓樸區，比較這兩個分子(例如蛋白質)(例如同種性塑型、結構資訊或排列成一直線)，並確認相同或類似的區域。關於蛋白質，可使用排列演算法，產生最適切地排列，並確認在這兩個分子之間同一性及/或類似性的最大(例如最長)之相鄰拓樸區。用來比較兩個序列之數學演算法的較佳、非-限制之實例是Karlin和Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68的演算法，按照Karlin和Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77的修改。將這類演算法併入Altschul等人(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10

五、發明說明(10)

的NBLAST和XBLAST程式中。爲了比較的目的，欲獲得缺口排列，可按照在Altschul等人(1997) Nucleic Acids Research 25 (17):3389-3402的描述，使用缺口的BLAST。當使用BLAST和缺口的BLAST程式時，可使用個別程式(例如XBLAST和NBLAST)的預設參數。參見<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。可使用的另一種數學演算法，是在ALIGN程式中使用的，描述在Myers和Miller (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17中。

當選出適當的同一性/類似性區域時，可以化學方式合成相當於該區域的二元專一性抗原。例如，對肽抗原而言，可藉著標準肽合成方法合成該肽。在一個具體實施例中，肽抗原包括L胺基酸。在其他的具體實施例中，肽抗原可以是部份地或全部地由D胺基酸所組成。在實例1中將詳細地描述以在兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質之間的同一性及/或類似性之相鄰拓撲區爲基礎，設計二元專一性抗原的實例。

B.環狀肽模仿結構環

在另一個具體實施例中，本發明之二元專一性抗原包括環狀分子，較佳的是環狀肽，其在結構上模仿兩個不同但在結構上有關聯之分子(例如蛋白質)的共同折疊之鑰匙環，二元專一性抗體可對其升高。欲製備這類型的抗原，比較兩個相關分子的結構，並確認在這兩個分子中找到之共同折疊的環。可使用標準分子塑型和結晶術分析，協助確認這類的環和共同折疊。確認出相同和類似的區域(例如在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(11)

兩個蛋白質之間的胺基酸序列)，並可對類似但不相同的區域設計一致序列。以這些類似和相同的區域為基礎，設計直線分子，例如直線肽，然後可藉著已知的化學方法將該直線分子環化，產生模仿鑰匙環的抗原。例如，可將脯胺酸和甘胺酸加在直線肽的末端，容許該肽的環化作用。在實例2中將詳細地描述以模仿由兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質共享之結構環的環狀肽為基礎，設計二元專一性抗原的實例。

C. 雜種分子

在另一個具體實施例中，本發明之二元專一性抗原包括雜種分子，最好是雜種肽，其包括兩個不同但在結構上有關聯之分子(例如蛋白質)的交替及/或部份重疊之區域，二元專一性抗體可對其升高。欲製備這類型的抗原，比較這兩個分子的結構，並確認部份重疊的區域(也就是同一性之區域)，以及在這兩個分子之間不相同的區域。所製備之雜種分子(例如雜種肽，當兩個相關分子是蛋白質時)，最好包括得自兩個分子之每一個的交替區域(例如胺基酸序列)，以及兩個分子共同的部份重疊區域。概括而言，可將這類雜種分子描述為：X-Y-Z，其中Y代表在兩個相關分子之間的同一性或極類似之區域(也就是部份重疊之區域)，X代表得自相關分子之一的區域，而Z代表得自另一個相關分子的區域。在實例3中將詳細地描述以由兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質的序列所組成之融合肽為基礎，設計二元專一性抗原的實例。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明(12)

其他類型的雜種分子是其中將肽導入全長蛋白質(稱為"標靶"蛋白質)中的雜種分子。選擇代表兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質之功能區域的肽，例如受體交互作用區。在本文中將這類的肽稱為功能性肽。然後將得自相關蛋白質之一的功能性肽，導入另一個相關蛋白質的全長蛋白質內，或者導入無關的蛋白質內。例如，確認相當於IL-1 α 之受體交互作用區的IL-1 α 肽，並將該IL-1 α 的功能性肽導入全長的IL-1 β 蛋白質內，產生雜種的IL-1 α /IL-1 β 分子。同樣地，確認相當於IL-1 β 之受體交互作用區的IL-1 β 肽，並將該IL-1 β 的功能性肽導入全長的IL-1 α 蛋白質內，產生雜種的IL-1 α /IL-1 β 分子。將功能性肽導入有關聯的全長蛋白質內，迫使該功能性肽在兩端，並維持該功能性肽的折疊結構。

在IL-1 α /IL-1 β 雜種的案例中，最好將功能性肽插入(置換天然的胺基酸)代表IL-1 α 和IL-1 β 之共同折疊結構的標靶區內。這類區域可在蛋白質的整個長度中找到(例如在N-終端的區域、在蛋白質的中央、在C-終端的區域)。此外，亦可將代表共同之IL-1 α /IL-1 β 折疊結構的功能性肽插入無關的蛋白質內，像是白蛋白或一些其他天然存在的蛋白質。在該案例中，肽的較佳插入位置是容許該肽維持想要之折疊結構的區域。因此，插入位置可以是在蛋白質的N-終端、中央或C-終端。在任何天然存在的標靶蛋白質中選擇佈署該肽之位置，以便模仿從其中衍生它之天然蛋白質安置的結構拘束。可將功能性肽簡單地插入標靶蛋白質內，而得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (13)

以將該功能性肽的胺基酸加至標靶蛋白質內，最好是使功能性肽的胺基酸置換插入它之標靶蛋白質的一部份。

作為非-限制的實例，為了用來作為二元專一性抗原，使對抗IL-1 α 和IL-1 β 的二元專一性抗體升高，建構雜種分子，其中將相當於IL-1 α 或IL-1 β 之特定結構元件的功能性肽，在相等的結構位置處，導入全長的IL-1 β 或IL-1 α 內。選出的雜種分子，以IL-1 α 的殘基168-184置換IL-1 β 的殘基160-176。所得的分子具有下列的胺基酸序列，其中以下標線標示經取代之IL-1 α 序列(殘基168-184)：

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQ
VVFSMGAYKSSKDDAKITVILGLKEKNLYLSCVLKDDKP
TLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFESAQFPN
WYISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

(序列識別4號)。

可使用標準分子生物技術(例如選殖、聚合酶連鎖反應)，使用可公開利用的IL-1 α 和IL-1 β cDNA序列和重組的蛋白質表現技術，來製備該分子。可製備雜種的cDNA，導入適當的表現載體中，並可藉著將該表現載體導入適當的宿主細胞內，表現該多肽。

D.以忌水性策略為基礎的肽

在另一個具體實施例中，以忌水性策略為基礎，選擇本發明之二元專一性抗原，選出預測為高抗原性的肽。例如，可使用的電腦軟體，像是由Jameson和Wolf (CABIOS, 4(1), 181-186 (1988))描述的，來計算肽的抗原指標。可選

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明(14)

擇抗體結合的感興趣區域，使抗原性的可能性增加至極限。

E.利用抗原-轉移感染的細胞免疫接種

在另一個具體實施例中，藉著以抗原-轉移感染的細胞(也就是說本發明之二元專一性抗原可以是抗原-轉移感染的細胞)免疫接種動物，來製備本發明之二元專一性抗體。可產生穩定表現兩個不同但在結構上有關聯之抗原，或其雜種分子的細胞株。例如，可產生穩定表現IL-1 α 或IL-1 β ，或IL-1 α /IL-1 β 雜種分子(例如序列識別4號)的細胞株。可從該細胞中分泌感興趣的分子(在可溶性蛋白質的案例中)，或可在細胞表面表現感興趣的分子(在受體、酵素的案例中)。可藉著許多傳統的方法，完成將基因遞送至宿主細胞內，而容許由該宿主細胞表現抗原，這些傳統方法包括但不限於轉移感染、電穿透作用、細胞融合、脂染作用、顆粒撞擊、微量注射或病毒感染。然後可經由一或多個各種路徑(腹腔內、皮下、肌肉內及其類似者)，將表現感興趣抗原的細胞株，移植到產製抗體的感興趣動物內。此時細胞擔任感興趣之抗原的緩慢釋放來源。最好該細胞表現全長的蛋白質。然而，亦可表現抗原之片段。至於可溶性蛋白質，最好是由細胞分泌該蛋白質。欲產生兩個密切相關受體之細胞外功能部位的二元專一性抗體，最好是在細胞的表面上表現該受體。

F.利用一個在結構上有關聯之分子的免疫接種

在另一個具體實施例中，二元專一性抗原單純地是兩個

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (15)

不同但在結構上有關聯的分子之一，二元專一性抗體對其升高。使用兩個相關分子之一作為免疫原，然後就與兩個不同但在結構上有關聯之分子兩者結合，更佳的是中和兩者，來篩選所得的抗體譜。例如，可利用IL-1 α 或IL-1 β 免疫接種，然後篩選 α/β 結合者，更佳的是中和者。當在本具體實施例中使用時，"免疫接種"一詞企圖廣泛地包括使抗體譜暴露在抗原之下，像是IL-1 α 或IL-1 β ，在活體內或在活體外。因此，本具體實施例包括以IL-1 α 或IL-1 β 免疫接種動物，並篩選所得的升高抗體，選擇與IL-1 α 和IL-1 β 兩者結合的那些抗體，以及利用IL-1 α 或IL-1 β 在活體外篩選重組的抗體庫，然後選擇與IL-1 α 和IL-1 β 兩者結合的重組抗體。

II. 製造二元專一性抗體的方法

欲製備本發明之二元專一性抗體，使抗體譜暴露在按照先前章節中之描述製備的二元專一性抗原之下(在活體內或在活體外)，並從該譜中選擇適當的二元專一性抗體。抗體認出抗原的兩個要素，是結構的辨認和以專一之分子交互作用為基礎的親和力成熟。在天然的免疫反應期間，容易發展出認得結構特徵的低親和力抗體(例如抗原被某些圖案辨認受體認出)，且事先在天然的免疫反應中，伴隨著體細胞突變，以便增加少數純種系的親和力。已經發展出各種在活體內和在活體外的方法，模仿該天然現象。可藉著任何在本文中描述的在活體外和在活體內之方法，產生低親和力的二元專一性抗體，並可藉著在本文中描述的體

五、發明說明 (16)

細胞突變生成方法，製備高親和力的二元專一性MAbs。此外，欲使高親和力之二元專一性MAbs發揮最大效用，可利用想要的抗原製造低親和力MAbs的共同-結晶結構。所獲得的結構資訊，可藉著使MAbs的特定接觸殘基改變(突變)，增強特定的分子交互作用，如同在本文中描述的，而進一步引導親和力的增強作用。

在下列的細目中，更詳細地描述使用在活體內之方法、在活體外之方法，或兩者的組合，來製造二元專一性抗體的方法。

A. 在活體內的方法

標準在活體內製備抗體的方法，是藉著以抗原免疫接種適當的動物個體，藉此使在活體內的抗體譜暴露在該抗原之下，接著從動物中回收感興趣的抗體或抗體群。可改編這類方法，藉著使用二元專一性抗原，製備二元專一性抗體，並選擇專一地認得兩個在結構上有關聯之感興趣分子的抗體。可藉著以二元專一性抗原的免疫原製品，免疫接種適當的個體(例如兔子、山羊、老鼠或其他哺乳動物，包括這類動物的基因轉殖和擊倒版本)，來製備二元專一性抗體。適當的免疫原製品可含有，例如以化學方式合成或重組表現的二元專一性抗原。該製品可進一步包括佐劑，像是福瑞德(Freund's)完全或不完全佐劑，或類似的免疫刺激化合物。此外，當用來使抗體升高時，特別是藉著在活體外的免疫接種時，可單獨使用本發明之二元專一性抗原，或更佳的是使用帶有載劑蛋白質的共軛物。這類提高抗

五、發明說明 (17)

體反應的方法是此項技藝中已熟知的。可與二元專一性抗原結合之適當載劑蛋白質的實例，包括鎖孔~~蟻~~血藍蛋白 (KLH)和白蛋白。

可從該個體中獲得產生抗體的細胞，並藉著標準技術用來製備單株抗體，像是最初由 Kohler 和 Milstein (1975, Nature 256:495-497) 描述的融合瘤技術 (亦參見 Brown 等人 (1981) J. Immunol 127:539-46 ; Brown 等人 (1980) J Biol Chem 255:4980-83 ; Yeh 等人 (1976) PANS 76:2927-31 ; 以及 Yeh 等人 (1982) Int. J. Cancer 29:269-75)。產製單株抗體融合瘤的技術是已熟知的 (通常參見 R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980) ; E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402 ; M. L. Gefter 等人 (1977) Somatic Cell Genet., 3:231-36)。簡言之，將永生不死的細胞株 (通常為融合瘤) 與得自按照上述，以二元專一性免疫原免疫接種之哺乳動物的淋巴細胞 (通常是脾臟細胞或淋巴結細胞或周圍血液淋巴細胞) 融合，並篩選所得之融合瘤細胞的培養物上清液，確認產製對兩個不同但在結構上有關聯之感興趣分子具有二元專一性之單株抗體的融合瘤。為了產製二元專一性單株抗體之目的，可應用任何許多已熟知之用來融合淋巴細胞和永生不死之細胞株的草案 (參見，例如 G. Galfre 等人 (1977) Nature 266:550-52 ; Gefter 等人 Somatic Cell Genet.，在前提及 ; Lerner, Yale J. Biol. Med.，在前提及 ; Kenneth,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (18)

Monoclonal Antibodies，在前提及)。此外，普通的熟諳此藝者應了解這類方法的許多變化，亦將是有用的。通常，永生不死的細胞株(例如骨髓瘤細胞株)，係衍生自與淋巴細胞相同的哺乳動物物種。例如，可藉著將得自以本發明之免疫原製品免疫接種的老鼠的淋巴細胞，與永生不死的老鼠細胞株融合，來製造老鼠的融合瘤。較佳的永生不死細胞株是老鼠的骨髓瘤細胞株，其對含有次黃嘌呤、胺基蝶呤和胸腺嘧啶的培養基("HAT培養基")是敏感的。根據標準技術，可使用許多骨髓瘤細胞株的任一個作為融合夥伴，例如 P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 或 Sp2/O-Ag14 骨髓瘤細胞株。這些骨髓瘤細胞株可獲自 American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md.。通常使用聚乙二醇("PEG")將對 HAT 敏感的老鼠骨髓瘤細胞與老鼠脾臟細胞融合，其殺死未融合和未多產地融合的骨髓瘤細胞(未融合的脾臟細胞在數天後死亡，因為它們未被轉化)。藉著就這類抗體篩選融合瘤培養物的上清液，例如使用標準 ELISA 測定，選擇可專一地與這兩個相關分子結合的那些抗體，來確認產生專一地認出兩個在結構上有關聯之感興趣分子的單株抗體之融合瘤細胞。

依據想要的抗體類型，可使用各種動物宿主進行在活體內的免疫接種。可使用本身表現感興趣抗原(群)之內源版本的宿主，或者可使用在感興趣抗原(群)之內源版本方面已經有缺陷的宿主。例如，已經顯示當以某個蛋白質進行免疫接種時，在誘發對該蛋白質之體液反應的相對應之內

五、發明說明 (19)

源基因處，經由同種重組作用，使老鼠成為缺乏特定之內源蛋白質的(也就是"擊倒"老鼠)，並因此可用來產製對抗該蛋白質的高親和力單株抗體(參見，例如 Roes, J.等人(1995) J. Immunol. Methods 183:231-237; Lunn, M.P.等人(2000) J. Neurochem. 75:404-412)。

至於產製非-人類抗體(例如，對抗人類二元專一性抗原)，各種非-人類之哺乳動物均適合作為產製抗體的宿主，包括但不限於老鼠、大鼠、兔子和山羊(及其擊倒版本)，雖然對融合瘤的產製而言，老鼠是較佳的。此外，為了產製對抗人類二元專一性抗原的完整-人類抗體，可使用表現人類抗體譜的非-人類動物宿主。這類非-人類動物包括帶有人類免疫球蛋白轉殖基因之基因轉殖動物(例如老鼠)、hu-PBMC-SCID嵌合型老鼠，以及人類/老鼠放射嵌合體，在下文中分別進一步地討論。

因此，在一個具體實施例中，利用二元專一性抗原免疫接種的動物是非-人類的哺乳動物，最好是老鼠，為了人類的免疫球蛋白基因將其進行基因轉殖，使得在抗原刺激時，該非-人類的哺乳動物(例如老鼠)製造人類的抗體。在這類動物中，通常將人類生殖種系組態之重和輕鏈免疫球蛋白的轉殖基因，導入已經經過設計的動物中，使得它內源的重和輕鏈位點是失活的。當以抗原刺激這類動物時(例如以人類抗原)，產生衍生自人類免疫球蛋白序列的抗體(也就是人類抗體)，並可藉著標準融合瘤技術，從這類動物的淋巴細胞來製造人類的單株抗體。關於人類免疫球蛋白之

五、發明說明 (20)

基因轉殖老鼠，及其在產製人類抗體中之用途的進一步說明，參見例如 Abgenix Inc. 的美國專利第 5,939,598 號、PCT 公告第 WO 96/33735 號、PCT 公告第 WO 96/34096 號、PCT 公告第 WO 98/24893 號和 PCT 公告第 WO 99/53049 號，以及 Genpharm Inc. 的美國專利第 5,545,806 號、第 5,569,825 號、第 5,625,126 號、第 5,633,425 號、第 5,661,016 號、第 5,770,429 號、第 5,814,318 號、第 5,877,397 號和 PCT 公告第 WO 99/45962 號。亦參見 MacQuitty, J.J. 和 Kay, R.M. (1992) Science 257:1188；Taylor, L.D. 等人 (1992) Nucleic Acids Res. 20:6287-6295；Lonberg, N. 等人 (1994) Nature 368:856-859；Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93；Harding, F.A. 和 Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546；Fishwild, D.M. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851；Mendez, M.J. 等人 (1997) Nature Genetics 15:146-156；Green, L.L. 和 Jakobovits, A. (1998) J. Exp. Med. 188:483-495；Green, L.L. (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23；Yang, X.D. 等人 (1999) J. Leukoc. Biol. 66:401-410；Gallo, M.L. 等人 (2000) Eur. J. Immunol. 30:534-540。

在另一個具體實施例中，以二元專一性抗原免疫接種的動物是帶有重症性聯合免疫缺陷病 (SCID)，已經利用人類周圍血液單核細胞或淋巴細胞或其前驅物重建的老鼠。已經證實這類老鼠，稱為 hu-PBMC-SCID 嵌合型老鼠，當以抗原刺激時，產生人類免疫球蛋白反應。關於這些老鼠及其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (21)

在抗體產製上之用途的進一步說明，參見例如 Leader, K.A. 等人(1992) Immunology 76:229-234 ; Bombil, F. 等人(1996) Immunobiol. 195:360-375 ; Murphy, W.J. 等人(1996) Semin. Immunol. 8:233-241 ; Herz, U. 等人(1997) Int. Arch. Allergy Immunol. 113:150-152 ; Albert, S.E. 等人(1997) J. Immunol. 159:1393-1403 ; Nguyen, H. 等人(1997) Microbiol. Immunol. 41:901-907 ; Arai, K. 等人(1998) J. Immunol. Methods 217: 79-85 ; Yoshinari, K. 和 Arai, K. (1998) Hybridoma 17:41-45 ; Hutchins, W.A. 等人(1999) Hybridoma 18:121-129 ; Murphy, W.J. 等人(1999) Clin. Immunol. 90:22-27 ; Smithson, S.L. 等人(1999) Mol. Immunol. 36:113-124 ; Chamat, S. 等人(1999) J. Infect. Diseases 180:268-277 ; 以及 Heard, C. 等人(1999) Molec. Med. 5:35-45。

在另一個具體實施例中，以二元專一性抗原免疫接種的動物，是已經利用致命的整體照射處理過，接著利用重症性聯合免疫缺陷病(SCID)老鼠之骨髓細胞的放射性保護，接著移植具有功能之人類淋巴細胞的老鼠。已經使用這類型的嵌合體，稱為 Trimerica 系統，藉著以感興趣之抗原免疫接種老鼠，接著使用標準融合瘤技術製備單株抗體，來產製人類的單株抗體。關於這些老鼠及其在抗體產製上之用途的進一步說明，參見例如 Eren, R. 等人(1998) Immunology 93:154-161 ; Reisner, Y. 和 Dagan, S. (1998) Trends Biotechnol. 16:242-246 ; Ilan, E. 等人(1999) Hepatology 29:553-562 ; 以及 Bocher, W.O. 等人(1999) Immunology

五、發明說明 (22)

96:634-641。

B.在活體外的方法

製備二元專一性抗體的另一種選擇，係藉著在活體內的免疫接種和選擇，可藉著以二元專一性抗原篩選重組的綜合免疫球蛋白庫(例如抗體噬菌體展示庫)，確認並分離本發明的二元專一性抗體，藉此分離專一地結合兩個在結構上有關聯，但不同的感興趣分子之免疫球蛋白庫成員。產製和篩選噬菌體展示庫的套組是市售的(例如 Pharmacia Recombinant Phage Antibody System，目錄第27-9400-01號；以及 Stratagene SurfZAPTM Phage Display Kit，目錄第240612號)。在各種具體實施例中，噬菌體展示庫是scFv庫或Fab庫。在此項技藝中已經徹底地描述了篩選重組抗體庫的噬菌體展示技術。特別適用於產製和篩選抗體展示庫之方法和化合物的實例，可在例如 McCafferty等人，國際公告第WO 92/01047號、美國專利第5,969,108號和歐洲專利589,877號(特別描述scFv的展示)、Ladner等人，美國專利第5,223,409號、第5,403,484號，第5,571,698號，第5,837,500號和歐洲專利436,597號(描述例如pIII融合)；Dower等人，國際公告第WO 91/17271號、美國專利第5,427,908號、美國專利第5,580,717號和歐洲專利527,839號(特別描述Fab的展示)；Winter等人，國際公告第WO 92/20791號和歐洲專利368,684號(特別描述免疫球蛋白可變功能部位序列的選殖)；Griffiths等人，美國專利第5,885,793號和歐洲專利589,877號(特別描述使用重組庫，對人類抗原之人類抗體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (23)

的分離)；Garrard等人，國際公告第WO 92/09690號(特別描述噬菌體表現庫)；Knappik等人，國際公告第WO 97/08320號(描述人類重組抗體庫HuCal)；Salfeld等人，國際公告第WO 97/29131號(描述對人類抗原(人類腫瘤壞死因子 α)之重組人類抗體的製備，以及重組抗體之在活體外的親和力成熟)，和Salfeld等人，美國臨時申請案第60/126,603號(亦描述對人類抗原(人類介白素-12)之重組人類抗體的製備，以及重組抗體之在活體外的親和力成熟)中找到。

重組抗體庫篩選的其他說明，可在科學公告中找到，像是Fuchs等人(1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay等人(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85；Huse等人(1989) Science 246:1275-1281；Griffiths等人(1993) EMBO J 12:725-734；Hawkins等人(1992) J Mol Biol 226:889-896；Clarkson等人(1991) Nature 352:624-628；Gram等人(1992) PNAS 89:3576-3580；Garrad等人(1991) Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboom等人(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137；Barbas等人(1991) PNAS 88:7978-7982；McCafferty等人Nature (1990) 348:552-554；以及Knappik等人(2000) J. Mol. Biol. 296:57-86。

使用細菌噬菌體展示系統的另一種選擇，可在酵母菌細胞或細菌細胞的表面上表現重組的抗體庫。製備和篩選在酵母菌細胞表面表現之庫的方法，進一步描述在PCT公告WO 99/36569號中。製備和篩選在細菌細胞表面表現之庫的方法，進一步描述在PCT公告WO 98/49286中。

五、發明說明(24)

一旦已經從綜合庫中確認出感興趣的抗體，便可藉著標準分子生物技術，分離編碼該抗體之輕和重鏈的DNAs，像是藉著DNA的PCR擴大作用，在庫篩選過程的期間內，從展示包裝(例如噬菌體)中分離。可從抗體輕和重鏈基因之核苷酸序列來製備PCR引子，是此項技藝中已知的。例如，在Kabat, E.A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公告第91-3242號中，以及在"Vbase"人類生殖種系序列資料庫中揭示了許多的這類序列。

可藉著免疫球蛋白輕和重鏈基因在宿主細胞中的重組表現，製備本發明之抗體或抗體部份。欲以重組方式表現抗體，以一或多個帶有編碼該抗體之免疫球蛋白輕和重鏈的DNA片段之重組表現載體，轉移感染宿主細胞，而得以在該宿主細胞中表現該輕和重鏈，且最好是分泌至在其中培養該宿主細胞的培養基中，可從該培養基中回收該抗體。使用標準重組DNA方法學，獲得抗體之重和輕鏈基因，將這些基因併入重組的表現載體內，並將該載體導入宿主細胞內，像是在Sambrook, Fritsch和Maniatis(編輯), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Ausubel, F.M.等人(編輯), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989), 以及在Boss等人的美國專利第4,816,397號中描述的那些。

五、發明說明 (25)

一旦獲得編碼感興趣抗體之VH和VL斷片的DNA片段，可進一步藉著標準重組DNA技術，來操縱這些DNA片段，例如將可變區基因轉變為全長的抗體鏈基因、Fab片段基因，或scFv基因。在這些操縱中，以可操作之方式將編碼VL-或VH-的DNA片段與編碼其他蛋白質的其他DNA片段連接，像是抗體恆定區或有彈性的交聯劑。在這種關聯中使用"以可操作之方式連接"一詞，企圖意指連接兩個DNA片段，使得由這兩個DNA片段編碼的胺基酸序列仍在架構中。

可藉著以可操作之方式，將編碼VH之DNA與編碼重鏈恆定區(CH1、CH2和CH3)的其他DNA分子連接，將編碼VH-區的經過分離之DNA轉變成全長的重鏈基因。人類重鏈恆定區基因的序列是此項技藝中已知的(參見例如，Kabat, E.A., 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公告第91-3242號)，並可藉著標準PCR擴大作用獲得包括這些區域的DNA片段。重鏈恆定區可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但最佳的是IgG1或IgG4恆定區。至於Fab片段重鏈基因，可以可操作之方式，將編碼VH-之DNA與僅編碼重鏈CH1恆定區之其他DNA分子連接。

可藉著以可操作之方式，將編碼VL之DNA與編碼輕鏈恆定區，CL的其他DNA分子連接，將編碼VL-區的經過分離之DNA轉變成全長的輕鏈基因。人類輕鏈恆定區基因的序列是此項技藝中已知的(參見例如，Kabat, E.A. 等人(1991))

五、發明說明 (26)

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公告第91-3242號), 並可藉著標準PCR擴大作用獲得包括這些區域的DNA片段。輕鏈恆定區可以是 κ 或 λ 恆定區, 但最佳的是 κ 恆定區。

欲創造scFv基因, 以可操作之方式將編碼VH-和VL-之DNA片段與編碼有彈性交聯劑的其他片段連接, 例如編碼胺基酸序列(Gly₄-Ser)₃, 而得以以相鄰之單鏈蛋白質的形式, 來表現VH和VL序列, 並藉著有彈性的交聯劑連接VL和VH區(參見例如, Bird等人(1988) Science 242:423-426; Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等人, Nature (1990) 348:552-554)。

欲表現本發明之重組抗體或抗體部份, 可將按照上述獲得的編碼部份或全長之輕和重鏈的DNAs導入表現載體內, 使得該基因以可操作之方式與轉錄和轉譯控制序列連接。關於此點, "以可操作之方式連接"一詞企圖意指將抗體基因連接到載體內, 使得在該載體內的轉錄和轉譯控制序列得以提供其調節該抗體基因之轉錄和轉譯的想要功能。選擇可與所使用之表現宿主細胞相容的表現載體和表現控制序列。可將抗體輕鏈基因和抗體重鏈基因插入不同的載體內, 或較具代表性的是, 將兩個基因插入相同的表現載體內。藉著標準方法將抗體基因插入表現載體內(例如在抗體基因片段和載體上之互補限制位置的連接作用, 或是如果未出現限制位置, 則為鈍端的連接作用)。在插入輕或重

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(27)

鏈序列之前，該表現載體可業已帶有抗體恆定區序列。例如，一種將VH和VL序列轉變為全長抗體基因的方法，是將其插入業已分別編碼重鏈恆定和輕鏈恆定區的表現載體內，使得VH斷片以可操作之方式與載體內的CH斷片(群)連接，而VL斷片以可操作之方式與載體內的CL斷片連接。額外地或另外地，重組表現載體可編碼信號肽，其有助於從宿主細胞中分泌抗體鏈。可將抗體鏈選殖到載體內，以便在架構中將該信號肽與抗體鏈基因的胺基終端連接。信號肽可以是免疫球蛋白信號肽，或異種的信號肽(也就是得自非-免疫球蛋白之蛋白質的信號肽)。

除了抗體鏈基因之外，本發明之重組表現載體亦帶有調節序列，其控制抗體鏈基因在宿主細胞中的表現。"調節序列"一詞企圖包括啟動基因、促進子和其他的表現控制元件(例如聚腺苷酸化作用信號)，其控制抗體鏈基因的轉錄或轉譯作用。這類調節序列描述在例如 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中。熟諳此藝者將了解表現載體的設計，包括可依據諸如待轉化之宿主細胞的選擇、想要的蛋白質表現程度等等的因素來選擇調節序列。對於哺乳動物宿主細胞表現而言，較佳的調節序列包括病毒的元件，其指揮在哺乳動物細胞中以高程度表現蛋白質，像是衍生自細胞巨大病毒(CMV)的啟動基因及/或促進子(像是CMV啟動基因/促進子)、猿病毒40(SV40)(像是SV40啟動基因/促進子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (28)

基因(AdMLP))和多瘤病毒。關於病毒調節元件及其序列的進一步說明，參見例如Stinski的美國專利第5,168,062號，Bell等人的美國專利第4,510,245號，以及Schaffner等人的美國專利第4,968,615號。

除了抗體鏈基因和調節序列之外，本發明之重組表現載體亦可帶有額外的序列，像是調節載體在宿主細胞中複製的序列(例如複製起點)和可選擇標記基因。可選擇標記基因有助於選擇已經將該載體導入其內的宿主細胞(參見例如，Axel等人的美國專利第4,399,216號、第4,634,665號，和第5,179,017號)。例如，可選擇標記基因通常對已經在其中導入該載體之宿主細胞，賦與對藥物的抵抗力，像是G418、潮黴素或胺甲喋呤。較佳的可選擇標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於dhfr⁻宿主細胞，利用胺甲喋呤選擇/擴大作用)，和neo基因(供G418選擇作用)。

爲了表現輕和重鏈，藉著標準技術將編碼重和輕鏈的表現載體(群)轉移感染至宿主細胞內。各種形式的"轉移感染"一詞，企圖包括經常用來將外源的DNA導入原核生物或真核生物宿主細胞內的各種技術，例如電穿透作用、磷酸鈣沉澱法、DEAE-葡聚糖轉移感染及其類似者。雖然在理論上有可能在原核生物或真核生物宿主細胞中表現本發明之抗體，但在真核生物細胞，且最好是哺乳動物宿主細胞中表現抗體是最佳的，因爲這類真核生物細胞，且特別是哺乳動物細胞，比原核生物細胞更可能裝配和分泌經過適當折疊，並具有免疫活性的抗體。已經報告了抗體基因的原

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (29)

核生物表現，對於產製高產量之活性抗體是無效的(Boss, M.A.和 Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。

表現本發明之重組抗體的較佳哺乳動物宿主細胞，包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括 dhfr-CHO細胞，描述在 Urlaub和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220中，與 DHFR可選擇標記一起使用，例如，如同在 R.J. Kaufman和 P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621中的描述)、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞和 SP2細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體導入哺乳動物宿主細胞中時，藉著培養該宿主細胞一段足以容許該抗體在宿主細胞中表現，或更佳的是將該抗體分泌至宿主細胞在其中生長之培養基中的時間，來產製抗體。可使用標準蛋白質純化方法，從培養基中回收該抗體。

亦可使用產生完整抗體之部份的宿主細胞，像是 Fab片段或 scFv分子。將瞭解上文程序中的變化，亦在本發明的範圍內。例如，可能想要以編碼本發明抗體之輕鏈或重鏈(但不是兩者)的 DNA，來轉移感染宿主細胞。亦可使用重組的 DNA技術，移除一些或全部的編碼任一個輕和重鏈或兩者的 DNA，其對於與感興趣之抗原結合是不必要的。本發明之抗體亦包括由這類截短之 DNA分子表現的分子。此外，亦可產製雙重功能的抗體，其中一個重和一個輕鏈是本發明之抗體，而另一個重和輕鏈則對與感興趣之抗原不同的抗原有專一性，藉著使本發明之抗體，藉著標準化學交聯方法，與第二個抗體交聯。

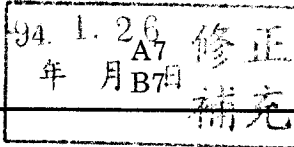
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (30)

在本發明之抗體，或其抗原-結合物之重組表現之較佳系統中，藉著磷酸鈣-調節之轉移感染作用，將編碼抗體重鏈和抗體輕鏈兩者的重組表現載體，導入dhfr-CHO細胞中。在該重組表現載體中，抗體重和輕鏈基因分別以可操作之方式與CMV促進子/AdMLP啟動基因調節元件連接，駕馭高程度的基因轉錄作用。重組表現載體亦帶有DHFR基因，其容許使用胺甲碟呤選擇/擴大作用，選擇已經以該載體轉移感染的CHO細胞。培養選出的轉化宿主細胞，容許表現抗體重和輕鏈，並從培養基中回收完整的抗體。使用標準分子生物學技術，製備重組表現載體，轉移感染宿主細胞，選擇轉化物，培養宿主細胞，並從培養基中回收抗體。本發明更進一步提供藉著在適當的培養基中培養本發明之宿主細胞，直到合成本發明之重組抗體為止，合成本發明之重組抗體的方法。該方法尚包括從培養基中分離重組的抗體。

藉著噬菌體展示篩選重組抗體庫的另一種選擇，可應用此項技藝中已知的，篩選大綜合庫的其他方法學，確認本發明之二元專一性抗體。表現系統的另一種選擇，一種是其中以RNA-蛋白質融合之形式來表現重組的抗體庫，如同在Szostak和Roberts的PCT公告第WO 98/31700號中，以及在Roberts, R.W.和Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302中描述的。在該系統中，在mRNA和肽或蛋白質之間產生共價融合，該肽或蛋白質係藉著在其3'末端帶有嘌呤黴素，一種肽基受體抗生素之合成mRNA



五、發明說明 (31)

在活體外的轉譯作用編碼。因此，可從mRNAs的複合混合物(例如綜合庫)中增強特定的mRNA，依據編碼之肽或蛋白質，例如抗體或其部份的性質，像是抗體或其部份與二元專一性抗原的結合作用。可藉著按照上述的重組方法(例如在哺乳動物宿主細胞中)，表現從篩選這類庫中回收之編碼抗體或其部份的核酸序列，況且可藉著篩選mRNA-肽融合的額外循環，使其接受進一步的親和力成熟，其中已經將突變導入最初選出的序列(群)中，或按照上述，藉著在活體外重組抗體之親和力成熟的其他方法。

C. 綜合的方法

亦可使用在活體內和在活體外之方法的組合，製備本發明之二元專一性抗體，像是其中在活體內，在宿主動物中，使二元專一性抗原一開始暴露在抗體譜下，刺激與該二元專一性抗原結合之抗體的產生，但其中使用一或多種在活體外的技術，完成進一步抗體選擇及/或成熟(也就是改善)的方法。

在一個具體實施例中，這類綜合方法涉及首先以二元專一性抗原免疫接種非-人類動物(例如老鼠、大鼠、兔子、山羊或其基因轉殖版本，或嵌合型老鼠)，刺激對抗該抗原的抗體反應，接著使用得自在活體內藉著暴露在該二元專一性抗原下而刺激之淋巴細胞的免疫球蛋白序列，製備和篩選噬菌體展示抗體庫。可按照在上文IIA細目中的描述，來經營該綜合程序的第一個步驟，同時可按照在上文IIB細目中的描述，來經營該程序的第二個步驟。高度免疫非-

五、發明說明 (32)

人類動物，接著在活體外篩選從經過刺激之淋巴細胞製備的噬菌體展示庫的較佳方法學，包括由BioSite Inc.描述的那些，參見例如，PCT公告WO 98/47343、PCT公告WO 91/17271、美國專利第5,427,908號和美國專利第5,580,717號。

在另一個具體實施例中，綜合方法涉及首先以二元專一性抗原免疫接種非-人類動物(例如老鼠、大鼠、兔子、山羊或其擊倒及/或基因轉殖版本，或嵌合型老鼠)，刺激對抗該抗原的抗體反應，並選擇產生具有想要的二元專一性之抗體的淋巴細胞(例如藉著篩選從經過免疫接種之動物來製備的融合瘤)。然後分離得自選出之純種系的再排列基因(藉著標準選殖方法，像是逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應)，並接受在活體外的親和力成熟，藉此促進所選出之抗體或抗體群的結合特性。可按照在上文IIA細目中的描述，經營該程序的第一個步驟，同時按照在上文IIB細目中的描述，來經營該程序的第二個步驟，特別使用在活體外的親和力成熟方法，像是在PCT公告WO 97/29131和PCT公告WO 00/56772中描述的那些。

在另一個綜合方法中，從單一、經過分離的淋巴細胞中，使用在此項技藝中稱為選擇淋巴細胞抗體法(SLAM)的程序，產生重組抗體，按照在美國專利第5,627,052號、PCT公告WO 92/02551，和Babcock, J.S.等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848中的描述。在該方法中，因為應用本發明之二元專一性抗體，首先在活體內以二元專一

五、發明說明 (33)

性抗原免疫接種非-人類動物(例如老鼠、大鼠、兔子、山羊或其基因轉殖版本，或嵌合型老鼠)，刺激對抗該抗原的抗體反應，然後使用抗原-專一的溶血斑點測定(例如使用交聯劑，像是生物素，將二元專一性抗原本身，或感興趣之在結構上有關聯的分子與綿羊紅血球偶聯，藉此容許使用溶血斑點測定，確認分泌帶有適當專一性之抗體的單一細胞)，選擇分泌感興趣抗體的單一細胞，例如對該二元專一性抗原專一的。在確認分泌抗體的感興趣細胞之後，藉著逆轉錄酶-PCR，再從該細胞中救出重-和輕-鏈可變區 cDNAs，然後可在哺乳動物宿主細胞中，像是COS或CHO細胞中，表現這些可變區(例如人類恆定區)。利用經過擴大，衍生自在活體內選擇之淋巴細胞的免疫球蛋白序列轉移感染宿主細胞，然後使其接受進一步的分析和在活體外的選擇，例如淘洗經過轉移感染的細胞，以便分離表現具有想要的二元專一性之抗體的細胞。可在活體外進一步操縱經過擴大的免疫球蛋白序列，像是藉著在活體外的親和力成熟，如同上述。

在另一個具體實施例中，產生二元專一性抗體的綜合方法涉及下列步驟。利用第一個抗原免疫接種第一個非-人類動物，並以第二個不同的抗原免疫接種第二個非-人類動物，其中第二個抗原最好在結構上類似第一個抗原，以便刺激在活體內的抗體反應。按照在IIB章中的描述，分別從衍生自第一個非-人類動物和第二個非-人類動物的抗體基因中，建構重組的重鏈庫和重組的輕鏈庫。將得自以第一個

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (34)

抗原免疫接種之動物的重鏈庫與得自以第二個抗原免疫接種之動物的輕鏈庫混合，產生抗體庫X。同樣地，將得自以第二個抗原免疫接種之動物的重鏈庫與得自以第一個抗原免疫接種之動物的輕鏈庫混合，產生抗體庫Y。另外，可混合庫X和Y，產生庫XY。可從X、Y及/或XY庫中，確認和分離與第一和第二個抗原結合的二元專一性抗體。

III. 定出二元專一性抗體的特徵

本發明提供二元專一性抗體，以及其抗體部份，其可根據本發明之方法來製備。較佳的是，抗體或其部份是經過分離的抗體。較佳的是，抗體或其部份是中和抗體。本發明之抗體包括單株和重組抗體，及其部份。在各種具體實施例中，抗體或其部份可包括完全衍生自單一物種的胺基酸序列，像是完全的人類或完全的老鼠抗體，或其部份。在其他的具體實施例中，抗體或其部份可以是嵌合型抗體，或CDR-移植的抗體，或其他形式的人類化抗體。

當在本文中使用"抗體"一詞時，企圖意指免疫球蛋白分子，其包括四個多肽鏈，兩個重(H)鏈和兩個輕(L)鏈，藉著二硫鍵互相連接。每個重鏈分別包括重鏈可變區(在本文中縮寫為HCVR或VH)和重鏈恆定區。重鏈恆定區包括三個功能部位，CH1、CH2和CH3。每個輕鏈包括輕鏈可變區(在本文中縮寫為LCVR或VL)和輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包括一個功能部位CL。可將VH和CL區進一步細分為高變區，稱為互補性決定區(CDR)，有較受保護之區域點綴於其中，稱為骨架區(FR)。每個VH和VL分別由三個CDRs和四

五、發明說明 (35)

個FRs所組成，以下列順序從胺基-終端排列至羧基-終端：
FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。

當在本文中使用的抗體的"抗原結合部份"(或單純的"抗體部份")一詞時，意指一或多個二元專一性抗體的片段，其保留專一地與兩個不同但在結構上有關聯之抗原結合的能力。已經顯示可藉著全長抗體的片段，執行抗體的抗原結合功能。在抗體的"抗原結合部份"一詞中包括之結合片段的實例，包括(i) Fab片段，由VL、VH、CL和CH1功能部位的單價片段所組成；(ii) F(ab')₂片段，包括在絞鏈區藉著二硫橋連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii) Fd片段，由VH和CH1功能部位所組成；(iv) Fv片段，由抗體之單臂的VL和VH功能部位所組成；(v) dAb片段(Ward等人，(1989) Nature 341:544-546)，其由VH功能部位所組成；以及(vi) 經過分離的互補性決定區(CDR)。此外，雖然Fv片段的兩個功能部位，VL和VH，係由不同的基因編碼，但可使用重組的方法，藉著合成的交聯劑將其連接，該交聯劑能夠以單一蛋白質鏈的形式製造它們，其中VL和VH區配對，而形成單價的分子(稱為單鏈Fv(scFv)；參見例如，Bird等人(1988) Science 242:423-426；以及Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。亦企圖將這類單鏈抗體包含在抗體的"抗原結合部份"一詞中。亦包括其他形式的單鏈抗體，像是雙元體(diabodies)。雙元體是二價的雙重專一性的抗體，其中在單一多肽鏈上表現VH和VL功能部位，但使用的交聯劑太短，以致於不容許在相同鏈上的兩

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (36)

個功能部位之間配對，藉此集中使功能部位與另一個鏈的互補功能部位配對，並產生兩個抗原結合位置(參見例如 Holliger, P. 等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., 等人(1994) Structure 2:1121-1123)。

此外，抗體或其抗原結合部份可以是藉著抗體或抗體部份與一或多個其他蛋白質或肽的共價或非共價結合，而形成之較大免疫黏附(immunoadhesion)分子的一部份。這類免疫黏附分子的實例，包括使用鏈黴菌抗生物素蛋白核心區，來製造的四聚 scFv 分子(Kipriyanov, S.M., 等人(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)，以及使用半胱胺酸殘基，標記肽和 C-終端聚組胺酸標籤，製造的二價和生物素基化之 scFv 分子(Kipriyanov, S.M., 等人(1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)。可從整個抗體中，使用傳統的技術，像是分別以木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗體，來製備抗體部份，像是 Fab 和 F(ab')₂ 片段。此外，亦可使用標準重組 DNA 技術，獲得抗體、抗體部份和免疫黏附分子。

當在本文中使用"經過分離的二元專一性抗體"一詞時，企圖意指實質上不含具有不同抗原專一性之其他抗體的二元專一性抗體(例如經過分離的抗體，專一地與兩個不同但在結構上有關聯之抗原，或其他無關抗原的在結構上有關聯之區域結合，但實質上不含專一地與其他無關抗原結合的抗體)。此外，經過分離的二元專一性抗體可以實質上不

五、發明說明 (37)

含其他的細胞物質及/或化學物質。

當在本文中使用"中和抗體"一詞時，企圖意指其與特定抗原的結合作用，導致抑制該抗原之生物活性的抗體。可藉著使用適當的活體外或活體內測定，測量一或多個該抗原之生物活性的指示劑，來評估該抗原之生物活性的抑制作用。

當在本文中使用"單株抗體"一詞時，企圖意指融合瘤-衍生的抗體(也就是由藉著融合瘤技術，像是標準Kohler和Milstein融合瘤方法學製備之融合瘤分泌的抗體)。因此，本發明之融合瘤衍生的二元專一性抗體仍意指單株抗體，雖然它具有對單一抗原以上的抗原專一性。

"重組抗體"之片語意指藉著重組方法製備、表現、產生或分離的抗體，像是使用轉移感染至宿主細胞內之重組表現載體表現的抗體，從重組的綜合抗體庫中分離的抗體，從基因轉殖人類免疫球蛋白基因之動物(例如老鼠)中分離的抗體(參見例如，Taylor, L.D., 等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)，或藉著任何其他涉及將特定的免疫球蛋白基因序列(像是人類免疫球蛋白基因序列)接合至其他DNA序列內的方法，來製備、表現、產生或分離的抗體。重組抗體的實例包括嵌合型、CDR-移殖的和人類化的抗體。

"人類抗體"一詞意指具有相當於或衍生自人類生殖種系免疫球蛋白序列之可變和恆定區的抗體，如同由例如Kabat等人描述的(參見Kabat等人(1991) Sequences of Proteins

五、發明說明 (38)

of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公告第91-3242號)。然而, 本發明之人類抗體可包括並非由人類生殖種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基(例如藉著在活體外的隨機或指定位置之突變生成作用, 或藉著在活體內之體細胞突變導入的突變), 例如在CDRs或在特定的CDR3中。

本發明之重組人類抗體具有衍生自人類生殖種系之免疫球蛋白序列的可變區, 並亦可包括恆定區(參見Kabat, E.A., 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公告第91-3242號)。然而, 在某些具體實施例中, 使這類重組的人類抗體接受在活體外的突變生成作用(或當使用以人類Ig序列基因轉殖的動物時, 接受在活體內的體細胞突變生成作用), 並因此該重組抗體的VH和VL區之胺基酸序列, 雖然是衍生自並與人類生殖種系VH和VL序列有關的序列, 但並非在活體內天然存在於人類抗體生殖種系譜中的。然而, 在某些具體實施例中, 這類重組抗體為選擇性突變生成作用或回復突變或兩者的結果。

"回復突變"一詞意指其中以得自同種的生殖種系抗體序列之相對應的生殖種系殘基, 置換人類抗體的一些或全部體細胞突變之胺基酸的過程。分別將本發明之人類抗體的重和輕鏈序列, 與在VBASE資料庫中的生殖種系序列排成一直線, 以便確認具有最高同種性的序列。藉著使編碼這類不同胺基酸的限定核苷酸位置突變, 使在本發明之人類

五、發明說明 (39)

抗體中的差異恢復成生殖種系序列。因此確認為回復突變之候選者的每個胺基酸的角色，應該就在抗原結合作用中的直接或間接角色加以調查，並在突變之後，發現會影響人類抗體之任何想要特徵的任何胺基酸，均不應包含在最後的人類抗體中。欲將接受回復突變之胺基酸的數目減至最少，可保留發現與最密切之生殖種系序列不同，但與在第二個生殖種系序列中相對應之胺基酸相同的那些胺基酸位置，其限制條件為第二個生殖種系序列是與本發明之人類抗體序列，在問題胺基酸的兩邊，至少有10個胺基酸，最好是12個胺基酸是相同的和聯合線性的(colinear)。回復突變可出現在抗體最優化的任何階段。

"嵌合型抗體"一詞意指包括得自一個物種的重和輕鏈可變區序列，和得自另一個物種之恆定區序列的抗體，像是與人類恆定區連接的老鼠重和輕鏈可變區。

"CDR-移植之抗體"一詞意指包括得自一個物種的重和輕鏈可變區序列，但其中以另一個物種的CDR序列置換一或多個VH及/或VL的CDR區之序列的抗體，像是具有老鼠重和輕鏈可變區，其中已經以人類CDR序列置換一或多個老鼠CDRs(例如CDR3)的抗體。

"人類化的抗體"一詞意指包括得自非-人類物種(例如老鼠)之重和輕鏈可變區序列，但其中已經將至少一部份的VH及/或VL序列改變成更"像-人類的"，也就是較類似人類生殖種系可變序列的抗體。一種類型的人類化抗體是CDR-移植的抗體，其中將人類CDR序列導入非-人類的VH和VL

五、發明說明 (40)

序列中，置換相對應的非人類CDR序列。

一種測量抗體之結合動力學的方式是藉著表面質粒基因組共振。當在本文中使用的"表面質粒基因組共振"一詞時，意指容許藉著檢測在生物感應器基質中蛋白質濃度上的改變，例如使用BIAcore系統(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)，分析即時生物專一性之交互作用的光學現象。至於進一步的說明，參見Jönsson, U., 等人(1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., 等人(1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., 等人(1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; 以及Johnson, B., 等人(1991) Anal. Biochem. 198:268-277。

當在本文中使用" K_{off} "一詞時，企圖意指抗體從抗體/抗原複合物中解離的關閉速率常數。

當在本文中使用" K_d "一詞時，企圖意指特定抗體-抗原交互作用的解離常數。

可使用任何在上文細目II中描述之各種製備抗體的方法，來製備本發明之二元專一性抗體。本發明之二元專一性抗體基本上可對抗任何在結構上有關聯之抗原，雖然較佳的本發明之二元專一性抗體是專一地結合IL-1 α 和IL-1 β 的那些，可使用諸如在實例1-4中描述的那些二元專一性抗原來製備之。可應用在本發明中的其他在結構上有關聯之抗原，包括但不限於卡斯佩酶(caspase)家族成員、細胞分裂素家族，像是IL-1家族成員(例如IL-1/IL-18)、TNF家族成員(例如TNF α /TNF β)、IL-6家族成員、干擾素、TGF β 家族

五、發明說明(41)

成員、EGF家族成員、FGF家族成員、PDGF家族成員、VEGF家族成員、血管生成素(Angiopoietin)家族成員、骨形態發生蛋白質、分泌性蛋白酶(金屬-蛋白酶)，以及細胞分裂素受體家族，像是IL-1-受體家族成員、TNF-受體家族成員、TGF β 受體家族成員、EGF受體家族成員、FGF受體家族成員、PDGF受體家族成員、VEGF受體家族成員，以及血管生成素受體家族成員。

本發明之二元專一性抗體，可對與其結合的兩個不同但在結構上有關聯之抗原展現相等的結合活性，或者該二元專一性抗體可較優先與兩個抗原之一結合，但與無關的抗原相比較，仍對這兩個相關抗原具有專一性。可使用標準在活體外的免疫測定，像是ELISA或BIAcore分析，評估二元專一性抗體對在結構上有關聯之抗原，以及對無關抗原的結合活性。較佳的是，抗體對在結構上無關之抗原的 K_d ，對抗體對在結構上有關聯之抗體的 K_d 之比例，應該至少是3，更佳的是該比例應該至少是5，再更佳的是該比例應該至少是10，或再更佳的是該比例應該至少是50、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000。

從定量的觀點來看，在背景結合與二元專一性之間的差異是一個含量或程度。例如，背景結合是在低值，例如低於5%，更佳的是低於3%，而最佳的是大約0.1-1%，而專一的交叉反應性或二元專一性結合作用是在較高的值，例如超過1%，較佳的是超過3%，更佳的是超過5%，而再更佳的是超過10%。另外，在特定的生物測定中，二元專一性

五、發明說明 (42)

抗體對標靶抗原的 IC_{50} 最好接近該抗原的 ED_{50} 。

最好選擇本發明之二元專一性抗體，或其抗原結合部份，對於一個，更佳的是對兩個其將專一結合的抗原，具有想要的結合動力學(例如高親和力，低解離，慢的關閉速率，強的中和活性)。例如，二元專一性抗體或其部份，可藉著表面質粒基因組共振的判定，以 0.1 秒^{-1} 或更低的 k_{off} 速率常數，較佳的是 $1 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 或更低的 k_{off} 速率常數，更佳的是 $1 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ 或更低的 k_{off} 速率常數，再更佳的是 $1 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 或更低的 k_{off} 速率常數，或再更佳的是 $1 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 或更低的 k_{off} 速率常數，與一個，更佳的是兩個在結構上有關聯之抗原結合。或者或另外地，二元專一性抗體或其部份，可以 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 或更低的 IC_{50} ，較佳的是以 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 或更低的 IC_{50} ，更佳的是以 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 或更低的 IC_{50} ，再更佳的是以 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 或更低的 IC_{50} ，再更佳的是以 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 或更低的 IC_{50} ，或再更佳的是以 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 或更低的 IC_{50} ，抑制一個，更佳的是兩個在結構上有關聯之抗原的活性。最好是使用敏感的生物測定測量 IC_{50} ，其中 IC_{50} 值應該接近抗原在該測定中的 ED_{50} 值。

本發明亦提供包括本發明之二元專一性抗體或其抗原結合部份，以及在藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。本發明之醫藥組合物尚可包括至少一種額外的治療劑，例如一或多個用來治療其中使用該二元專一性抗體有益於改善該障礙之障礙的額外治療劑。例如，當二元專一性抗體專一地結合 $IL-1\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 時，該醫藥組合物尚可包括一或多個

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(43)

用來治療其中IL-1活性為有害之障礙的額外治療劑。

可將本發明之抗體或抗體-部份併入適合對個體投藥之醫藥組合物中。通常醫藥組合物包括本發明之抗體或抗體部份和在藥學上可接受的載劑。當在本文中使用"在藥學上可接受的載劑"時，包括任何和所有的溶劑、分散介質、塗料、抗細菌和抗真菌劑、等張和吸收延遲劑及其類似物，其在生理學上是可相容的。在藥學上可接受之載劑的實例包括一或多個水、生理鹽水、磷酸緩衝之生理鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物，以及其組合。在許多情況下，在該組合物中最好將包括等張劑，例如糖、多元醇，像是甘露糖醇、山梨糖醇或氯化鈉。在藥學上可接受的載劑尚可包括微量的輔助物質，像是濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝溶液，其促進抗體或抗體部份的儲存壽命或效力。

可將本發明之抗體或抗體-部份併入適合非經腸投藥的醫藥組合物中。較佳的是，將以含有0.1-250毫克/毫升抗體的可注射溶液之形式，製備抗體或抗體-部份。可注射溶液可由在堅硬或黃褐色小瓶、安瓿或預先-裝填之注射筒中的液態或冷凍乾燥之劑量形式所組成。緩衝溶液可以是L-組胺酸(1-50 mM)，最好是5-10 mM，在pH 5.0-7.0(最佳的是pH 6.0)。其他適合的緩衝溶液包括但不限於琥珀酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀。可使用氯化鈉修改濃度在0-300 mM之溶液的毒性(液態劑量形式最好是150 mM)。在冷凍乾燥的劑量形式中可包括低溫防護劑(Cryoprotectants)，原則是0-10%蔗糖(最佳的是0.5-1.0%)。其他適當的低溫防護

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (44)

劑包括海藻糖和乳糖。冷凍乾燥的劑量形式中可包括填充劑，原則是1-10%甘露糖醇(最佳的是2-4%)。在液態和冷凍乾燥的劑量形式兩者中，均可使用穩定劑，原則是1-50 mM L-甲硫胺酸(最佳的是5-10 mM)。其他適當的填充劑包括甘胺酸、精胺酸，可包括0-0.05%的多乙氧基醚-80(最佳的是0.005-0.01%)。額外的表面活性劑包括但不限於多乙氧基醚20和BRIJ表面活性劑。

本發明之組合物可以是各種形式的。這些包括，例如液體、半固體和固體的劑量形式，像是液態溶液(例如可注射和輸液的溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、藥丸、散劑、微脂粒和栓劑。較佳的形式依賴想要的投藥模式和治療應用。代表性的較佳組合物是可注射或可輸液溶液的形式，像是類似用來以其他抗原被動免疫人類的那些的組合物。較佳的投藥模式是非經腸的(例如靜脈內、皮下、腹腔內、肌肉內)。在較佳的具體實施例中，藉著靜脈內輸液或注射投與抗體。在另一個較佳的具體實施例中，藉著肌肉內或皮下注射投與抗體。

治療組合物通常在製造和儲存的條件下必須是無菌和穩定的。可以溶液、微滴乳狀液、分散液、微脂粒或其他適合高藥物濃度的定購結構來調配組合物。可藉著以所需之含量，將活性組合物(也就是抗體或抗體部份)併入適當的溶劑中，其按照需要帶有上文列舉的成份之一或其組合，接著進行滅菌過濾，來製備無菌的可注射溶液。一般而言，藉著將活性化合物併入無菌媒劑中，其含有基本的分散

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (45)

介質，以及上文列舉那些中的所需之其他成份，來製備分散液。在以滅菌的冷凍乾燥散劑來製備滅菌之可注射溶液的案例中，較佳的製備方法是真空乾燥和噴霧乾燥，從其先前滅菌-過濾的溶液中，產生活性成份加任何額外的想要成份的散劑。可維持溶液的適當流動性，例如藉著使用諸如卵磷脂之類的塗料，在分散液的案例中藉著維持需要的顆粒大小，並藉著表面活性劑的使用。可藉著在組合物中包含延遲吸收之製劑，例如單硬脂酸鹽類和明膠，導致可注射組合物的延長吸收。

可藉著此項技藝中已知的各種方法，投與本發明之抗體和抗體-部份，雖然對許多治療應用而言，較佳的投藥路徑/模式是皮下注射、靜脈內注射或輸液。熟諳此藝者應瞭解投藥的路徑及/或模式將依據想要的結果而改變。在某些具體實施例中，可製備帶有載劑的活性化合物，其將保護該化合物免於快速釋放，像是控制釋放的調配物，包括植入物、經皮貼片和微量包膠的遞送系統。可使用生物可降解、生物可相容的聚合物，像是乙烯乙酸乙酯、聚酞類、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。製備這類調配物的許多方法是取得專利的，或通常為熟諳此藝者已知的。參見，例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, 編輯, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

在某些具體實施例中，可口服投與本發明之抗體或抗體部份，例如，帶有惰性稀釋劑或可吸收之食用載劑。亦可

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (46)

將化合物(如果需要, 和其他的成份)封入硬或軟殼的明膠膠囊中, 壓成錠劑, 或直接併入個體的飲食中。爲了口服治療劑的投藥, 可將化合物與賦形劑合併, 並在可攝取的錠劑、口含片、糖錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑及其類似物的形式中使用。欲藉著非經腸投藥以外的方式投與本發明之化合物, 可能必須以保護其免於失活的物質塗覆化合物, 或與其共同-投藥。

亦可將補充的活性化合物併入該組合物中。在某些具體實施例中, 可將本發明之抗體或抗體部份與一或多種額外的治療劑共同調配並/或共同投藥, 其可用來治療其中IL-1活性是有害的障礙。例如, 可將本發明之抗-IL-1 α /IL-1 β 二元專一性抗體或抗體部份, 與一或多種與其他標靶結合的額外抗體(例如, 與其他細胞分裂素結合或與細胞表面分子結合的抗體)共同調配, 並/或共同投藥。此外, 本發明的一或多種抗體亦可與二或多種前述的治療劑併用。這類組合治療可有利地使用較低之劑量來投與治療劑, 因此避免了與各種單一治療有關的可能毒性或併發症。

IV. 二元專一性抗體的用途

假使本發明之二元專一性抗體或其部份具有與兩個不同但在結構上有關聯之抗原結合的能力, 便可用來檢測這些抗體中的任一個或兩者(例如在生物試樣中, 像是血清或血漿), 使用傳統的免疫測定, 像是酵素連結的免疫吸附測定(ELISA), 放射性免疫測定(RIA)或組織免疫組織化學法。

本發明提供在生物試樣中檢測抗原的方法, 包括使生物試

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (47)

樣與本發明之二元專一性抗體或抗體部份接觸，其專一地認出抗原，並檢測與該抗原結合之抗體(或抗體部份)或未結合的抗體(或抗體部份)，藉此檢測在該生物試樣中的抗原。以可檢測物質直接或間接標示抗體，有助於檢測已結合或未結合的抗體。適當的可檢測物質包括各種酵素、輔基、螢光物質、發光物質和放射性物質。適當酵素的實例包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適當之輔基複合物的實例包括鏈黴菌抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素；適當之螢光物質的實例包括繖形酮、螢光素、螢光素異硫代氰酸酯、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪胺(dichlorotriazinylamine)螢光素、丹磺醯氯或藻紅蛋白；發光物質之實例包括魯米諾；而適當之放射性物質的實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

標示抗體的另一種選擇，可藉著競爭放射性免疫測定，利用以可檢測物質標示的抗原標準物，和對該抗原(群)專一的未標示之二元專一性抗體，測定在生物流體中的抗原(群)。在該測定中，混合生物試樣、已標示之抗原標準物和二元專一性抗體，並判定與未標示之抗體結合的已標示抗原標準物之含量。在生物試樣中之抗原的含量與已與未標示之抗體結合的已標示之抗原標準物的含量成反比。

在較佳的具體實施例中，二元專一性抗體專一地認出IL-1 α 和IL-1 β ，並使用前述的檢測方法來檢測IL-1 α 及/或IL-1 β 。因此，本發明更提供在生物試樣或組織中檢測IL-1 α 或IL-1 β 的方法，包括使懷疑含有IL-1 α 或IL-1 β 的生物試樣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (48)

或組織，與本發明之二元專一性抗體或其抗原結合部份接觸，並檢測在該生物試樣或組織中的IL-1 α 或IL-1 β 。生物試樣可以是例如在活體外的組織，像是細胞、組織或體液(例如血液、血漿、尿、唾液等等)的試樣。此外，進行檢測的組織亦可以是在個體中在活體內的組織，例如可藉著在活體內的組織攝影而呈像的組織(例如，使用經標示之抗體)。

本發明之二元專一性抗體亦可用於診斷目的。在一個具體實施例中，在活體外的診斷測定中使用本發明之抗體，像是在實驗室測定中，檢測感興趣的抗原(群)，或是在照顧測試時，檢測感興趣的抗原(群)。使用抗體之已確立的，在活體外測定的實例，包括ELISAs、RIAs、西方墨點法及其類似物。在另一個具體實施例中，在活體內的診斷測定中，使用本發明之抗體，像是在活體內的攝影測試。例如，可利用能夠在活體內檢測到的可檢測物質來標示抗體，可將已標示之抗體投與個體，並可在活體內檢測已標示之抗體，藉此容許進行在活體內的攝影。

爲了診斷目的，可在診斷測定中，使用專一地認得IL-1 α 和IL-1 β 的本發明之二元專一性抗體，檢測IL-1 α 及/或IL-1 β ，例如在各種炎症疾病和障礙中，以及在胎兒的自發性吸收作用(spontaneous resorption)中。關於特定類型的疾病和障礙，爲了診斷之目的，可在任何本文中描述的疾病/障礙中，使用本發明之二元專一性抗-IL-1 α /IL-1 β 抗體，關於這類抗體的治療用途(參見下文)，像是其中IL-1活性是有害的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (49)

障礙，在下文中進一步討論。

本發明之二元專一性抗體或抗體部份，最好能夠中和，在活體外和在活體內，與其結合之抗原的活性。因此，可使用這類本發明之抗體和抗體部份，抑制抗原的活性，例如在含有該抗原的細胞培養中，或在具有與本發明之二元專一性抗體產生反應之抗原的人類個體或其他的哺乳動物個體中。在一個具體實施例中，本發明提供抑制抗原活性的方法，包括使該抗原與本發明之二元專一性抗體或抗體部份接觸，而得以抑制該抗原之活性。在較佳的具體實施例中，該二元專一性抗體與IL-1 α 和IL-1 β 結合，且該方法為藉著使IL-1 α 及/或IL-1 β 與該二元專一性抗體或其部份接觸，抑制IL-1 α 及/或IL-1 β 活性的方法。例如，可在活體外抑制IL-1 α 及/或IL-1 β 的活性。例如，在含有或懷疑含有IL-1 α 及/或IL-1 β 的細胞培養物中，可將本發明之抗體或抗體部份，加至培養基中，以便抑制在培養物中的IL-1 α 及/或IL-1 β 活性。或者，可在活體內在個體中抑制IL-1 α 及/或IL-1 β 的活性。

在另一個具體實施例中，本發明提供在個體中抑制抗原活性的方法，該個體罹患其中該抗原活性是有害的障礙。本發明提供在罹患這類障礙之個體中抑制抗原活性的方法，該方法包括對該個體投與本發明之二元專一性抗體或抗體部份，而得以在該個體中抑制抗原之活性。較佳的是，該抗原為人類抗原，且該個體是人類個體。可為了治療之目的，將本發明之抗體投與人類個體。此外，亦可為了獸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (50)

醫目的，或作為人類疾病之動物模式，將本發明之抗體投與表現與該抗體結合之抗原的非-人類哺乳動物。關於後者，可使用這類動物模式來評估本發明之抗體的治療效力(例如測試劑量和投藥的時間經過)。

較佳的是，二元專一性抗體與IL-1 α 和IL-1 β 結合，且在個體中抑制抗原活性的方法，是在個體中抑制IL-1活性的方法，例如罹患其中IL-1活性是有害之障礙的個體。當在本文中使用"其中IL-1活性是有害的障礙"一詞時，企圖包括其中已經顯示IL-1(其包括IL-1 α 和IL-1 β 兩者)出現在罹患該障礙之個體中，或懷疑IL-1已成為該障礙之病理生理學上的原因，或促成該障礙惡化之因素的疾病和其他障礙。因此，其中IL-1活性是有害的障礙，為其中預期IL-1活性(也就是IL-1 α 和IL-1 β 任一個或兩者)之抑制作用，可緩和該障礙之徵候及/或前進的障礙。例如，可藉著在罹患該障礙之個體的生物流體中，在IL-1濃度上的增加(例如，在個體的血清、血漿、滑膜液等等中，在IL-1濃度上的增加)，其可使用例如按照上述之抗-IL-1抗體來檢測，而證實這類障礙。

介白素1在與各種涉及免疫和炎症元件之疾病有關聯的病理學上，扮演重要的角色。這些疾病包括但不限於風濕性關節炎、骨關節炎、青少年慢性關節炎、萊姆病性關節炎、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑性狼瘡、克隆氏(Crohn's)症、潰瘍性結腸炎、炎症性腸病、胰島素依賴性糖尿病、甲狀腺炎、氣喘、過敏性

五、發明說明 (51)

疾病、牛皮癬、硬皮病性皮炎、移植物對宿主的疾病、器官移植的排斥、與器官移植有關的急性或慢性免疫疾病、類肉瘤病、關節硬化、散布性血管內凝血、川崎氏(Kawasaki's)症、格瑞福氏(Grave's)症、腎病徵候群、慢性疲勞徵候群、威格諾氏(Wegener's)肉芽腫病、漢馬克-薛尼萊(Henoch-Schoenlein)紫斑病、腎臟的顯微鏡下脈管炎、慢性主動性肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、中毒性休克徵候群、敗血病徵候群、惡病質、傳染病、寄生蟲病、後天免疫不全徵候群、急性橫貫性脊髓炎、亨丁頓氏舞蹈症、帕金森氏症、早老性癡呆徵候群、猝發、原發性膽汁性肝硬化、溶血性貧血、惡性、心衰竭、心肌梗塞、阿迪森氏(Addison's)症、偶發的多腺體缺陷第I型和多腺體缺陷第II型、薛密特氏(Schmidt's)徵候群、成人(急性)呼吸緊迫徵候群、禿髮、侷限性禿髮、血清反應陰性的關節病、關節病、雷特氏(Reiter's)症、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸性關節病、腸病性滑膜炎、與衣原體屬、耶爾森氏菌屬和沙門氏桿菌屬有關的關節病、脊椎關節病、動脈粥樣硬化性疾病/動脈粥樣硬化、特應性過敏反應、自體免疫性大疱性疾病、尋常性天疱瘡、落葉性天疱瘡、類天疱瘡、線性IgA病、自體免疫性溶血性貧血、考馬斯(Coombs)陽性溶血性貧血、後天惡性貧血、青少年惡性貧血、肌痛性腦炎/皇家自由(Royal Free)病、慢性黏膜皮膚念珠菌病、巨大細胞動脈炎、原發性硬化性肝炎、隱原性自體免疫性肝炎、後天免疫不全症徵候群、後天免疫不全相關疾病、C型肝炎、普

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (52)

通變異型免疫不全(普通變異型低 γ 球蛋白血症)、擴張型心肌病、女性不孕症、卵巢功能衰竭、卵巢功能早衰、纖維性肺病、隱原性纖維性肺泡炎、炎症後的間質性肺病、間質性肺炎、與間質性肺病有關的結締組織疾病、與肺病有關的混合型結締組織疾病、與間質性肺病有關的全身性硬化症、與間質性肺病有關的風濕性關節炎、與肺病有關的全身性紅斑性狼瘡、與肺病有關的皮膚炎/多肌炎、與肺病有關的許葛瑞氏(Sjögren's)症、與肺病有關的強直性脊椎炎、脈管炎的彌漫性肺病、與肺病有關的含鐵血黃素沉著症、藥物引起的間質性肺病、放射性纖維化、阻塞性細支氣管炎、慢性嗜曙紅細胞性肺炎、淋巴細胞浸潤肺病、感染後的間質性肺病、痛風性關節炎、自體免疫性肝炎、第1型自體免疫肝炎(典型的自體免疫性或狼瘡樣肝炎)、第2型自體免疫性肝炎(抗-LKM抗體肝炎)、自體免疫調節的低血糖、B型胰島素抵抗力帶有黑棘皮病、副甲狀腺功能不足、與器官移植有關的急性免疫疾病、與器官移植有關的慢性免疫疾病、骨關節炎、原發性硬化性膽管炎、牛皮癬第1型、牛皮癬第2型、特發性白血球減少症、自體免疫性嗜中性白血球減少症、未另列出的腎病、腎小球性腎炎、腎臟的顯微鏡下脈管炎、萊姆病、盤狀紅斑性狼瘡、男性不孕，特發性或未另列出的、精子的自體免疫性、多發性硬化症(所有的亞型)、交感性眼炎、繼發於結締組織疾病的肺高血壓、古德巴斯特氏(Goodpasture's)徵候群、結節性多動脈炎的肺臟顯露、急性風濕熱、風濕性脊椎炎、斯帝爾氏

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明 (53)

(Still's)症、全身性硬化症、許葛瑞氏(Sjörgren's)症、高安氏(Takayasu's)症/動脈炎、自體免疫性血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進、甲狀腺腫的自體免疫性甲狀腺功能不足(橋本氏(Hashimoto's)症)、萎縮性自體免疫性甲狀腺功能不足、原發性黏液水腫(myxoedema)、晶狀體性葡萄膜炎、原發性脈管炎、白癜風、中樞神經系統的疾病(例如抑鬱、精神分裂症、早老性癡呆徵候群、帕金森氏症等等)、急性和慢性疼痛和脂質不平衡。可使用本發明之人類抗體和抗體部份，來治療罹患自體免疫性疾病的人類，特別是與炎症，包括風濕性脊椎炎、過敏、自體免疫性糖尿病、自體免疫性葡萄膜炎有關的那些。

較佳的是可使用本發明之IL-1 α /IL-1 β 二元專一性抗體或其抗原結合部份，來治療風濕性關節炎、克隆氏症、多發性硬化症、胰島素依賴性糖尿病和牛皮癬。

本發明之IL-1 α /IL-1 β 二元專一性抗體或抗體部份，亦可與一或多種額外的治療劑一起投藥，用來治療自體免疫和炎症疾病。

可單獨使用或併用本發明之抗體，或其抗原結合部份，來治療這類疾病。請瞭解本發明之抗體或其抗原結合部份，可單獨使用或與附加之製劑，例如治療劑併用，由熟諳此藝者就其想要的目的來選擇該附加之製劑。例如，附加之製劑可以是由此項技藝承認可用來治療待藉著本發明之抗體治療之疾病或病況的治療劑。附加之製劑亦可以是給

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (54)

與治療性組合物有利性質之製劑，例如，影響組合物黏性的製劑。

更瞭解將包含在本發明內的組合，是可用於其想要目的的那些組合。下文陳述的製劑僅為了解釋之目的，並非企圖限制之。為本發明之一部份的組合，可以是本發明之抗體和至少一種選自下列一覽表的附加製劑。該組合亦可包括一種以上的附加製劑，例如二或三種附加製劑，以便使該組合得以形成可執行其想要功能的組合物。

較佳的組合是非-類固醇的消炎藥(群)，亦稱為NSAIDS，其包括像異丁苯丙酸(ibuprofen)和COX-2抑制劑之類的藥物。其他較佳的組合是皮質類固醇，包括脫氫皮質醇(prednisolone)；當與本發明之抗-IL-1抗體混合治療患者時，可藉著逐漸減少所需之類固醇的劑量，降低或甚至排除已熟知的使用類固醇之副作用。可與本發明之抗體或抗體部份混合，風濕性關節炎之治療劑的未加以限制之實例，包括下列：細胞分裂素抑制性消炎藥(群)(CSAIDs)；其他人類細胞分裂素或生長因子的抗體或拮抗劑，例如TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF和PDGF。本發明之抗體或其抗原結合部份，亦可與對抗細胞表面分子之抗體混合，該細胞表面分子像是CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80 (B7.1)、CD86 (B7.2)、CD90或其配體，包括CD154 (gp39或CD40L)。

較佳組合的治療劑可在不同地點干擾自體免疫和後續的

五、發明說明 (55)

炎症級聯，較佳的實例包括TNF拮抗劑，像是嵌合型、人類化或人類TNF抗體、D2E7、(PCT公告第WO 97/29131號)、CA2 (RemicadeTM)、CDP 571、CDP 870、唐松草胺(Thalidamide)和可溶性p55或p75 TNF受體、其衍生物p75 TNFR1gG (EnbrelTM)或p55TNFR1gG (Lenercept)，還有TNF α 轉變酵素(TACE)抑制劑；同樣地，基於相同的理由，IL-1抑制劑(介白素-1-轉變酵素抑制劑，IL-1RA等等)亦可能是有效的。其他較佳的組合包括介白素11。另外較佳的組合是自體免疫反應的其他關鍵性角色，其可能平行地，依據IL-1功能或與其一起作用；特佳的組合是IL-12及/或IL-18拮抗劑，包括IL-12及/或IL-18抗體，或可溶性IL-12及/或IL-18受體，或IL-12及/或IL-18結合蛋白質。已經顯示IL-12和IL-18具有部份重疊但不同的功能，而兩者之拮抗劑的組合可能是最有效的。另一種較佳的組合是未-枯竭之抗-CD4抑制劑。另一種較佳的組合包括共同-刺激路徑CD80 (B7.1)或CD86 (B7.2)的拮抗劑，包括抗體、可溶性受體或拮抗劑配體。

本發明之抗體或其抗原結合部份，亦可與諸如胺甲碟呤、6-MP、(硝基)咪唑硫嘌呤、硫酸鹽水楊嗟(sulphasalazine)、美沙拉嗟(mesalazine)、奧沙拉嗟(olsalazine)、氯嗟(chloroquinine)/羥氯嗟(hydroxychloroquine)、青黴胺(pencillamine)、金硫蘋果酸鹽(aurothiomalate)(肌肉內和口服)、(硝基)咪唑硫嘌呤、可曲辛(cochicine)、皮質類固醇(口服、吸入或局部注射)、 β -2腎上腺受體激動劑(舒喘寧

五、發明說明 (56)

(salbutamol)、特布他林(terbutaline)、沙美特羅(salmeteral))、黃嘌呤素(茶鹼、氨茶鹼(aminophylline))、色甘酸鹽(cromoglycate)、萘多羅米(nedocromil)、酮替芬(ketotifen)、異丙托銨(ipratropium)和氧托銨(oxitropium)、環孢靈、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil)、黎氟諾胺(leflunomide)、NSAIDs，例如異丁苯丙酸，皮質類固醇，像是脫氫皮質醇、磷酸二酯酶抑制劑、腺嘌呤核苷激動劑、抗凝血劑、補體抑制劑、腎上腺素能製劑，干擾由原發炎(proinflammatory)細胞分裂素發送信號之製劑，像是TNF α 或IL-1(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制劑)，IL-1 β 轉變酵素抑制劑、TNF α 轉變酵素(TACE)抑制劑、T-細胞發送信號抑制劑，像是激酶抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、硫酸鹽水楊素、(硝基)咪唑硫嘌呤、6-巰基嘌呤、血管收縮素轉變酵素抑制劑、可溶性細胞分裂素受體及其衍生物(例如可溶性p55或p75 TNF受體和衍生物p75 TNFR1gG (EnbrelTM和p55 TNFR1gG (Lenercept))，sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)，以及消炎的細胞分裂素(例如IL-4、IL-10、IL-11、IL-13和TGF β)之類的製劑混合。較佳的組合包括胺甲碟呤或黎氟諾胺，而在中等或嚴重的風濕性關節炎之案例中為環孢靈。

可與本發明之抗體或抗體部份混合的炎症性腸病治療劑之非限制實例包括下列：布德諾賽(budenoside)；表皮生長因子；皮質類固醇；環孢靈；硫酸鹽水楊素；胺基水楊酸酯；6-巰基嘌呤；(硝基)咪唑硫嘌呤；甲硝唑(metronidazole)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (57)

；脂肪氧合酶抑制劑；間-胺基水楊酸(mesalamine)；奧沙拉嗪；巴薩拉唑(balsalazide)；抗氧化劑；血栓烷(thromboxane)抑制劑；IL-1受體拮抗劑；抗-IL-1 β 單株抗體；抗-IL-6單株抗體；生長因子；彈性蛋白酶抑制劑；吡啶基-咪唑化合物；其他人類細胞分裂素或生長因子的抗體或拮抗劑，例如TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF和PDGF。本發明之抗體可與對抗細胞表面分子之抗體混合，像是CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配體。本發明之抗體或其抗原結合部份，亦可與諸如胺甲碟呤、環孢靈、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、黎氟諾胺、NSAIDs，例如異丁苯丙酸，皮質類固醇，像是脫氫皮質醇、磷酸二酯酶抑制劑、腺嘌呤核苷激動劑、抗凝血劑、補體抑制劑、腎上腺素能製劑，干擾由原發炎細胞分裂素發送信號之製劑，像是TNF α 或IL-1(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制劑)，IL-1 β 轉變酵素抑制劑、TNF α 轉變酵素抑制劑、T-細胞發送信號抑制劑，像是激酶抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、硫酸鹽水楊嗪、(硝基)咪唑硫嘌呤、6-巰基嘌呤、血管收縮素轉變酵素抑制劑、可溶性細胞分裂素受體及其衍生物(例如可溶性p55或p75 TNF受體，sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)，以及消炎的細胞分裂素(例如IL-4、IL-10、IL-11、IL-13和TGF β)之類的製劑混合。

可與抗體或抗原結合部份混合之克隆氏症治療劑的較佳

五、發明說明 (58)

實例包括下列：TNF拮抗劑，例如抗-TNF抗體、D2E7 (PCT公告第WO 97/29131號)、CA2 (RemicadeTM)、CDP 571、TNFR-Ig構築體 (p75TNFRIgG (EnbrelTM)和 p55TNFRIgG (Lenercept))抑制劑，以及PDE4抑制劑。本發明之抗體或其抗原結合部份，可與皮質類固醇混合，例如布德諾賽和地塞米松。本發明之抗體或其抗原結合部份，亦可與諸如硫酸鹽水楊嗪、5-胺基水楊酸和奧沙拉嗪之類的製劑，以及干擾原發炎細胞分裂素，像是IL-1之合成或作用的製劑混合，例如IL-1 β 轉變酵素抑制劑或IL-1ra。本發明之抗體或其抗原結合部份亦可與T細胞發送信號抑制劑併用，例如酪胺酸激酶抑制劑6-巰基嘌呤。本發明之抗體或其抗原結合部份亦可與IL-11混合。

可與本發明之抗體或抗體部份混合之多發性硬化症治療劑的非限制實例包括下列：皮質類固醇；脫氫皮質醇；甲基脫氫皮質醇；(硝基)咪唑硫嘌呤；環磷醯胺；環孢靈；胺甲碟呤；4-胺基吡啶；替托尼定(tizanidine)；干擾素- β 1a (Avonex; Biogen)；干擾素- β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex)；共聚物1 (Cop-1; 可帕松(Copaxone); Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)；比重高的氧；靜脈內的免疫球蛋白；克拉派拜(clabribine)；對其他人類細胞分裂素或生長因子的抗體或拮抗劑，例如TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF和PDGF。本發明之抗體或其抗原結合部份，可與對抗細胞表面分子之抗體混合，像是CD2、CD3、CD4、CD8、CD25

五、發明說明 (59)

、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90或其配體。本發明之抗體或其抗原結合部份，亦可與諸如胺甲碟呤、環孢靈、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、黎氟諾胺、NSAIDs，例如異丁苯丙酸、COX-2抑制劑、皮質類固醇，像是脫氫皮質醇、磷酸二酯酶抑制劑、腺嘌呤核苷激動劑、抗凝血劑、補體抑制劑、腎上腺素能製劑，干擾由原發炎細胞分裂素發送信號之製劑，像是TNF α 或IL-1(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制劑)，IL-1 β 轉變酵素抑制劑、TACE抑制劑、T-細胞發送信號抑制劑，像是激酶抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、硫酸鹽水楊嗪、(硝基)咪唑硫嘌呤、6-巰基嘌呤、血管收縮素轉變酵素抑制劑、可溶性細胞分裂素受體及其衍生物(例如可溶性p55或p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)，以及消炎的細胞分裂素(例如IL-4、IL-10、IL-13和TGF β)之類的製劑混合。

可與本發明之抗體或抗體部份混合之多發性硬化症治療劑的較佳實例包括干擾素- β ，例如IFN β 1a和IFN β 1b；可帕松、皮質類固醇、IL-1抑制劑、TNF抑制劑，以及對CD40配體和CD80的抗體。

本發明之醫藥組合物可包括"在治療上有效之含量"或"在預防上有效之含量"的本發明之抗體或抗體部份。"在治療上有效之含量"意指在劑量上和所需的期間內，有效達到想要之治療結果的含量。在治療上有效之含量的抗體或抗體部份，可根據諸如個體的疾病狀態、年齡、性別和體重

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (60)

之類的因素，以及抗體或抗體部份在個體中誘發想要之反應的能力而改變。在治療上有效之含量亦為其中該抗體或抗體部份的任何毒性或有害影響，重於在治療上有利影響的含量。"在預防上有效之含量"意指在劑量上和所需的期間內，有效達到想要之預防結果的含量。通常，因為在個體中使用預防性劑量，是在疾病之前或是在較早的階段，因此在預防上有效之含量將低於在治療上有效之含量。

可調整劑量攝生法，以提供最適切的想要反應(例如治療或預防的反應)。例如，可投與單一團塊，在一段時間內投與數個分開的劑量，或按照治療狀態的迫切指示，按比例降低或增加劑量。為了易於投藥和劑量的均一，以劑量單位形式調配非經腸組合物是特別有利的。當在本文中使用的劑量單位形式時，意指在物理上的個別單位，適合作為待治療之哺乳動物個體的單位劑量；每個單位含有與所需之藥學載劑結合的預定含量之活性化合物，經過計算其可產生想要的治療效果。藉著並直接依據(a)活性化合物之獨特特徵和欲獲得之特定治療或預防的效果，以及(b)在調配技藝中的先天限制，像是活性化合物在個體中的敏感性處理，來指定本發明之劑量單位形式的規格。

本發明之抗體或抗體部份的代表性而非限制之在治療上或在預防上有效之含量的範圍，是0.1-20毫克/公斤，更佳的是1-10毫克/公斤。注意到劑量值可隨著待緩和之病況的類型和嚴重性而改變。更瞭解對任何特定的個體而言，將在一段時間內根據個體的需要，以及投與該組合物或監督

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (61)

該組合物之投藥者的專業判斷，來調整特定的劑量攝生法，而在本文中陳述之劑量範圍僅是最具代表性的，並非企圖限制提出申請之組合物的範圍或實行。

將藉著下列的實例進一步解釋本發明，不應將其解釋為以任何方式來加以限制。將所有提及之參考文獻的內容，包括在本申請案之中提及的文獻參考、發行的專利和公開的專利申請案，明確地以引用的方式併入本文中。

實例 1： 以同一性之相鄰拓樸區域為基礎，設計二元專一性抗原

在本實例中，判定在兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質 IL-1 α 和 IL-1 β 之間同一性的最大相鄰拓樸區域，作為設計二元專一性抗原的基礎，其使二元專一性抗體對 IL-1 α 和 IL-1 β 升高。使用 BLAST 演算法比較這兩個蛋白質，並容許測量在類似的結構或功能區，以一個殘基置換另一個的傾向。該分析容許確認在 IL-1 α 和 IL-1 β 之間同一性的最大相鄰拓樸區域，並利用類似性之任何合理的伸張來延伸該區域，以便產生直線的肽，作為二元專一性抗原。最適合這些標準的肽具有如下的胺基酸序列：

NEAQNITDF (序列識別 1 號)

* * * * *

星號(*)代表根據 BLAST 演算法，在兩個蛋白質中相同的殘基，而其他的殘基則是極類似的。例如，在同種的蛋白質中，離胺酸通常將取代精胺酸，但不取代苯丙胺酸。序列

五、發明說明 (62)

識別1號的肽是雜化物，取自兩段不同的結構，其以相反的方向進行，所以該抗原決定位的其他合理的代表為：

dNdEdAdQNITDF

(其中"d"字首表示該胺基酸殘基為D胺基酸殘基)。藉著標準化學方法合成該肽的L胺基酸版本和部份以D胺基酸殘基取代的版本。然後使該肽與載體蛋白質(例如KLH或白蛋白)結合，並藉著在活體外或在活體內的方法，使用已結合的肽來選擇抗體。

實例2： 以模仿共同折疊之環的環狀肽為基礎，設計二元專一性抗原

在本實例中，為了用來作為二元專一性抗原，以便使二元專一性抗體對IL-1 α 和IL-1 β 升高，建構在結構上模仿在兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質，IL-1 α 和IL-1 β 之間之共同折疊之鑰匙環的環狀肽。封閉的環代表IL-1 α 的殘基168-184和IL-1 β 的殘基160-176。一致序列為：

環-MAFLRANQNNGKISVAL (PG) (序列識別2號)

* c b c c c c c c c c * * c * b *

星號(*)代表在IL-1 α 和IL-1 β 之間相同的殘基，c代表一致殘基，也就是類似IL-1 α 和IL-1 β 的殘基，但在任一個蛋白質中並非實際上出現在該位置處，而b表示沒有明確一致的殘基，以便保留IL-1 β 序列的同一性。藉著標準化學合成法合成直線的肽。欲將該肽環化，加入脯胺酸和甘胺酸殘基。

五、發明說明 (63)

可使用標準偶聯條件，以在N,N-二甲基甲醯胺(1毫克/毫升)中的高度稀釋，合成環狀的肽。在室溫下使用過量的偶聯劑，像是苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯啶-鎘六氟磷酸酯(PyBOP；2當量)和碳酸氫鈉(10當量)，進行原型的反應。然後使該肽與載劑蛋白質(例如KLH或白蛋白)結合，並藉著在活體外或在活體內的方法，使用已結合的肽來選擇抗體。

實例3： 以雜種肽為基礎，設計二元專一性抗原

在本實例中，為了用來作為二元專一性抗原，以便使二元專一性抗體對IL-1 α 和IL-1 β 升高，建構包括兩個不同但在結構上有關聯之蛋白質，IL-1 α 和IL-1 β 之交替或部份重疊序列的雜種肽。欲產生雜種肽，確認IL-1 α 和IL-1 β 之交替或部份重疊之胺基酸序列，並接合在一起，產生下列的肽：

TKGGQDITDFQILENQ (序列識別3號)

b b b b b b b b b b

a a a a a a a a a a

a和b代表那一個蛋白質為殘基的來源(a=IL-1 α ；b=IL-1 β)。在雜種肽中包括兩個蛋白質共同的ITDF(序列識別4號)主題。此外，該雜種肽集中在得自兩個蛋白質之羧基終端的序列，已知在兩個蛋白質中，其對中和抗體而言是抗原性的。藉著標準化學合成法合成雜種肽。然後使該肽與載劑蛋白質(例如KLH或白蛋白)結合，並藉著在活體外或在

五、發明說明 (64)

活體內的方法，使用已結合的肽來選擇抗體。

實例 4： 產製對抗 IL-1 α 和 IL-1 β 的二元專一性抗體

NEAQNITDF (序列識別 1 號)

環-MAFLRANQNNGKISVAL(PG) (序列識別 2 號)

TKGGQDITDFQILENQ (序列識別 3 號)

使序列識別 1、2 和 3 號的肽與 KLH 結合，並免疫接種個別的兔子。得自以三個肽分別免疫接種之兔子的抗血清，顯示對用來作為抗原之肽，有良好的抗體反應。然而，僅有得自以序列識別 3 號之肽免疫接種之兔子的抗血清，能夠與 IL-1 α 蛋白質和 IL-1 β 蛋白質兩者結合。

每三週一次，以與 KLH 結合之序列識別 3 號的肽加上福瑞德不完全佐劑(FIA)皮下接種五隻老鼠(BA119-BA123)，總共三次，接著以與 KLH 結合之序列識別 3 號的肽靜脈內補強兩次。在每次免疫接種之後十天，對每隻老鼠採血，並藉著 ELISA 判定抗體力價。按照在第 IIA 章中的描述，將得自老鼠 BA119 和 BA123 之脾臟細胞，分別與骨髓瘤細胞株 P3X36Ag8.653 融合，並使用限制稀釋，以每孔 1 個細胞將所得的融合細胞播種在數個 96-孔培養盤上。首先藉著標準 ELISA，就 IgG 和 IgM 的產製，測定融合瘤純種系的生長，確認產生抗體的純種系。從老鼠 #BA123 的融合中，分離出總共 945 個純種系。在 ELISA 中測試得自 355 個純種系的上清液，顯示對 IL-1 α 、IL-1 β 或 IL-1 α 和 IL-1 β 兩者的抗原結合活性。

五、發明說明 (65)

#純種系編號	抗原專一性(對全長的IL-1 α 及/或IL-1 β)	同型物
249	僅有IL-1 α	IgG
19	僅有IL-1 α	IgM
15	僅有IL-1 β	IgG
2	僅有IL-1 β	IgM
57	IL-1 α 和 β	IgG
13	IL-1 α 和 β	IgM

同等物

熟諳此藝者將承認或能夠確定僅使用例行的實驗，在本文中描述本發明之特定具體實施例的許多同等物。企圖將這類同等物包含在下列的申請專利範圍中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (66)

序列表

<110> 美商亞培公司

<120> 二元專一性之抗體及其製法及用途

<140> TW 090115948

<141> 2001-06-29

<150> US 60/215,379

<151> 2000-06-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 二元專一性抗體

<400> 1

Asn Glu Ala Gln Asn Ile Thr Asp Phe

1

5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一元序列

五、發明說明 (67)

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Pro or Gly

<400> 2

Met Ala Phe Leu Arg Ala Asn Gln Asn Asn Gly Lys Ile Ser Val Ala
1 5 10 15

Leu Xaa

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雜種肽

<400> 3

Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln
1 5 10 15

<210> 4

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雜種肽

<400> 4

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
1 5 10 15

五、發明說明 (68)

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
20 25 30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Gly Ala Tyr Lys
35 40 45

Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Gly Leu Lys Glu
50 55 60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
85 90 95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
100 105 110

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
115 120 125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
130 135 140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
145 150

六、申請專利範圍

公告本

1. 一種獲得專一地結合介白素-1 α 和介白素-1 β 之二元專一性抗體的方法，該方法包括：
提供抗原，其中該抗原包含胺基酸序列TKGGQDITDFQILENQ(SEQ ID NO:3)；
使抗體譜(antibody repertoire)暴露在該抗原之下；並
從該抗體譜中選擇專一地結合IL-1 α 和IL-1 β 的抗體，
藉此獲得二元專一性抗體，其中該二元專一性抗體不為完整之老鼠抗體。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中藉著以該抗原免疫接種動物，在活體內使該抗體譜暴露在該抗原之下。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其進一步包含由動物淋巴細胞製備一群融合瘤，及選擇可分泌會與IL-1 α 和IL-1 β 專一地結合的抗體之融合瘤。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該動物係選自老鼠、大鼠、兔子和山羊所組成之群。
5. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中該動物係IL-1 α 、IL-1 β 或IL-1 α 與IL-1 β 兩者缺乏之擊倒(knockout)老鼠。
6. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中該動物係經人類免疫球蛋白基因轉殖的老鼠，因此該老鼠經抗原刺激會製造人類抗體。
7. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中該動物係帶有重症性聯合免疫缺陷病(SCID)的老鼠，其已經利用人類的周圍血液單核細胞或淋巴細胞或其前驅細胞重建。
8. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中該動物係且經利用

六、申請專利範圍

- 致命的整體照射處理，接著利用重症性聯合免疫缺陷病(SCID)老鼠之骨髓細胞放射性保護(radioprotection)，接著移植具有功能的人類淋巴細胞或其前驅細胞的老鼠。
9. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中藉著以該抗原篩選重組抗體庫，在活體外使抗體譜暴露在該抗原之下。
10. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該重組抗體庫係表現於噬菌體表面上。
11. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該重組抗體庫係表現於酵母菌細胞表面上。
12. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該重組抗體庫係表現於細菌細胞表面上。
13. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該重組抗體庫係以RNA-蛋白質融合物表現。
14. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該重組抗體庫係為scFv庫或Fab庫。
15. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中藉著在活體內以抗原免疫接種動物，使抗體譜暴露在該抗原之下，接著在活體外以該抗原篩選從該動物之淋巴細胞製備的重組抗體庫。
16. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中藉著在活體內以抗原免疫接種動物，使抗體譜暴露在該抗原之下，接著在活體外將從該動物之淋巴細胞製備之重組抗體庫進行親和力成熟作用。
17. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中藉著在活體內以抗

六、申請專利範圍

原免疫接種動物，使抗體譜暴露在該抗原之下，接著選出分泌可與該抗原結合抗體的單一細胞，從該單一細胞中回收重-和輕鏈可變區 cDNAs。

18. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該二元專一性抗體係為完全人類抗體。
19. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該二元專一性抗體係為嵌合抗體。
20. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該二元專一性抗體係為 CDR-移植抗體。
21. 一種單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體或其抗原結合部分可與胺基酸序列 TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO:3) 結合。
22. 根據申請專利範圍第21項之單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體或其抗原結合部分係完全人類型。
23. 根據申請專利範圍第21項之單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體或其抗原結合部分係嵌合型。
24. 根據申請專利範圍第23項之單株抗體或其抗原結合部分，其包含老鼠可變區胺基酸序列及人類恆定區胺基酸序列。
25. 根據申請專利範圍第21項之單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體或其抗原結合部分係 CDR-移植型。
26. 根據申請專利範圍第25項之單株抗體或其抗原結合部分，其包含含有一或多個老鼠 CDR 之人類重及輕鏈可變序列。

六、申請專利範圍

27. 根據申請專利範圍第25項之單株抗體或其抗原結合部分，其包含含有一或多個人類CDR之老鼠重及輕鏈可變序列。
28. 根據申請專利範圍第21項之單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體或其抗原結合部分係人類化型。

裝

訂