

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

穩定且可溶的抗體/STABLE AND SOLUBLE ANTIBODIES

【技術領域】

相關申請案

[0001]此申請案基於35 U.S.C. §119、主張2010年10月22日提申之US臨時申請案第61/405,798號，以及2011年5月11日提申之US臨時申請案第61/484,749號之優先權，其等之整體內容係併入至本文中以作為參考資料。

發明領域

[0002]本發明係有關於減少抗體的聚集傾向的方法，以及經修飾來減少聚集傾向之抗體。本發明亦有關於結合腫瘤壞死因子 α (TNF α)之抗體。特別地，本發明係有關於包含有一種減少聚集之修飾之穩定且可溶的抗體，包括scFv抗體和Fab片段，其包含有在穩定性、溶解度，和低的免疫原性方面予以最佳化之專一性輕鏈與重鏈序列。此外，本發明係有關於用於診斷及/或治療TNF媒介的障礙之方法。

【先前技術】

發明背景

[0003]腫瘤壞死因子 α (TNF α ，亦也知道為惡液質素(cachectin))，為由許多的細胞類型，包括單核細胞和巨噬細胞，對內毒素或其他的刺激反應而產生的一種天然存在的哺乳動物細胞介素。TNF α 為發炎性、免疫學，以及病

理生理學的反應之一種主要的媒介(Grell, M., 等人(1995) Cell, 83: 793-802)。

[0004]可溶的TNF α 係由一種前驅物透膜的蛋白之切割所形成的(Kriegler, 等人(1988) Cell 53: 45-53), 以及分泌的 17 kDa之多肽的組合成可溶的同源三聚體複合物(Smith, 等人(1987), J. Biol. Chem. 262: 6951-6954; 關於TNF α 之評論, 見Butler, 等人(1986), Nature 320:584; Old (1986), Science 230: 630)。此等複合物接而結合至發現於各種各樣的細胞上之受體。結合產生了一系列的促發炎性(pro-inflammatory) 效應, 包括(i)其他的促發炎性細胞介素, 譬如介白素(IL)-6、IL-8, 和IL-1的釋放, (ii)基質金屬蛋白酵素的釋放以及(iii)向上調節內皮黏著分子的表現, 進一步藉由吸引白血球至血管外組織之內而擴大發炎性和免疫的串級。

[0005]大量的障礙係與提高位準的TNF α 有關連的, 其等之許多者有顯著的醫療重要性。TNF α 於一些人類疾病已經顯示出為向上調節的, 包括慢性的疾病, 譬如類風濕性關節炎(RA)、發炎性腸障礙(包括克隆氏症與潰瘍性大腸炎)、敗血症、鬱血性心臟衰竭、細支氣管氣喘(asthma bronchiale)以及多發性硬化症。在人類TNF α 方面基因轉殖的小鼠組成性地產生高位準的TNF α 以及發展出類似RA之自發性、破壞性多發性關節炎(Keffer等人1991, EMBO J., 10,4025-4031)。TNF α 因而稱為一種促發炎性細胞介素。

[0006]TNF α 現在已確立為RA的發病機制的關鍵, RA

為慢性的、進行性的以及虛弱性的疾病，特徵在於多關節 (polyarticular joint) 的發炎和破壞，伴隨發燒和不適以及疲勞之系統性的徵狀。RA 亦導致慢性的滑膜發炎，伴隨關節軟骨和骨頭破壞之頻繁的進展。於罹患 RA 的病人之滑液和周邊血液二者內發現到增高位準的 $\text{TNF } \alpha$ 。當投藥 $\text{TNF } \alpha$ 阻斷劑至罹患 RA 的病人時，其等減少發炎、改善徵狀以及延遲關節損傷 (McKown 等人 (1999), *Arthritis Rheum.* 42:1204-1208)。

[0007] 生理上， $\text{TNF } \alpha$ 亦與保護免受特定感染有關連 (Cerami. 等人 (1988), *Immunol. Today* 9:28)。 $\text{TNF } \alpha$ 係由已經由革蘭氏陰性的細菌之脂多醣所活化的巨噬細胞釋放。確切而言， $\text{TNF } \alpha$ 似乎為涉及到與細菌性敗血症有關連的內毒素休克之發展和發病機制之主要的重要性內源性媒介 (Michie, 等人 (1989), *Br. J. Surg.* 76:670-671.; Debets. 等人 (1989), *Second Vienna Shock Forum*, p. 463-466; Simpson, 等人 (1989) *Crit. Care Clin.* 5: 27-47; Waage 等人 (1987). *Lancet* 1: 355-357; Hammerle. 等人 (1989) *Second Vienna Shock Forum* p. 715-718; Debets. 等人 (1989), *Crit. Care Med.* 17:489-497; Calandra. 等人 (1990), *J. Infect. Dis.* 161:982-987; Revhaug 等人 (1988), *Arch. Surg.* 123:162-170)。

[0008] 至於其他的器官系統， $\text{TNF } \alpha$ 也已經顯示出於中樞神經系統中扮演關鍵的角色，特別地神經系統的發炎性與自體免疫障礙，包括多發性硬化症、格巴二氏症候群 (Guillain-Barre syndrome) 及重症肌無力症，以及神經系統

的變性性障礙，包括阿茲海默症、帕金森氏病症及杭丁頓氏症。TNF α 亦涉及到視網膜和肌肉相關系統的障礙，包括視神經炎、黃斑變性、糖尿病視網膜病變、皮肌炎、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症，和肌肉萎縮症，以及神經系統的損傷，包括創傷性的腦損傷、急性脊髓的損傷，和中風。

[0009] 肝炎為另一種TNF α -相關的發炎性障礙，其在此其他觸發物之中可以是由病毒的感染所造成，包括Epstein-Barr、細胞巨大病毒，以及A-E病毒。肝炎造成肝門的和肝小葉的區域之急性的肝發炎，接著纖維化以及腫瘤進展。TNF α 也能媒介惡病質於癌症，其造成多數癌症的發病率和死亡率(Tisdale M.J. (2004), *Langenbecks Arch Surg.* 389:299-305)。

[0010] TNF α 於發炎、細胞的免疫反應以及許多疾病的病理學中所扮演的關鍵角色已導致搜尋TNF α 的拮抗劑。一類經設計用於TNF α -媒介的疾病治療之TNF α 拮抗劑為抗體或抗體片段，其等專一性地結合TNF α 以及藉此阻斷其之功能。抗-TNF α 抗體的使用已經顯示出TNF α 的阻斷可以逆轉歸因於TNF α 之效應，包括IL-1、GM-CSF、IL-6、IL-8、黏著分子以及組織破壞(Feldmann等人(1997), *Adv. Immunol.* 1997:283-350)之減少。在近來已經變為商業上可得的TNF α 的專一性抑制劑之中包括一種單株的、嵌合小鼠 - 人類抗體針對TNF α (infliximab, Remicade™; Centocor Corporation/Johnson & Johnson)已經展現出於RA和克隆氏症(Crohn's disease)之治療的臨床效能。儘管此

等進展，對於抗體之新且有效的形式或是供用於TNF α -有關的障礙，譬如RA，之治療之其他的抗體仍然有一需求。特別地，對於在關節炎和其他的TNF α -媒介的障礙之有效的且連續性的治療方面有最佳的功能性質之抗體有急迫的需要。

【發明內容】

發明概要

[0011]本發明提供了抗體，其等包含至少一個減少聚集作用之突變以及生產此等抗體的方法。

[0012]於一個態樣中，本發明提供了一種減少一抗體之聚集傾向的方法，該方法包含導入一個或更多個減少聚集之修飾於參與一抗體之可變異輕鏈與可變異重鏈之間的介面之一個殘基位置處，其中該取代減少了於該可變異輕鏈與可變異重鏈之間自由能達至少0.5 kcal/mol，藉此減少該經修飾的抗體之聚集傾向，與一缺少減少的聚集修飾之親代抗體的聚集傾向相比。

[0013]於一個態樣中，本發明的一種方法包含導入一或更多個胺基酸取代於該抗體之可變異輕鏈(VL)與可變異重鏈(VH)的介面內，其中該一或更多個取代係於經選擇來減少該VL與VH之間自由能達至少10%的殘基位置處，藉此減少該抗體與一親代抗體相比之聚集傾向。於一特定的態樣中，該抗體之可變異輕鏈的序列與序列辨識編號：1的序列有至少65%的同一性。於其他的態樣中，該抗體之可變異重鏈的序列與序列辨識編號：3的序列或序列辨識編號：

4的序列有至少85%的同一性。

[0014]於某些態樣中，本發明的一種方法包含修飾於一抗體之可變異輕鏈之A_Ho位置50處的殘基及/或A_Ho位置47處的殘基，藉此減少該抗體與一親代抗體相比之聚集傾向。於其他的態樣中，本發明的方法進一步包含修飾於可變異重鏈之A_Ho位置12、103，及144處的殘基。

[0015]本發明亦提供了具有減少的聚集傾向之抗體，其等包含一個或更多個減少聚集之修飾。於某些態樣中，本發明的一抗體為一個Fab、Fab'、一F(ab)'₂、單鏈Fv(scFv)、一Fv片段，或一線狀的抗體。於其他的態樣中，本發明提供了一種二價或雙專一性分子，其包含本發明的一抗體。

[0016]於其他的態樣中，該減少聚集之修飾係於可變異輕鏈之A_Ho位置50處。於一特定的態樣中，該減少聚集之修飾包含於可變異輕鏈之A_Ho位置50處之精胺酸(R)。於再另一個態樣中，該減少聚集之修飾包含用精胺酸(R)取代離胺酸(K)於可變異輕鏈之A_Ho位置50處。

[0017]於還有其他的態樣中，該減少聚集之修飾係於可變異輕鏈之A_Ho位置47處。於一特定的態樣中，該減少聚集之修飾包含於可變異輕鏈之A_Ho位置47處之精胺酸(R)。於再另一個態樣中，該減少聚集之修飾包含用精胺酸(R)取代離胺酸(K)於可變異輕鏈之A_Ho位置47處。

[0018]本發明亦提供了對於TNF α 專一之穩定且可溶的抗體，其包含專一性輕鏈與重鏈序列，其等係在穩定性、

溶解度、TNF α 之活體外和活體內結合，以及低的免疫原性方面予以最佳化的。該等抗體係設計用於TNF α 媒介的障礙之診斷及/或治療。也揭示了本發明的核酸、用於重組型抗體之表現的載體和宿主細胞、可變異輕鏈，及可變異重鏈，用於單離其等之方法以及該等抗體於醫學之用途。

[0019]本發明亦提供了治療一種TNF α 媒介的障礙之方法，其包含投藥該藥學組成物至需要其之個體，該藥學組成物包含有本發明的一抗TNF α 抗體。於某些態樣中，該TNF α 媒介的障礙為一種由以下組成的群組所選擇的眼睛障礙：眼色素層炎(uveitis)、貝西氏病(Bechet's Disease)、視網膜炎、乾眼症、青光眼、修格連氏症候群(Sjörge syndrome)、糖尿病神經病變、鞏膜炎、老年性黃斑變性以及角膜炎。

[0020]本發明之特定的較佳具體例從下列某些較佳具體例以及申請專利範圍之更詳細的說明會變得明顯。

【圖式簡單說明】

[0021]第1圖顯示出2種不同的scFv分子，34rFW1.4(黑色)和578rFW1.4(灰色)，中之殘基位置VL47(實線)和VL50(虛線)之滴定曲線；

[0022]第2A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用60mg/ml的濃度；

[0023]第2B圖顯示出34rFW1.4_VLK50R_DHP之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC

分析予以決定以及使用60mg/ml的濃度；

[0024]第3A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用40mg/ml的濃度；

[0025]第3B圖顯示出34rFW1.4_VLK50R_DHP 之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用40mg/ml的濃度；

[0026]第4A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用20mg/ml的濃度；

[0027]第4B圖顯示出34rFW1.4_VLK50R_DHP 之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用20mg/ml的濃度；

[0028]第5A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後在2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用60mg/ml的濃度；

[0029]第5B圖顯示出34rFW1.4_VL_K50R之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用60mg/ml的濃度；

[0030]第6A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用40mg/ml的濃度；

[0031]第6B圖顯示出34rFW1.4_VLK50R之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析

予以決定以及使用40mg/ml的濃度；

[0032]第7A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用20mg/ml的濃度；

[0033]第7B圖顯示出34rFW1.4_VLK50R之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用20mg/ml的濃度；

[0034]第8A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用60mg/ml的濃度；

[0035]第8B圖顯示出34rFW1.4_K47R之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用60mg/ml的濃度；

[0036]第9A圖顯示出34rFW1.4之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用20mg/ml的濃度；

[0037]第9B圖顯示出34rFW1.4_K47R之穩定性，其係於40℃下2週孵育後於加速的條件下藉由SE-HPLC分析予以決定以及使用20mg/ml的濃度。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

[0038]本發明之大體的目的是要提供穩定且可溶的抗體，其等具有減少的聚集傾向於溶液內。於一較佳具體例中，該抗體為一種scFv抗體或Fab片段。本發明的抗體較佳

地包含有如本文中所揭示之一輕鏈與重鏈。

[0039]本文中所顯示的詳細情況係作為實例且僅僅為了本發明的較佳具體例之作例證的討論之目的以及係為了提供據信何者為最有用的且本發明之各種各樣的具體例之原理和概念上的態樣之容易了解的說明的原因而提出。在此方面，並不試圖顯示出比本發明之基本了解所必需的更詳細之本發明之結構上的細節，說明以及圖示及/或實施例使得本技藝中具有技術者對於可以如何實際地實施本發明之數個形式變得明顯。

[0040]為了更容易了解本發明，某些術語將定義如下。額外的定義係於詳細說明中各處提出。下列定義和解釋係意指且打算控制任何未來的解釋，除非於下列之實施例中明確且清楚地修飾或是在該意義之應用會使任何的解釋成為無意義的或實質無意義之時。在術語之解釋會使其成為無意義的或實質無意義的事例中，應該由 Webster's Dictionary，第3版或是熟悉此藝者所知道的字典，譬如the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004) 取得定義。

[0041]術語“抗體”當使用於本文中包括整個的抗體以及其等之任何抗原結合片段(亦即，“抗原結合部分”、“抗原結合多肽”，或“免疫黏合劑”)或單鏈。一“抗體”包括一醣蛋白，其包含藉由雙硫鍵予以互相連接之至少2個重(H)鏈與2個輕(L)鏈，或其之抗原結合部分。各重鏈

含有一重鏈可變異區域(本文中縮寫為VH)與一重鏈守恆區域。重鏈守恆區域包含三個領域，CH1、CH2與CH3。各輕鏈含有一輕鏈可變異區域(本文中縮寫為VL)與一輕鏈守恆區域。輕鏈守恆區域包含一個領域，CL。VH和VL區域可進一步區分為高度變異區域，稱之為互補性決定區域(CDR)，散佈有較守恆的區域，稱之為框架區域(FR)。各VH和VL係由三個CDR與四個FR組成，由胺基端至羧基端之順序安排為：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈與輕鏈之可變異區域含有可與一抗原相互作用之一結合領域。該等抗體之守恆區域可以媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括免疫系統之各種細胞(如效應細胞)與典型補體系統之第一補體(C1q)。

[0042]術語一抗體之“抗原結合部分”(或僅為“抗體部分”)，係提及一抗體之一或更多個抗體片段，其保持專一性結合至一抗原(如TNF)之能力。已經顯示出一抗體之抗原結合功能可以藉由全長抗體片段予以執行。包含於此術語一抗體之“抗原結合部分”之結合片段的範例包括：(i)一個Fab片段，一個由VL、VH、CL和CH1領域構成的單價片段；(ii)一個F(ab')₂片段，一個包含於樞紐區(hinge region)藉由一個雙硫橋予以連接的2個Fab片段之二價的片段；(iii)一個由VH和CH1領域構成的Fd片段；(iv)一個由一抗體的一個單一臂之VL和VH領域構成的Fv片段；(v)一個單一領域或dAb片段(Ward等人，(1989) Nature 341:544-546)，其係由VH領域組成；以及(vi)一個經單離的互補性決定區域

(CDR)或是(vii)二個或更多個經單離的CDRs之組合，其等可藉由一個合成的連接子予以選擇性地連結在一起。而且，儘管Fv片段的2個領域，VL和VH，係藉由各別的基因予以編碼，但其等能利用重組方法，藉由一種合成的連接子予以連結而使得其等成爲一個單一蛋白鏈，其中VL和VH區配對以形成單價的分子(知道爲單鏈Fv (scFv))；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)。此等單鏈抗體也打算被包含於術語一抗體的“抗原結合片段”之內。此等抗體片段係利用本技藝中具有技藝者的那些人所知道的慣用技術而獲得，以及該等片段係以如同完整無缺的抗體被篩選之相同的方式予以篩選用途方面。抗原結合部分可以藉由重組DNA技術來產生，或是藉由完整的免疫球蛋白之酵素或化學切割來產生。抗體可以爲不同的同型物，舉例而言，IgG (例如，IgG1、IgG2、IgG3，或IgG4亞型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE，或是IgM抗體。

[0043]術語“框架”係提及本技藝所認可的一種抗體可變異區域之部分，其等存在於更分歧的CDR區域之間。此等框架區域典型地稱爲框架1至4 (FR1、FR2、FR3，和FR4)以及提供用於以三維空間方式支持重鏈或輕鏈抗體可變異區域中發現的3個CDRs之支架，以致於CDRs可形成一抗原結合表面。此等框架亦可以稱爲支架，因其等提供了更分歧的CDRs的呈現之支撐。免疫球蛋白超科之其他的CDRs和框架，譬如錨蛋白重複(ankyrin repeats)與纖維網蛋

白，可以使用作為抗原結合分子(亦見，舉例而言，U.S.專利號碼6,300,064、6,815,540與U.S.公開號20040132028)。

[0044]術語“抗原決定區”或“抗原決定位”係提及一抗原上的一位置，免疫球蛋白或抗體專一性地結合至該處(例如，TNF)。一抗原決定區典型地包括以獨特的空間構形之至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個胺基酸。見，例如，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)。

[0045]術語“專一性結合”、“選擇性結合”、“選擇性地結合”以及“專一性地結合”係提及抗體結合至一預定的抗原上之抗原決定區。典型地，抗體係用大概低於 10^{-7} M之親和性(KD)，譬如大概低於 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的親和性，如同使用表面電漿子共振(SPR)技術於一BIAcore儀器上所決定的，來結合。

[0046]術語“KD”，係提及一特定的抗體抗原相互作用之解離平衡常數。於某些具體例中，本發明的一些抗體係以低於大概 10^{-7} M的解離平衡常數(KD)，譬如低於大概 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的解離平衡常數，舉例而言，如同使用表面電漿子共振(SPR)技術於一BIAcore儀器上所決定的，來結合至TNF。

[0047]當使用於本文中，“同一性”係提及介於2個多肽、分子之間或介於2種核酸之間的序列配對。當2個比較的序列的二者內之一位置係被相同的鹼基或胺基酸單體次單元佔據(舉例而言，設若2個DNA分子的各者內之一位置

係被腺嘌呤佔據，或是2個多肽的各者內之一位置係被離胺酸佔據)時，那麼在該位置之各自的分子為完全相同的。二序列之間的“百分比同一性”為2個序列所共有的配對位置之數目除以比較的位置之數目 $\times 100$ 之函數。舉例而言，設若2個序列內的位置之10個中的6個係配對的，那麼2個序列具有60%的同一性。作為實例，DNA序列的CTGACT與CAGGTT共有50%的同一性(6個總位置的3個係配對的)。一般而言，比較係在將2個序列排列以提供最大的同一性時進行。此排列可以使用，舉例而言，Needleman等人(1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453，便利地藉由電腦程式，譬如Align程式(DNAstar, Inc.)來實施，的方法來提供。介於2個胺基酸序列之間的百分比同一性也能利用E. Meyers和W. Miller演算法(*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))予以決定，其已經併入ALIGN 程式(版本2.0)，使用PAM120權重殘基表，12的間隔長度處罰以及4的間隔處罰。此外，介於2個胺基酸序列之間的百分比同一性可以利用Needleman與Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970))演算法予以決定，其已經併入GCG軟體包中之GAP程式(於www.gcg.com可取得)，使用一種Blossum 62矩陣或一種PAM250矩陣，以及16、14、12、10、8、6，或4的間隔權重(gap weight)和1、2、3、4、5，或6的長度權重(length weight)。

[0048] “相似的”序列為當排列時，共有完全相同的以及相似的胺基酸殘基之該等，相似的殘基關於一排列的參考序列內之對應的胺基酸殘基為守恆性取代。在此方面，

一參考序列內之殘基的“守恆性取代”為由實體或功能上相似於對應的參考殘基之一殘基的一取代，例如，具有相似的尺寸、形狀、電荷、化學性質，包括形成共價或氫鍵的能力，或是類似物。因而，一種“守恆性取代經修飾的”序列為一者，其與一參考序列或一野生型序列不同在於存在一或更多個守恆性取代。兩序列間之“百分比相似性”為含有2個序列所共有之配對殘基或守恆性取代的位置數目除以比較的位置數目之 $\times 100$ 之函數。舉例而言，設若2個序列內的位置之10個中的6個係配對的以及10個位置的2個含有守恆性取代，那麼2個序列具有80%的正相似性。

[0049]當使用於本文中，術語“守恆性序列修飾”打算提及不會負面地影響或改變含有該胺基酸序列之抗體的結合特性之胺基酸修飾。此等守恆性序列修飾包括核苷酸以及胺基酸取代、加入或是刪失。舉例而言，修飾可以藉由本技藝已知的標準技術來導入，譬如定點突變作用(site-directed mutagenesis)與PCR媒介的突變作用。守恆性胺基酸取代包括胺基酸殘基係用具有相似側鏈之胺基酸殘基置換之該等。具有相似側鏈之胺基酸殘基家族係如本技術領域所定義。這些家族包含具鹼性側鏈之胺基酸(例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具酸性側鏈之胺基酸(例如，天門冬胺酸與麩胺酸)、具不帶電極性側鏈之胺基酸(例如，甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具非極性側鏈之胺基酸(例如，丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、

甲硫胺酸)、具 ω -分支側鏈之胺基酸(例如, 蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)以及具芳族側鏈之胺基酸(例如, 酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸與組胺酸)。因而, 於一特定的抗體內之預測的非必需胺基酸殘基較佳地用來自相同的側鏈家族之另一個胺基酸殘基來代替。識別不會消除抗原結合之核苷酸和胺基酸守恆性取代的方法為本技藝中所熟知的(見, 例如, Brummell 等人, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi等人 *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 以及 Burks等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997))。

[0050] “胺基酸一致性序列” 當使用於本文中係提及可以以下述方式產生的一胺基酸序列, 其使用至少二個, 且較佳地更多個, 排列的胺基酸序列之一矩陣, 以及允許排列內的間隔, 以致於可能決定於各個位置之最頻繁的胺基酸殘基。一致性序列為該序列, 其包含有最頻繁地表示於各個位置之該等胺基酸。於2個或更多個胺基酸平均地表示於一個單一位置之事件中, 一致性序列包括該等胺基酸二者或全體。

[0051] 一蛋白的胺基酸序列可以以各種各樣的位準予以分析。舉例而言, 守恆或變異性可以以單一的殘基位準、多重的殘基位準、具間隔之多重的殘基等等來展現。殘基可以展現出完全相同的殘基之守恆或可以以種類位準守恆。胺基酸種類之實例包括極性但不帶電R基團(絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺酸與麩醯胺酸); 帶正電R基團(例如, 離胺酸、精胺酸, 與組胺酸); 帶負電R基團(麩胺酸與天門

冬胺酸)；疏水性R基團(丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、纈胺酸與酪胺酸)；以及特別的胺基酸(半胱胺酸、甘胺酸與脯胺酸)。其他的種類為熟悉此藝者所知道的以及可以使用結構的測定予以定義或其他的資料以評估替代性。就該意義來說，一可取代的胺基酸可以提及任何的胺基酸，其等可以被取代且維持該位置之功能守恆。

[0052] 然而，會承認，相同種類的胺基酸可以由其等之生物物理學的性質而按程度變化。舉例而言，會承認某些疏水性R基團(例如，丙胺酸、絲胺酸，或蘇胺酸)比其他的疏水性R基團(例如，纈胺酸或白胺酸)為更親水性的(亦即，具更高的親水性或較低的疏水性)。相對親水性或疏水性可以使用技藝承認的方法來決定(見，例如，Rose等人，*Science*, 229: 834-838 (1985)與Cornette等人，*J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987))。

[0053] 當使用於本文中，當一胺基酸序列(例如，一個第一VH或VL序列)與一個或更多個額外的胺基酸序列(例如，於一資料庫中的一個或更多個VH或VL序列)排列時，一序列(例如，該第一VH或VL序列)內的胺基酸位置可以與該一或更多個額外的胺基酸序列內的一“對應的位置”比較。當使用於本文中，“對應的位置”表示當該等序列為最佳排列時，亦即，當使該等序列排列以達到最高的百分比同一性或百分比相似性時，要比較的該(等)序列內之均等的位置。

[0054]術語“核酸分子”，係提及DNA分子與RNA分子。一種核酸分子可以為單股或雙股，但是較佳地為雙股DNA。一種核酸係“操作地連結”，當其被放置至與另一個核酸序列的功能關係之內時。舉例而言，一啟動子或增強子係操作地連結至一編碼序列，設若其影響該序列的轉錄。於某些具體例中，本發明提供了經單離的核酸分子，其等編碼本發明的一抗體、本發明的一可變異輕鏈，及/或本發明之可變異重鏈。於某些具體例中，本發明的一核酸分子編碼：一種多肽，其含有與序列辨識編號：2或序列辨識編號：14有至少97%的同一性之輕鏈可變異區域；一種多肽，其含有與序列辨識編號：5有至少95%的同一性之重鏈可變異區域；或一種抗體，其與序列辨識編號：10或序列辨識編號：17有至少96%的同一性。

[0055]術語“載體”係提及一種核酸分子，其能夠運送已經連接其之另一種核酸。一種類型的載體是一種“質體”，其係提及一種環形雙股的DNA環，額外的DNA段可以被連接至該其內。另一種類型的載體是一種病毒載體，其中額外的DNA段可以被連接進入病毒的基因組。某些載體能夠自主的複製於一種其等被導入的宿主細胞中(例如，具有一種細菌複製來源之細菌載體以及附加體(episomal)哺乳動物的載體)。其他的載體(例如，非附加體哺乳動物的載體)能在當導入至宿主細胞時被整合至宿主細胞的基因組，以及藉此與宿主的基因組一起被複製。

[0056]術語“宿主細胞”係提及一種細胞，其以及(and)

表現載體已經導入至其之內。宿主細胞可以包括細菌細胞、微生物細胞，植物細胞或動物細胞。細菌，其等容易轉形，包括腸桿菌科的成員，譬如大腸桿菌或沙門桿菌屬菌株；有芽胞桿菌科，譬如枯草桿菌；肺炎球菌屬；鏈球菌屬，以及流行性感冒嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)。適合的微生物包括啤酒酵母菌與畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)。適合的動物宿主細胞株包括CHO(中國倉鼠卵巢株)與NS0細胞。

[0057]術語“治療(treat)”、“治療(treating)”及“治療(treatment)”係提及本文中說明的治療或預防方法。“治療(treatment)”方法使用投藥至需要此投藥的一個體，本發明的一抗體，舉例而言，一個有TNF α 媒介的障礙之個體或是最後可能獲得此一障礙之個體，俾以預防、治療、遲緩、減少障礙或復發障礙的一個或更多個徵狀之嚴重性，或改善障礙或復發障礙的一或更多種徵狀，或是俾以延長個體之存活時間，使個體之存活時間超過無此治療所預期之存活時間。

[0058]術語“TNF媒介的障礙”一般係提及與TNF有關連的疾病狀態及/或徵狀，包括需要TNF參與之任何的障礙、徵狀的開始、進展或是持續。TNF媒介的障礙之實例包括，但不限於，老年性黃斑變性、新生血管性青光眼、糖尿病視網膜病變、早產兒視網膜病變、晶狀體後纖維組織增生、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巢癌、昏迷(comas)、含睪丸細胞之卵巢腺瘤

(arrhenoblastomas)、子宮頸癌、子宮內膜癌、子宮內膜增生、子宮內膜異位、纖維肉瘤、絨毛膜癌、頭頸癌、鼻咽癌、喉癌、肝母細胞瘤(hepatoblastoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑色素瘤、皮膚癌、血管瘤、海綿狀血管瘤、血管母細胞瘤、胰臟癌、視網膜母細胞瘤、星狀細胞瘤、神經膠母細胞瘤、神經鞘瘤、寡樹突神經膠細胞瘤、神經管胚細胞瘤、神經胚細胞瘤、橫紋肌肉瘤、骨原性肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、甲狀腺癌、威姆氏腫瘤(Wilm's tumor)、腎細胞癌、攝護腺癌、與母班症(phakomatoses)有關連的異常血管增殖、水腫(譬如與腦腫瘤有關連的)、梅格症候群(Meigs' syndrome)、類風濕性關節炎、牛皮癬與動脈粥狀硬化症。TNF媒介的障礙也包括乾眼症以及TNF α -相關的發炎性病狀，譬如眼睛發炎、過敏性結膜炎、皮膚炎、鼻炎，和氣喘，舉例而言，以及包括起因於TNF α 的活性之該等細胞的變化，其直接地或是間接地導致TNF α -相關的發炎性病狀。此外，TNF媒介的障礙也包括眼睛血管生成、貝西氏病、視網膜炎、青光眼、修格連氏症候群、糖尿病神經病變、鞏膜炎、角膜炎與眼色素層炎。

[0059]術語“有效劑量(effective dose)”或“有效劑量(effective dosage)”係提及足夠達到或至少部份地達到所欲的功効的量。術語“治療有效劑量”係定義為足以治癒或至少部份地阻止該疾病和其之併發症於已經罹患該疾病的一病人體內的一量。此用途之有效量會取決於待治療的

障礙之嚴重性以及病人自己的免疫系統之一般狀態。

[0060]術語“個體”係提及任何的人類或非人類動物。舉例而言，本發明的方法和組成物可以使用來治療一個有TNF媒介的障礙之個體。

[0061]編號系統當使用於本文中來識別抗體重鏈和輕鏈可變異區域內之胺基酸殘基位置係對應於如同由A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670 (AHo系統)所定義的該者。AHo系統以及如由Kabat等人所定義之最普遍使用的系統(Kabat, E. A., 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)之間的換算表係提供於A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670之中。

[0062]當使用於本文中，術語“聚集”係提及於液體溶液內之單體分子之間的分子間的相互作用/締合之過程，導致形成低聚物種。聚集可以在濃縮的溶液中使用加速穩定性研究於應力情況下予以評估。加速穩定性研究係藉由使用極端的儲存條件來設計以增加降解的速率、一化合物之聚集或化學的修飾。加速穩定性研究，亦知道為應力研究(stress studies)，典型地係於40°C和室溫下執行。此等穩定性研究提供了關於暴露於正常的標記儲存條件之外的環境條件，亦知道為應力情況，之效應之有價值的資訊。高蛋白濃縮溶液廣泛地使用於藥學工業之中。於高濃度的蛋白之溶液的行為可以與以稀釋的溶液分析為基礎來預測的溶

液的行為是顯著地不同的，由於此等溶液中之熱力學非理想化。此等系統中觀察到的非理想化係相關於蛋白-蛋白相互作用(PPI)。不同類型的力於決定整體本質和此等PPI的程度上扮演一關鍵的角色以及溶質和溶劑的性質會影響其等之相對貢獻。PPI的角色係由此等分子間的力予以驅動來支配溶液特性，包括物理的穩定性和蛋白自締合及聚集。濃縮的溶液為PPI藉由增加低聚合速率而影響溶液內的蛋白之該等溶液。一濃縮的溶液可以具有，舉例而言，至少10 mg/ml的蛋白濃度。

[0063]此方法之可溶的產物可以用分析的方法，譬如SE-HPLC，予以偵測。術語“減少聚集之修飾”當使用於本文中係提及一種修飾，譬如一種胺基酸取代，其減少了一抗體之聚集傾向於液體溶液內，與如本文中說明之一親代抗體相比。一種“親代”抗體為一種抗體，其包含有實質相同於如同對應的抗體之序列，該對應的抗體具有減少聚集的修飾。舉例而言，該親代抗體可以具有如同該經修飾的抗體相同的CDRs，且可以具有如同該經修飾的抗體確切相同的序列，除了於可變異輕鏈序列之AHo位置47處及/或50處的殘基之外，以及可以進一步不同於可變異重鏈序列之AHo位置12、103，及144處。亦可以存在其他的差異，只要該親代抗體不含有依據本發明的一種方法予以修飾的抗體內存在之減少聚集的修飾。

[0064]術語“介面”當使用於本文中係提及一種抗體的2個可變異領域(重與輕可變異領域)之間的相互作用。該

介面包括直接地或間接地參與可變異領域之間的相互作用之胺基酸殘基。此相互作用包括，但不限於，所有種類的非鍵結性相互作用，舉例而言凡得瓦力、氫鍵結、靜電的術語(electrostatic terms)，以及介於2個領域之間的疏水性相互作用。

[0065]除另有界定外，本文中所使用的所有的技術和科學術語具有本發明所屬之技藝中具有通常技術者所通常瞭解的相同的意義。縱然與本文中說明之該等相似或等效的方法或材料可用於實施或試驗本發明，適合的方法與材料仍會於以下說明。若有衝突，本說明書，包括定義，將會支配。此外，材料、方法，以及實施例僅作為例證而不意欲為限制。

[0066]本發明之各種各樣的態樣係說明進一步的細節於下列小部分之中。要了解各種各樣的具體例，優先選擇和範圍可以隨意地予以組合。再者，取決於特定的具體例，選擇的定義、具體例或範圍可能不適用。

[0067]於一個態樣中，本發明提供了抗體，其等結合TNF α 以及因而適合阻斷TNF α 活體內的功能。

[0068]於某些具體例中，本發明的抗體係用與相比一親代抗體之減少聚集的修飾予以最佳化，以致於本發明的一抗體具有與一親代/未經修飾的抗體相比較之減少的聚集之傾向。此(等)的修飾包括了參與可變異輕鏈(VL)與可變異重鏈(VH)的介面之特定的殘基之胺基酸取代。於一些具體例中，減少聚集的修飾包含至少一個胺基酸取代，其減少

以一種經由電腦模擬模型化方法之VL-VH界面的自由能，與該親代抗體之VL-VH界面的自由能相比，如本文中說明的。此等的修飾包括促成該VL-VH界面的自由能之特定殘基的胺基酸取代。

[0069]於某些具體例中，本發明之減少聚集之修飾包含一取代於VL鏈之AHo位置50處。於一具體例中，該取代為於AHo位置50處之精胺酸(R)。於另一具體例中，於AHo位置50處之精胺酸(R)代替離胺酸(K)。

[0070]於其他的具體例中，本發明之減少聚集之修飾包含一取代於VL鏈之AHo位置47處。於一具體例中，該取代為於AHo位置47處之精胺酸(R)。於另一具體例中，於AHo位置47處之精胺酸(R)代替離胺酸(K)。

[0071]AHo編號系統係詳細地說明於Honegger, A.以及 Plückthun, A. (2001) J Mol. Biol. 309:657-670)之中。可變異輕鏈之AHo位置50處對應於Kabat位置42處。可變異輕鏈之AHo位置47處對應於Kabat位置39處。Kabat編號系統係進一步說明於Kabat等人(Kabat, E. A., 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).)之中。AHo系統以及如由Kabat等人所定義之最普遍使用的系統之間的換算表係提供於A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670之中。

[0072]下列換算表提供了使用來識別抗體的重鏈和輕鏈可變異區域之內的胺基酸殘基位置之2個不同的編號系

統。Kabat編號系統係進一步說明於之中Kabat等人(Kabat, E. A. , 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 。 AHo編號系統係進一步說明於Honegger, A. and Pluckthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670)之中。

重鏈可變異區域編號

表1：關於重鏈可變異領域中的殘基位置之換算表

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	44	51	87	101
2	2	45	52	88	102
3	3	46	53	89	103
4	4	47	54	90	104
5	5	48	55	91	105
6	6	49	56	92	106
7	7	50	57	93	107
*	8	51	58	94	108
8	9	52	59	95	109
9	10	52a	60	96	110
10	11	52b	61	97	111
11	12	52c	62	98	112
12	13	*	63	99	113
13	14	53	64	100	114
14	15	54	65	100a	115
15	16	55	66	100b	116
16	17	56	67	100c	117
17	18	57	68	100d	118
18	19	58	69	100e	119
19	20	59	70	100f	120
20	21	60	71	100g	121
21	22	61	72	100h	122
22	23	62	73	100i	123

23	24	63	74	*	124
24	25	64	75	*	125
25	26	65	76	*	126
26	27	66	77	*	127
*	28	67	78	*	128
27	29	68	79	*	129
28	30	69	80	*	130
29	31	70	81	*	131
30	32	71	82	*	132
31	33	72	83	*	133
32	34	73	84	*	134
33	35	74	85	*	135
34	36	75	86	*	136
35	37	76	87	101	137
35a	38	77	88	102	138
35b	39	78	89	103	139
*	40	79	90	104	140
*	41	80	91	105	141
*	42	81	92	106	142
36	43	82	93	107	143
37	44	82a	94	108	144
38	45	82b	95	109	145
39	46	82b	96	110	146
40	47	83	97	111	147
41	48	84	98	112	148
42	49	85	99	113	149
43	50	86	100		

第1欄，Kabat編號系統之殘基位置。第2欄，關於第1欄所指出的位置之AHo編號系統之對應的號碼。第3欄，Kabat編號系統之殘基位置。第4欄，關於第3欄所指出的位置之AHo編號系統之對應的號碼。第5欄，Kabat編號系統之殘基位置。第6欄，關於第5欄所指出的位置之AHo編號系統之對應的號碼。

輕鏈可變異區域編號

表2：關於輕鏈可變異領域中的殘基位置之換算表

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	43	51	83	101
2	2	44	52	84	102
3	3	45	53	85	103
4	4	46	54	86	104
5	5	47	55	87	105
6	6	48	56	88	106
7	7	49	57	89	107
8	8	50	58	90	108
9	9	*	59	91	109
10	10	*	60	92	110
11	11	*	61	93	111
12	12	*	62	94	112
13	13	*	63	95	113
14	14	*	64	95a	114
15	15	*	65	95b	115
16	16	*	66	95c	116
17	17	51	67	95d	117
18	18	52	68	95e	118
19	19	53	69	95f	119
20	20	54	70	*	120
21	21	55	71	*	121
22	22	56	72	*	122
23	23	57	73	*	123
24	24	58	74	*	124
25	25	59	75	*	125
26	26	60	76	*	126
27	27	61	77	*	127
*	28	62	78	*	128
27a	29	63	79	*	129
27b	30	64	80	*	130
27c	31	65	81	*	131

27d	32	66	82	*	132
27e	33	67	83	*	133
27f	34	68	84	*	134
*	35	*	85	*	135
28	36	*	86	*	136
29	37	69	87	96	137
30	38	70	88	97	138
31	39	71	89	98	139
32	40	72	90	99	140
33	41	73	91	100	141
34	42	74	92	101	142
35	43	75	93	102	143
36	44	76	94	103	144
37	45	77	95	104	145
38	46	78	96	105	146
39	47	79	97	106	147
40	48	80	98	107	148
41	49	81	99	108	149
42	50	82	100		

第1欄，Kabat編號系統之殘基位置。第2欄，關於第1欄所指出的位置之AHo編號系統之對應的號碼。第3欄，Kabat編號系統之殘基位置。第4欄，關於第3欄所指出的位置之AHo編號系統之對應的號碼。第5欄，Kabat編號系統之殘基位置。第6欄，關於第5欄所指出的位置之AHo編號系統之對應的號碼。

[0073]本發明的抗體可以視需要包含額外的修飾。舉例而言，本發明的一抗體可以包含胺基酸取代來減少其之活體內免疫原性依據說明，舉例而言，於US專利申請案號碼12/973,968之中的方法及/或包含用於提高抗體的溶解度之取代，如同WO 09/155725之中所說明的。因而，於一具體例中，本發明的一抗體包含絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHo

編號)；絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHo編號)及/或絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHo編號)。此外，該抗體可以包含絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置97、98及/或99處(AHo編號)。較佳地，該抗體包含絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHo編號)、蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHo編號)以及蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHo編號)。

於一具體例中，本發明的一抗體包含可變異輕鏈：

序列辨識編號：1

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGR
APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFAT
YYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG

於一較佳具體例中，本發明的一抗體包含可變異輕鏈(CDRs為下面劃線的)：

序列辨識編號：2

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNWMA
WYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTL
TISLQPDFFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLG

於另一具體例中，本發明的一抗體包含可變異重鏈：

序列辨識編號3：可變異重鏈架構

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}WVRQA
PGKGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAED
TAVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

於再另一具體例中，本發明的一抗體包含可變異重鏈架構

序列辨識編號：4：可變異重鏈架構

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}WVRQA
PGKGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISKDTSKNTVY LQMNSLRAED
TAVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

於一較佳具體例中，本發明的抗體包含可變異重鏈
(CDRs為下面劃線的)：

序列辨識編號：5：

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWIC
WVRQAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISR
DTSKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCARLGYADYAYDLW
GGGTTVTVSS

當使用於本文中，X殘基為CDR插入位置。X可以為任
何天然存在的胺基酸；可以存在至少3個以及高至50個胺基
酸。

[0074]於一具體例中，本發明的一抗體之可變異輕鏈架
構包含序列辨識編號：1以及可變異重鏈架構包含有序列辨
識編號：3或序列辨識編號：4。

[0075]於另一具體例中，本發明的一抗體之可變異輕鏈
架構包含一序列，其與序列辨識編號：1有至少65%的同一
性，更佳為至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，
更佳為99%的同一性。最佳地該序列具有精胺酸(R)於A_Ho
位置50處。於另一具體例中，該序列具有精胺酸(R)於A_Ho
位置47處。

[0076]於另一具體例中，本發明的一抗體之可變異重鏈架構包含一序列，其與序列辨識編號3有至少80%的同一性，更佳為至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，更佳為99%的同一性。較佳地，該抗體包含絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHo編號)、蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHo編號)以及蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHo編號)。

[0077]於另一具體例中，本發明的一抗體之可變異輕鏈架構包含一序列，其與序列辨識編號：2或序列辨識編號：14有至少97%、98%，更佳地99%的同一性。

[0078]於另一具體例中，本發明的一抗體之可變異重鏈架構包含一序列，其與序列辨識編號：5有至少95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性。

[0079]於另一具體例中，本發明的一抗體包含一序列，其與序列辨識編號：10或序列辨識編號：17有至少96%、97%、98%，更佳地99%的同一性。

[0080]於另一具體例中，本發明的一抗體之可變異輕鏈架構包含序列辨識編號：2或序列辨識編號：14，以及可變異重鏈架構包含序列辨識編號：5。

[0081]於一具體例中，本發明的抗體或抗體片段為單鏈抗體(scFv)或Fab片段。就scFv抗體而言，一VL領域可以藉由一可撓的连接子以任一方位而連接至一VH領域。一最高技術水準的適合连接子由重複的GGGGS(序列辨識編號：6)胺基酸序列或其之變異體所組成。於本發明之一較佳具體

例中，使用一種(GGGGS)₄(序列辨識編號：7)的连接子或其之衍生物，但是1-3重複的變異體也是可能的(Holliger等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。可以使用於本發明之其他的连接子係依Alfthan等人(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi等人(2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu等人(1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov等人(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 以及Roovers等人(2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59所說明的。排列可以為VL-连接子-VH或是VH-连接子-VL，且前者的方位為較佳的一者。就Fab片段而言，經選擇的輕鏈可變異領域VL係融合至一種人類Ig 輕鏈之守恆區域，而適合的重鏈可變異領域VH係融合至一種人類IgG之第一(N-端)守恆領域CH1。在C-端，一種鏈內的二硫鍵係形成於2個守恆領域之間。

[0082]因而，於一具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：8

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGR
APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFAT
YYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}WVRQAPG
KGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

於另一具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：9

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGK
 APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFAT
 YYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGG
 GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}WVRQAP
 GKGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

於一較佳具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：10

(34rFW1.4_VL_K50R_DHP)：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMA
 WYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTL
 TISLQPDFFATYYCQGNFNTGDRYAFGGQGTKLTVLGGG
 GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRL
 SCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDNDIT
 PLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYC
 ARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

於一具體例中，本發明的一抗體包含可變異輕鏈：

序列辨識編號11：FW1.4之可變異輕鏈架構(KI27)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGK
 APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFAT
 YYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG

於另一具體例中，本發明的一抗體包含可變異輕鏈：

序列辨識編號12：FW1.4之經取代的可變異輕鏈架構

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGK

APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFAT
YYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

於再另一較佳具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：13

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGK
APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFAT
YYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

於另一具體例中，本發明的一抗體包含可變異輕鏈
(CDRs為下面劃線的)：

序列辨識編號：14：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNWMA
WYQQRPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTL
TISLQPDDEFATYYCQGNFNTGDRYAFFGQGTKLTVL

因而，於一具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：15：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGK
APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFAT
YYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}WVRQAPG
KGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRATEDA
VYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

於另一具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：16：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGK

APKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFAT
 YYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGG
 GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}WVRQAP
 GKGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISKDTSKNTVYLMNSLRAEDT
 AVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

於一具體例中，本發明的一抗體包含序列：

序列辨識編號：17

(34rFW1.4_VL_K47R_DHP)：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMA
 WYQQRPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTL
 TISSLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGGQGTKLTVLGGG
 GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSGVQPGGSLRL
 SCTASGFTISRYSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDNDIT
 PLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTATYYC
 ARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

於還另一具體例中，本發明的一抗體包含序列：序列
 辨識編號：18

(34rFW1.4)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMA
 WYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTL
 TISSLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGGQGTKLTVLGGG
 GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSGVQPGGSLRL
 SCTASGFTISRYSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDNDIT
 PLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTATYYC

ARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

於一具體例中，一親代抗體之VL為或包含序列辨識編號：11或序列辨識編號：12或是一序列，其與序列辨識編號：11或序列辨識編號：12有至少65%的同一性，更佳地，80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性。於另一較佳具體例中，該親代抗體之VH為或包含序列辨識編號：3或序列辨識編號：4 一序列，其與序列辨識編號：3或序列辨識編號：4有至少80%的同一性，更佳地，85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性。

[0083]本發明的一種包含減少聚集之修飾的抗體較佳地包含來自一種兔抗體之一個或更多個CDRs。如同本技藝中所知道的，兔CDRs係不同於人類或是嚙齒目CDRs：其等能含有會變為連接至框架的二硫化物或是形成CDR間的(interCDR) S-S橋之半胱胺酸殘基。並且，兔CDRs通常不屬於任何先前知道的正準結構。

[0084]本發明亦特徵在二價且雙專一性(bispecific)分子，其包含本發明之一抗-TNF α 抗體，或其之一片段。本發明的一抗體，或其之抗原結合部份，可以衍生或連接至另一個官能分子，例如，另一個胜肽或蛋白(例如，另一個抗體或是一受體之配位子)來產生一種結合至至少二個不同的結合位址或標靶分子之雙專一性分子。本發明的抗體可以衍生或連接至多於一個其他的官能分子來產生結合至多於二個不同的結合位址及/或標靶分子之多重專一性分

子；術語“雙專一性分子”當使用於本文中亦打算包含此等多重專一性分子。雙專一性分子之非限制性實例包括一個雙價抗體(diabody)、一個單鏈雙價抗體，以及一個串聯抗體，如同熟悉此藝者所知道的。

[0085]爲了創造本發明的雙專一性分子，本發明的抗體可以功能性地聯結(例如，藉由化學性耦合、基因融合、非共價性締合或其他方法)至一或更多個結合分子，譬如另一抗體、抗體片段、腫瘤專一性或病原專一性抗原、胜肽或結合仿效物，以致於產生一個雙專一性分子。因此，本發明包括雙專一性分子，其包含具有TNF α 之專一性的至少一個第一結合分子以及具有一或更多個額外的標靶抗原決定區之專一性的一個第二結合分子。

[0086]於一具體例中，本發明的雙專一性分子包含一結合專一性至少一個抗體，或是其之一抗體片段，包括，例如，一種Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv，或是一單鏈Fv。該抗體亦可以爲一種輕鏈或重鏈二聚體，或其之任何的最小片段，譬如一種Fv或一種單鏈建構物如同Ladner等人U.S.專利號碼4,946,778之中所說明的，其等之內容係明確併入以作爲參考資料。

[0087]雖然人類單株抗體爲較佳的，可以使用於本發明的雙專一性分子之其他的抗體爲鼠類的、嵌合及一種擬人化單株抗體。

[0088]本發明的雙專一性分子可以藉由使組成性的結合專一性使用本技藝中所知道的方法結合而製備。舉例而

言，該雙專一性分子之各個結合專一性可以分別地產生以及接而互相結合。當結合專一性為蛋白或是胜肽時，可以使用各種各樣的耦合或是交聯劑於共價結合。交聯劑之實例包括蛋白A、碳二亞胺、N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基-硫乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫雙(2-硝基甲酸) (DTNB)、o-伸苯基二順丁烯二醯亞胺(oPDM)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)，以及磺酸基琥珀醯亞胺基4-(N-順丁烯二亞醯胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(磺酸基-SMCC) (見例如，Karpovsky等人(1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA等人(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其他的方法包括Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan等人(1985) *Science* 229:81-83)，以及Glennie等人(1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375)之中說明的該等。較佳的結合劑為SATA和磺酸基-SMCC，二者都可得自於Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

[0089]當結合專一性為抗體時，其等可以經由氫硫基結合而結合，舉例而言，經由2個重鏈之C-端樞紐區或是其他的位址，不管是天然存在的或為人工導入的。於一特定較佳具體例中，樞紐區係在結合之前修飾成含有奇數個氫硫基殘基，較佳為一者。

[0090]任擇地，二個結合專一性可以編碼於相同的載體內以及表現且組合於相同的宿主細胞中。此方法在雙專一性分子為一種mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂或是配位子 x Fab融合蛋白之情況為特別有用。本發明的雙專一

性分子可以為一單鏈分子，其包含一單鏈抗體和一結合決定位，或是一單鏈雙專一性分子包含有2個結合決定位。雙專一性分子可以包含至少二個單鏈分子。再者，一種雙專一性分子可以為一種scFv，其專一地結合第一標靶，其中該scFv之V_H與V_L與一可撓的连接子連接，該连接子包含有提供專一性結合至一第二標靶之一領域。適合的连接子係說明，舉例而言，於國際專利申請案WO 2010/006454之中。用於製備雙專一性分子之方法係舉例而言說明於U.S.專利號碼5,260,203；U.S.專利號碼5,455,030；U.S.專利號碼4,881,175；U.S.專利號碼5,132,405；U.S.專利號碼5,091,513；U.S.專利號碼5,476,786；U.S.專利號碼5,013,653；U.S.專利號碼5,258,498；以及U.S.專利號碼5,482,858之中。

[0091]該雙專一性分子之結合至其等之專一性標靶可以藉由，舉例而言，酵素免疫法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、FACS分析、生物分析(例如，生長抑制)，或是藉由免疫墨點分析予以確認的。此等分析的各者一般係藉由使用之的一種對有興趣的複合物專一之標記試劑(例如，一種抗體)而偵測出有特定興趣的蛋白-抗體複合物之出現。舉例而言，該TNF抗體複合物可以使用例如，一種識別且專一地結合抗體-TNF複合物之酵素-連接的抗體或抗體片段來偵測。任擇地，複合物可以使用各種各樣的其他免疫分析法之任一者來偵測。舉例而言，該抗體可以予以放射性標記以及使用於放射免疫分析法(RIA)中(見，舉例而言，

Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 其係併入本文以作為參考資料)。放射性同位素可以藉由此等手段如使用一種 γ 計數器或一種閃爍計數器或是藉由自動放射照相術予以偵測。

[0092]於另一個態樣中，本發明提供了一種產生本文中說明的該等抗體之方法。用於生產如本文中所提供之具有減少的聚集之傾向於溶液內之抗體的方法係以經由輕鏈與重鏈之間的抗體領域之相互作用之調變之出人意外的觀察為基礎，抗體與抗體之聚集的傾向可以減少，以及減少聚集作用之突變可以藉由決定VL/VH介面的自由能來可靠地預測，定義為介於抗體(譬如一種scFv)與個別的可變異領域之間的能之差異。如同本文中所顯示的，可以產生減少聚集作用之取代，其係藉由降低可變異領域之間的自由能而調變抗體領域之相互作用，而不影響抗體的穩定性或結合活性。

[0093]於一具體例中，本發明的一種方法包含以下步驟：

(i) 提供一種抗體，其包含有一個可變異輕鏈(VL)與可變異重鏈(VH)；

(ii) 識別參與該抗體之可變異輕鏈(VL)與可變異重鏈(VH)之間的的介面內之一個或更多個殘基位置；以及

(iii) 藉由導入一取代於該(等)經識別的殘基位置來修飾該抗體以致於該(等)取代減少了該VL領域與該VH領域

之間的自由能達至少 0.5 kcal/mol，較佳為至少 1.0 kcal/mol，以及最佳為至少 2.0 kcal/mol (亦即，帶有該取代之該 VL 領域與該 VH 領域之間的自由能為比不包含該胺基酸取代之該對應的 VL 領域與該 VH 領域之間的自由能更低至少 0.5 kcal/mol)，藉此減少該經修飾的抗體與一親代抗體的聚集傾向相比之聚集傾向。

[0094] 如上所概述的，該抗體可以為，舉例而言，一個 Fab、Fab'、一個 F(ab)'²、單鏈 Fv (scFv)、一 Fv 片段、一個雙價抗體、一個單鏈雙價抗體、一串聯抗體，或一線狀的抗體；於一較佳具體例中，該抗體為一個單鏈 Fv(scFv)。

[0095] 於一較佳具體例中，參與該抗體之可變異輕鏈與可變異重鏈之間的介面之一個或更多個殘基位置之識別 (亦即，步驟(ii)) 涉及該 VL -VH 介面之間的自由能之判定。此可以藉由使用通常知道的生物資訊程式予以執行。一種適合的生物資訊程式之一個實例為 CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)。

[0096] 為了判定該 VL -VH 介面之間的自由能之目的，典型地，提供該蛋白之完全的原子分子呈現。該介面的自由能就隱性溶劑方法而論是介於含有二個可變異領域 VL 與 VH 的之整個抗體以及個別的領域之能的總合之間的能差。此涉及 3 個單一的能之計算，(1) 關於該抗體的之 G(a)；(2) 關於該 VL G(b)；以及 (3) 關於該 VH G(c)。因此，該介面的自由能為

$$G_{\text{介面}} = G(a) - G(b) - G(c)$$

於一具體例中，隱性溶劑的方法如同本技藝中所知道的為GBMV或PBSA。

[0097]自由能的判定可以進一步包含模擬蛋白的電荷分布之步驟。該電荷分布可以以靜電或是凡得瓦力為基礎來模擬。

[0098]為了決定一適合的修飾，參與該介面之一或更多個胺基酸殘基可以就取代而言予以挑選。舉例而言，產生一種蛋白的分子模型，其於選擇的位置包含有該一或更多個取代(例如，使一或更多個殘基改變成丙胺酸)以及判定經取代的分子呈現之介面的自由能。設若該經取代的分子模型之介面的自由能係低於起始的分子模型之介面的自由能，胺基酸殘基係予以選擇用於取代。在CHARMm的背景，突變可以，舉例而言，用Build Mutants 協定來建構。於分子模型中之該一或更多個取代可以在已知道的或猜想是涉及VL/VH介面的位置處。

[0099]於一具體例中，執行了分子模型的能量最小化之額外的步驟，該分子模型包含有該一或更多個取代於選擇的位置在該(等)突變附近區域中。該區域可以設定成10埃。

[0100]於一具體例中，一個經識別用於取代之殘基位置係由一種帶電胺基酸所佔據。

[0101]一種由本發明的一種方法所產生的抗體可以包含如同本技藝中所知道之任何適合的可變異輕鏈或重鏈，以及較佳地包含來自一種兔抗體之至少一個CDR。某些較佳的可變異輕鏈或重鏈係說明於本文中。舉例而言，本發

明的抗體可以包含：一個VL抗體框架，其與序列辨識編號：11或序列辨識編號：12有至少65%的同一性，更佳地80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性，進一步包含精胺酸(R)於可變異輕鏈之A_{Ho}位置47處及/或A_{Ho}位置50處；以及一個V_H抗體框架，其與序列辨識編號：3有至少80%的同一性，更佳地，85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性。

[0102]該一或更多個殘基位置之修飾較佳地依據PCT/CH2008/000285之教示來實行，其係以其之整體內容併入至本文中以作為參考資料。簡言之，關於一特定的抗體亞型，某些胺基酸係存在於該抗體框架的特定殘基位置。舉例而言，

a)關於一種人類VH3家族重鏈可變異區域，較佳的胺基酸為：

(i)麩醯胺酸(Q)於使用A_{Ho}或Kabat編號系統之胺基酸位置1處；

(ii)麩醯胺酸(Q)於使用A_{Ho}或Kabat編號系統之胺基酸位置6處；

(iii)蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)於使用A_{Ho}或Kabat編號系統之胺基酸位置7處；

(iv)丙胺酸(A)、纈胺酸(V)，或苯丙胺酸(F)於使用A_{Ho}編號系統之胺基酸位置89處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置78處)；及/或

(v)精胺酸(R)、麩醯胺酸(Q)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)、

甲硫胺酸(M)或苯丙胺酸(F)於使用AHO編號系統之胺基酸位置103處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置89處)；

b)關於一種人類VH1a家族重鏈可變異區域，較佳的胺基酸為：

(i)麩胺酸(E)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置1處；

(ii)麩胺酸(E)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置6處；

(iii)白胺酸(L)於使用AHO編號系統之胺基酸位置12處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置11處)；

(iv)甲硫胺酸(M)於使用AHO編號系統之胺基酸位置13處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置12處)；

(v)麩胺酸(E)或麩醯胺酸(Q)於使用AHO編號系統之胺基酸位置14處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置13處)；

(vi)白胺酸(L)於使用AHO編號系統之胺基酸位置19處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置18處)；

(vii)異白胺酸(I)於使用AHO編號系統之胺基酸位置21處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置20處)；

(viii)苯丙胺酸(F)、絲胺酸(S)、組胺酸(H)或天門冬胺酸(D)於使用AHO編號系統之胺基酸位置90處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置79處)；

(ix)天門冬胺酸(D)或麩醯胺酸(Q)於使用AHO編號系統之胺基酸位置92處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置81處)；

(x)甘胺酸(G)、天門冬醯胺酸(N)或蘇胺酸(T)於使用 AHo編號系統之胺基酸位置95處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置82b處)；及/或

(xi)蘇胺酸(T)、丙胺酸(A)、脯胺酸(P)或苯丙胺酸(F)於使用AHo編號之胺基酸位置98處(於使用Kabat編號之胺基酸位置84處)；

c)關於一種人類VH1b家族重鏈可變異區域，較佳的胺基酸為：

(i)麩胺酸(E)於使用AHo或Kabat編號系統之胺基酸位置1處；

(ii)蘇胺酸(T)、脯胺酸(P)、纈胺酸(V)或天門冬胺酸(D)於使用AHo編號系統之胺基酸位置10處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置9處)；

(iii)白胺酸(L)於使用AHo編號系統之胺基酸位置12處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置11處)；

(iv)纈胺酸(V)、精胺酸(R)、麩醯胺酸(Q)或甲硫胺酸(M)於使用AHo編號系統之胺基酸位置13處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置12處)；

(v)麩胺酸(E)、精胺酸(R)或甲硫胺酸(M)於使用AHo編號系統之胺基酸位置14處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置13處)；

(vi)精胺酸(R)、蘇胺酸(T)，或天門冬醯胺酸(N)於使用AHo編號系統之胺基酸位置20處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置19處)；

(vii)異白胺酸(I)、苯丙胺酸(F)，或白胺酸(L)於使用AHo編號系統之胺基酸位置21處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置20處)；

(viii)離胺酸(K)於使用AHo編號系統之胺基酸位置45處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置38處)；

(ix)蘇胺酸(T)、脯胺酸(P)、纈胺酸(V)或精胺酸(R)於使用AHo編號系統之胺基酸位置47處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置40處)；

(x)離胺酸(K)、組胺酸(H)或麩胺酸(E)於使用AHo編號系統之胺基酸位置50處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置43處)；

(xi)異白胺酸(I)於使用AHo編號之胺基酸位置55處(於使用Kabat編號之胺基酸位置48處)；

(xii)離胺酸(K)於使用AHo編號之胺基酸位置77處(於使用Kabat編號之胺基酸位置66處)；

(xiii)丙胺酸(A)、白胺酸(L)或異白胺酸(I)於使用AHo編號系統之胺基酸位置78處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置67處)；

(xiv)麩胺酸(E)、蘇胺酸(T)或丙胺酸(A)於使用AHo編號系統之胺基酸位置82處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置71處)；

(xv)蘇胺酸(T)、絲胺酸(S)或白胺酸(L)於使用AHo編號系統之胺基酸位置86處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置75處)；

(xvi)天門冬胺酸(D)、天門冬醯胺酸(N)或甘胺酸(G)於使用AHo編號系統之胺基酸位置87處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置76處)；及/或

(xvii)天門冬醯胺酸(N)或絲胺酸(S)於使用AHo編號系統之胺基酸位置107處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置93處)；

d)關於一種人類V_H1家族輕鏈可變異區域，較佳的胺基酸為：

(i)麩胺酸(E)或異白胺酸(I)於使用AHo或Kabat編號系統之胺基酸位置1處；

(ii)纈胺酸(V)或異白胺酸(I)於使用AHo或Kabat編號系統之胺基酸位置3處；

(iii)纈胺酸(V)、白胺酸(L)或異白胺酸(I)於使用AHo或Kabat編號系統之胺基酸位置4處；

(iv)麩醯胺酸(Q)於使用AHo或Kabat編號系統之胺基酸位置24處；

(v)精胺酸(R)或異白胺酸(I)於使用AHo編號系統之胺基酸位置47處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置39處)；

(vi)精胺酸(R)、麩胺酸(E)蘇胺酸(T)、甲硫胺酸(M)或麩醯胺酸(Q)於使用AHo編號系統之胺基酸位置50處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置42處)；

(vii)組胺酸(H)、絲胺酸(S)或苯丙胺酸(F)於使用AHo編號系統之胺基酸位置57處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置49處)；

(viii) 苯丙胺酸(F)於使用AHO編號系統之胺基酸位置91處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置73處)；及/或

(ix) 纈胺酸(V)、絲胺酸(S)、甘胺酸(G)或異白胺酸(I)於使用AHO編號系統之胺基酸位置103處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置85處)；

e) 關於一種人類V_H3家族輕鏈可變異區域，較佳的胺基酸為：

(i) 蘇胺酸(T)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置2處；

(ii) 蘇胺酸(T)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置3處；

(iii) 異白胺酸(I)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置10處；

(iv) 酪胺酸(Y)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置12處；

(v) 絲胺酸(S)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置18處；

(vi) 丙胺酸(A)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置20處；

(vii) 甲硫胺酸(M)於使用AHO編號系統之胺基酸位置56處(於使用Kabat編號之胺基酸位置48處)；

(viii) 纈胺酸(V)或蘇胺酸(T)於使用AHO編號系統之胺基酸位置74處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置58處)；

(ix) 天門冬醯胺酸(N)於使用AHO編號系統之胺基酸位

置94處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置76處)；

(x)酪胺酸(Y)或絲胺酸(S)於使用AHO編號系統之胺基酸位置101處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置83處)；及/或

(xi)白胺酸(L)或丙胺酸(A)於使用AHO編號之胺基酸位置103處(於使用Kabat編號之胺基酸位置85處)；

f)關於一種人類V財1家族輕鏈可變異區域，較佳的胺基酸為：

(i)白胺酸(L)、絲胺酸(S)或麩胺酸(E)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置1處；

(ii)丙胺酸(A)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或酪胺酸(Y)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置2處；

(iii)纈胺酸(V)或甲硫胺酸(M)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置4處；

(iv)麩胺酸(E)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置7處；

(v)丙胺酸(A)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置11處；

(vi)蘇胺酸(T)或絲胺酸(S)於使用AHO或Kabat編號系統之胺基酸位置14處；

(vii)組胺酸(H)於使用AHO編號系統之胺基酸位置46處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置38處)；

(viii)蘇胺酸(T)、絲胺酸(S)、天門冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q)或脯胺酸(P)於使用AHO編號系統之胺基酸位置53

處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置45處)；

(ix)精胺酸(R)或麩醯胺酸(Q)於使用AHO編號系統之胺基酸位置82處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置66處)；

(x)甘胺酸(G)、蘇胺酸(T)或天門冬胺酸(D)於使用AHO編號系統之胺基酸位置92處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置74處)；及/或

(xi)纈胺酸(V)、蘇胺酸(T)、組胺酸(H)或麩胺酸(E)於使用AHO編號之胺基酸位置103處(於使用Kabat編號系統之胺基酸位置85處)。

[0103]因此，本方法中進行的取代較佳地遵循PCT/CH2008/000285之教示。亞型判定為本技藝中具有技術者所知道的。

[0104]於一具體例中，本發明的一種方法包含一種抗體於可變異輕鏈，特別地V_H1可變異輕鏈，之AHO位置47處及/或50處之修飾。較佳地，該抗體係予以修飾成包含精胺酸(R)於可變異輕鏈之AHO位置47處及/或AHO位置50處。於一些具體例中，離胺酸(K)係由精胺酸(R)來取代於可變異輕鏈之AHO位置47處及/或AHO位置50處。因本發明的抗體可以視需要包含額外的修飾，本發明之方法可以包含修飾該抗體之另外的步驟，以便包含絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHO編號)；絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHO編號)及/或絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHO編號)。此外，該抗體可以修飾成包含絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置97、98及/或99處(AHO編號)。較佳地，該方法

包含有下列步驟：修飾該抗體以包含絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHo編號)，蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHo編號)以及蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHo編號)。

[0105]本發明進一步提供一種生產一擬人化的抗體的方法，該擬人化的抗體具有低的聚集傾向於溶液內，該方法包含選擇一個可變異輕鏈架構，其包含精胺酸(R)於AHo位置47處及/或於AHo位置50處。該方法可以進一步包含選擇一個可變異重鏈架構，其包含一個絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHo編號)；絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHo編號)及/或絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHo編號)。於一具體例中，一個根據挑選的選擇準則而識別的框架可以進一步以本發明之減少聚集之修飾予以修飾。舉例而言，設若一個可變異輕鏈架構係識別為具有一精胺酸(R)於位置50處，於AHo位置的殘基可以用一不同的胺基酸，譬如精胺酸(R)，予以取代或是設若一可變異重鏈係識別為具有一絲胺酸(S)於AHo位置12處，於AHo位置103與144處之殘基可以用蘇胺酸予以取代。

[0106]當使用於本文中，一種“擬人化的”抗體為一種抗體，其包含有非人類CDRs與人類或人類衍生的可變異重及/或人類或人類衍生的可變異輕鏈架構序列。擬人化的抗體為本技藝中所熟知的。於一具體例中，擬人化的抗體包含由一兔所產生的一種抗體或是由一CDR庫所選擇的至少一個，以及較佳地為六個，CDRs。

[0107]該可變異抗體框架可以以與該等CDRs所發

源的抗體之可變異框架序列之同一性及/或相似性為基礎，或是以另外較佳的框架序列為基礎而選擇，舉例而言，自一資料庫（譬如 the Kabat database、Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)、VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)、VBASE2 (<http://www.vbase2.org/>)、The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest (<http://www.kabatdatabase.com/index.html>)、the Universal Protein Resource (UniProt; <http://pir.georgetown.edu/>)，以及 Abysis Database (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)。

[0108]各種各樣的電腦程式為可得的用於檢索符合所選擇的必要條件之適合的人類框架序列。舉例而言，“KabatMan”為由*Sequences of Immunological Interest book*之Kabat抗體序列資料之一電腦可檢索的版本。KabatMan程式係說明於報告之中：Martin (1996) Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 25, 130-133，以及於<http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>，和<http://www.bioinf.org.uk/abs/kabatman.html>可得到。Abysis資料庫，於<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>，合併了來自Kabat、IMGT和PDB之序列資料及來自PDB之結構資料。其提供了綜合的之點擊式介面，其允許一者以各種各樣的準則來檢索序列資料以及顯示不同格式的結果。關於來自PDB的資料，序列檢索可以與結構的限制組合。

[0109]於另一個態樣中，本發明提供了一種藉由本文中所揭示的方法所產生的抗體。於一較佳具體例中，該抗體包含一個VL抗體框架，其與序列辨識編號：12或序列辨識編號：13有至少80%的同一性，更佳地85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性；較佳地，該抗體包含精胺酸(R)於可變異輕鏈之A_Ho位置47處及/或A_Ho位置50處。

[0110]額外地或任擇地，該VH抗體框架為序列辨識編號：3或包含序列辨識編號：3或是為一序列，其與序列辨識編號：3有至少80%的同一性，更佳地，85%、90%、95%、96%、97%、98%，更佳地99%的同一性。

[0111]於某些具體例中，本發明進一步提供：

(1) 一種減少一抗體成為異二聚複合物之聚集傾向的方法，該異二聚複合物包含重與輕可變異領域，該方法包含下列步驟：

(a) 提供該抗體之完全的原子分子呈現；

(b) 判定介於二個領域之間的介面之自由能；

(c) 挑選參與該介面之一或更多個胺基酸殘基用於取代，其係藉由提供包含有一或更多個取代於選擇的位置處之抗體的分子模型以及判定該經取代的分子呈現的介面之自由能；

(d) 選擇一個胺基酸殘基用於取代，設若該經取代的分子模型之介面的自由能係低於該起始的分子模型之介面的自由能；

(2) (1)的方法，其中該介面的自由能係藉由計算在隱性溶劑方法的情況下介於複合物以及個別的領域之能的總合之間的能差來決定；

(3) (2)的方法，其中該溶劑為GBMV或是PBSA；

(4) 前述(1)-(3)的任一者之方法，進一步包含有下列步驟：

(i) 模擬蛋白的電荷分布，其中該步驟係在步驟a和b中執行；

(5) (4)的方法，其中該電荷分布係以靜電或凡得瓦力為基礎來模擬；

(6) 前述(1)-(5)的任一者之方法，其中步驟(c)包含有在突變附近的區域之能量最小化之額外步驟；

(7) 前述(1)-(7)的任一者之方法，其中該抗體為一單鏈可變異片段(scFv)。

[0112]本發明的抗體可以使用重組遺傳學的領域之例行的技術來產生。了解到多肽的序列，編碼其等之cDNAs可以藉由本技藝中所熟知的方法透過基因合成來產生。此等cDNAs可以選殖至適合的載體質體之內。

[0113]可以使用本技藝中具有技術者所熟知的標準選殖和突變誘發的技術來附著連接子、混合領域(shuffle domains)或建構物融合用於Fab片段之產生。揭示本發明之一般方法之基本的協定係說明於*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 3rd ed. 2001)以及於*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人，

1999)之中。

[0114] 懷有編碼一種scFv多肽的基因之DNA序列，或是就Fab片段而言，編碼2個分別的基因或是一種bi-順反子操縱子，其包含有VL-C κ 和VH-CH1融合之2個基因，係選殖至一適合的表現載體之內，較佳地帶有一可誘導的啟動子的一者。一定要注意在各基因的前面存在一適當的核糖體結合位址以確保轉譯。要了解本發明的抗體包含所揭示的序列而不是本發明的抗體由所揭示的序列所組成。舉例而言，選殖的策略可能需要一種建構物存在，該建構物係由一種在N-端末端帶有一個或一些額外的殘基之抗體所構成。特別地，由起始密碼所衍生的甲硫胺酸可以存在於最終的蛋白內，在其尚未被轉譯後切割的情況中。scFv抗體之多數的建構物產生一額外的丙胺酸於N-端末端。於本發明之一較佳具體例中，一種用於大腸桿菌內之周質表現的表現載體係予以挑選(Krebber, 1997)。該載體包含有一啟動子在一種可切割開的訊息序列的前面。抗體胜肽之編碼序列接而在架構上融合至該可切割開的訊息序列。此允許經表現的多肽之靶向該訊息序列被切割開之處的細菌周質處。該抗體接而予以摺疊。就Fab片段而言，VL-C κ 與VH-CH1融合胜肽二者都必須連接至一輸出訊息。共價S-S鍵係在胜肽已經到達周質之後形成於C-端半胱胺酸。設若抗體之細胞質的表現為較佳的，該等抗體通常可以以高的產量由包涵體(inclusion bodies)獲得，其等可以與其他的細胞的片段和蛋白容易地分隔開。於此事例中，包涵體係溶

解於一變性劑內，像例如，胍鹽酸鹽(GndHCl)以及接而藉由本技藝中具有技術者所熟知的復性程序予以再摺疊。

[0115]表現scFv或Fab多肽之質體係被導入至一種適合的宿主中，較佳為一細菌的、酵母菌或哺乳動物的細胞，最佳地一適合的大腸桿菌菌株如舉例而言，用於周質表現之JM83或是用於包涵體內表現的BL21。多肽可以由周質予以收穫或是形成包涵體且使用標準的技術予以純化，譬如本技藝中具有技術者所知道的離子交換層析術、逆相層析術、親和力層析術及/或凝膠過濾。

[0116]本發明的抗體可以特徵在於產量、溶解度和活體外穩定性方面。舉例而言，對於TNF之結合能力，較佳地對於人類TNF α 之結合能力，可以如同WO9729131之中所說明的使用重組型人類TNF藉由ELISA或表面電漿子共振(BIACore)來活體外測試，後者的方法也允許決定 k_{off} 速率常數，其應該較佳低於 $10^{-3}s^{-1}$ 。 ≤ 10 nM的Kd值為較佳的。

[0117]於一具體例中，本發明提供了抗體，其結合TNF α 以及因而適合來阻斷TNF α 活體內的功能。於一特定的具體例中，該抗-TNF α 抗體包含序列辨識編號：10或是序列辨識編號：17之序列。

[0118]關於治療應用方面，本發明的抗-TNF抗體係以譬如以上討論的該等之藥學上可接受的劑量形式而投藥至一哺乳動物，較佳為一人類，包括可以靜脈內地投藥至一人類的該等，如同一大丸藥或藉由連續的注入持續一段時間期間，藉由肌肉內、腹膜內的、腦脊髓內的、皮下的、

關節內的、滑膜內的、椎管內(intrathecal)、口的、局部的、眼內的、鼻內的、耳的、舌下的、經皮的，或吸入途徑，舉例而言。抗體亦適當地藉由腫瘤內的、腫瘤週邊的、病灶內的，或是病灶週邊途徑予以投藥，以行使局部的以及系統性的治療效應。

[0119]在預防或治療疾病方面，抗體之適當的劑量會取決於待治療的疾病種類，如同以上所定義的，疾病的嚴重性與過程，是否該抗體係爲了預防性或治療性目的而投藥，先前的療法，病人對該抗體之臨床病史及反應，以及主治醫師的判斷。該抗體係適當地以一次或是持續一系列的治療方式予以投藥至病人。

[0120]本發明的抗-TNF抗體在TNF媒介的疾病之治療方面是有用的。取決於疾病的類型與嚴重性，大約1 $\mu\text{g/kg}$ 至大約50 mg/kg (例如，0.1-20 mg/kg)的抗體爲投藥至病人之起始的候選劑量，不管是，舉例而言，藉由一或更多個分別的投藥，或是藉由連續的注入。一典型的每日或每週的劑量可能範圍由大約1 $\mu\text{g/kg}$ 至大約20 mg/kg 或是更多，取決於以上提及的因素。關於重複的投藥持續數天或更久，取決於病況，重複進行治療直到疾病徵狀之所欲的抑制發生爲止。然而，其他的劑量攝生法可以是有用的。此治療法之進展可容易地藉由慣用的技術和分析予以監控，包括，舉例而言，放射線照相腫瘤成像。

[0121]依據本發明之另一具體例，該抗體於預防或治療疾病方面之有效性可以藉由連續地投藥該抗體或是組合以

對該等目的有效的另一個製劑而改善，譬如血管內皮生長因子(VEGF)，一種能夠抑制或中和酸性或鹼性纖維母細胞生長因子(FGF)或是肝細胞生長因子(HGF)之生成血管活性的抗體，一種能夠抑制或中和組織因子、蛋白C，或是蛋白S之凝結活性的抗體(見Esmon等人，PCT專利公開號WO 91/01753，21 Feb. 1991公開的)，一種能夠結合至HER2受體的抗體(見Hudziak等人，PCT專利公開號WO 89/06692，27 Jul. 1989公開的)，或是一或更多個慣見的治療劑譬如，舉例而言，烷化劑、葉酸拮抗劑、核酸新陳代謝之抗代謝物、抗生素、嘧啶類似物、5-氟尿嘧啶、順鉑、嘌呤核苷、胺類、胺基酸、三唑核苷，或是皮質類固醇。此等其他的製劑可以存在於投藥的組成物之內或是可以分別地投藥。並且，該抗體係適當地予以連續投藥或是組合以放射學的治療，不管是涉及到照射或是放射性物質之投藥。

[0122]本發明的抗體可以使用作為親和性純化劑。於此方法中，該等抗體係使用本技藝中所熟知的方法予以固定化於一固相上此一(such a)Sephadex樹脂或是濾紙。該經固定化的抗體與一待純化的樣本接觸，該樣本含有該抗體結合之一標靶蛋白(或其之片段)，譬如就抗-TNF α 抗體而言為TNF，以及之後該撐體係用的一種適合的溶劑予以清洗，該溶劑會實質移除除了該標靶蛋白以外之樣本內全部的材料，該標靶蛋白係結合至該經固定化的抗體。最後，該撐體係用另一種適合的溶劑予以清洗，譬如甘胺酸緩衝劑，pH 5.0，其會由該抗體釋放該標靶蛋白。

[0123] 抗體亦可以有用於一標靶蛋白之診斷分析，例如，偵測其之表現於特定的細胞、組織，或是血清內。此等診斷的方法可以有用於癌症診斷。

[0124] 關於診斷應用，該抗體典型地會用一種可檢測部份予以標記。許多的標記為可得的，其等通常可以分組成下列範疇：

(a) 放射性同位素，譬如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S 。抗體可以使用舉例而言說明於 *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen 等人，Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991) 之中的技術用放射性同位素予以標記以及放射性可以使用閃爍計數予以測量。

[0125] (b) 螢光標記，譬如稀土元素螯合物(銻螯合物)或螢光黃及其之衍生物、玫瑰紅及其之衍生物、丹磺醯(dansyl)、麗絲胺(Lissamine)、藻紅素及德克薩斯紅(Texas Red)為可得的。螢光標記可以使用舉例而言揭示於 *Current Protocols in Immunology*，在前，之中的技術來結合至抗體。螢光可以使用一種螢光計予以定量。

[0126] (c) 各種各樣的酵素-受質標記為可得的以及 U.S. 專利號碼 4,275,149 提供此等的一些之評論。酵素一般催化顯色受質之化學轉化，其可以使用各種各樣的技術予以測量。舉例而言，酵素可以催化一受質之顏色變化，其可以分光光度地測量。任擇地，酵素可以改變受質之螢光或化學發光。用於定量螢光上變化之技術為以上所說明的。化

學發光受質藉由一化學反應而變為電子激發的以及可以接而發光，其可以予以測量(使用一種化學發光儀(chemiluminometer)，舉例而言)或捐獻能量給一螢光接受體。酵素標記之實例包括螢光素酶(例如，螢火蟲螢光素酶與細菌的螢光素酶；U.S.專利號碼4,737,456)、螢光素、2,3-二氫吡啶二酮、蘋果酸去氫酶、尿素酶、過氧化酶，譬如辣根過氧化酶(HRPO)、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、醣氧化酶(例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶，以及葡萄糖-6-磷酸去氫酶)、雜環氧化酶(譬如尿酸酶與黃嘌呤氧化酶)、乳過氧化酶、微過氧化酶，及類似物。結合酵素至抗體之技術係說明於O'Sullivan等人，Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)之中。酵素-受質組合之實例包括，舉例而言：

(i) 辣根過氧化酶(HRPO)伴隨過氧化氫酶作為一受質，其中過氧化氫酶氧化一染料前驅物(例如，鄰苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基聯苯胺鹽酸鹽(TMB))；

(ii) 鹼性磷酸酶(AP)伴隨對硝苯磷酸作為顯色受質；以及

(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)伴隨一顯色受質(例如，P-硝苯- β -D-半乳糖苷酶)或螢光受質4-甲基繖形基(methylumbelliferyl)- β -D-半乳糖苷酶。

[0127]許多的其他的酵素-受質組合對於本技藝中具有技術者為可得的。關於此等之一般評論，見U.S.專利號碼4,275,149與4,318,980。有時，標記係間接地結合抗體。熟悉此藝者會知道達到此之各種各樣的技術。舉例而言，抗體可以結合生物素以及以上提及的3個廣泛的範疇之標記的任一者可以結合抗生物素蛋白，或是反之亦然。生物素選擇性地結合抗生物素蛋白以及因而，該標記可以以此間接的方式結合該抗體。任擇地，要達到該標記與該抗體之間接的結合，該抗體係與一種小的半抗原(例如，長葉毛地黃苷)結合以及以上提及的不同類型的標記之一者係與一種抗半抗原抗體(例如，抗長葉毛地黃苷抗體)結合。因而，可以達成該標記與該抗體之間接的結合。

[0128]於某些具體例中，一種抗體不需要標記，以及其之出現可以使用一種經標記的抗體予以偵測，該經標記的抗體結合一標靶抗體。

[0129]本發明的抗體可以使用於任何已知的分析方法中，譬如競爭性結合分析、直接的和間接的夾心式測定法，以及免疫沉澱分析。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0130]競爭性結合分析依賴於一經標記的標準品與測試樣本分析物競爭結合一有限量的抗體之能力。舉例而言，測試樣本中TNF蛋白的量係與變成為結合至抗體的標準品的量成反比。為了促進判定變成為結合的標準品的量，該等抗體一般在競爭之前或是在競爭之後為不溶解

的，以便結合至抗體的標準品和分析物可以與仍是未結合的標準品和分析物便利地分隔開。

[0131]夾心式測定法涉及到使用2個抗體，各個能夠結合至待偵測的蛋白之不同的免疫性部份，或是抗原決定區。於一種夾心式測定法中，測試樣本分析物係藉由一種第一抗體來結合，該第一抗體係固定化於一種固態撐體上，以及之後一種第二抗體結合該分析物，因而形成一種不可溶的3部分複合物。見，例如，U.S.專利號碼4,376,110。第二抗體其自身可以用一種可檢測部份予以標記(直接的夾心式測定法)或是可以使用一種用一可檢測部份予以標記之抗-免疫球蛋白抗體予以測量(間接的夾心式測定法)。舉例而言，一類的夾心式測定法為一種ELISA分析，於該事例中可檢測部份為一酵素。

[0132]關於免疫組織化學，組織樣本，譬如一腫瘤的樣本，可以為新鮮的或冰凍的或是可以被埋入石蠟內以及用一防腐劑，譬如福馬林，舉例而言，予以固定。

[0133]抗體亦可以使用於活體內腫瘤診斷分析。一般而言，抗體係用一種放射性核種(譬如， ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S)予以標記以便腫瘤可以使用免疫閃爍攝影術(immunoscintigraphy)予以定位。

[0134]本發明的一抗體可以提供於一種套組之中，一種按預定量之包裝組合的試劑伴隨執行診斷分析的指南。抗體係用一種酵素予以標記的情況中，套組會包括酵素所需要的受質和輔因子(例如，提供可檢測發色團或螢光團之一

受質前驅物)。此外，可以包括其他的添加劑，譬如安定劑、緩衝劑(例如，一種封阻緩衝劑或溶解緩衝劑)及類似物。各種各樣的試劑之相對量可以廣泛地變化以提供實質上最佳化該分析之靈敏度的溶液內之試劑濃度。尤其，試劑可以提供為乾的粉末，通常冷凍乾燥的，其包括在溶解的時候會提供具有適當的濃度之一試劑溶液之賦形劑。

[0135]本發明進一步提供了藥學配方，其等包含一或更多個本發明的抗體用於治療目的。於一具體例中，本發明提供了用於TNF媒介的疾病之治療的抗-TNF抗體。

[0136]術語“藥學配方”係提及製劑，其等係以此形式以便容許抗體的生物活性為明確有效的，以及其等不含有對於會投藥該藥學配方之個體為有毒的之額外的組份。“藥學上可接受的”賦形劑(媒介物、添加劑)為可以合理地投藥至一個個體哺乳動物以提供所使用之活性成分的有效劑量之該等。

[0137]一種“穩定的”配方為一者，其中其內的抗體在儲存中實質保持其之物理的穩定性及/或化學的穩定性及/或生物活性。用於測量蛋白穩定性之各種各樣的分析技術係本技藝中可得的以及評論於，舉例而言Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)之中。穩定性可以測量於選擇的溫度下歷時一段選擇的時間期間。較佳地，藥學配方於室溫下(大約30°C)或於40°C歷時至少1個月為穩定的及/

或於大約2-8℃歷時至少1年歷時至少2年為穩定的。再者，該藥學配方較佳地在該藥學配方之冷凍(至，例如，-70℃)及解凍後為穩定的。

[0138]一種抗體“保持其之物理的穩定性”於一藥學配方中，設若其在顏色及/或透明度的目視檢驗中，或是如同藉由UV光散射或藉由分子篩選層析術所測量，沒有顯示出聚集、沉澱及/或變性的徵象。

[0139]一種抗體的“保持其之化學的穩定性”於一藥學配方中，設若化學的穩定性在特定的時候係如此以致於認為蛋白仍然保持其之如同以下所定義的生物活性。化學的穩定性可以藉由偵測且定量蛋白之化學轉化的形式而予以評估。化學轉化可以涉及尺寸的修飾(例如，修剪)，其可以使用舉例而言，分子篩選層析術、SDS-PAGE及/或介質輔助雷射脫附離子化/飛行時間質譜術(MALDI/TOF MS)，予以評估。其他類型的化學轉化包括電荷變化(例如，由於脫醯胺作用而發生)，其可以藉由，舉例而言離子交換層析術予以評估。

[0140]一種抗體“保持其之生物活性”於一藥學配方中，設若該抗體之生物活性在特定的時候係在製備該藥學配方之時所展現出的生物活性之大約10%之內(在分析誤差之內)，如同舉例而言，以一種抗原結合分析所決定的。其他的抗體之“生物活性”分析係詳盡闡述於下面的本文中。

[0141]按“等張的”係意指有興趣的配方具有如同人類血液之實質相同的滲透壓。等張的配方一般會具有由大約

250至350 mOsm之滲透壓。等張性可以使用，舉例而言一種蒸氣壓或冰凍型滲壓計來測量。

[0142]一種“多元醇”為一種具有多羥基基團之物質，以及包括糖(還原糖與非還原糖)、糖醇和糖酸。本文中較佳的多元醇具有低於大約600 kD (例如，於由大約120至大約400 kD的範圍內)之分子量。一種“還原糖”為一者，其含有一個半縮醛基團，其能減少金屬離子或與離胺酸以及蛋白內之其他的胺基團共價反應，以及一種“非還原糖”為一者，其不具有一還原糖之此等性質。還原糖之實例為果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖以及葡萄糖。非還原糖包括蔗糖、繭蜜糖、山梨糖、松三糖以及棉子糖。甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、蘇糖醇、山梨糖醇以及甘油為糖醇之實例。至於糖酸，此等包括L-葡萄糖酸鹽以及其等之金屬鹽類。在希望該配方為冷凍-解凍穩定之處，多元醇較佳為一者，其於冷凍溫度下(例如， -20°C)不結晶以使得其去穩定化該配方中的抗體。非還原糖包括，但不限於，蔗糖與繭蜜糖。

[0143]當使用於本文中，“緩衝劑”係提及一種緩衝溶液，其藉由其之酸鹼的共軛組份之作用而抵抗pH的變化。本發明的緩衝劑具有由大約4.5至大約7.0的範圍內之pH；較佳地由大約4.8至大約6.5的範圍內之pH。會控制pH於此範圍內之緩衝劑之實例包括醋酸鹽(例如，醋酸鈉)、琥珀酸鹽(譬如琥珀酸鈉)、葡萄糖酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽以及其他的有機酸緩衝劑。在希望冷凍-解凍穩定的配方之處，緩衝

劑較佳地不是磷酸鹽。

[0144]就藥理學意義來說，在本發明的情況下，一種抗體的“治療有效量”係提及對於該抗體為有效的治療之一種障礙的預防或治療之有效的量。一種“疾病/障礙”為任何的病況，其會得益於用該抗體之治療。此包括慢性的和急性的障礙或疾病，其等包括使哺乳動物易感染正在談論的障礙之該等病理的病況。

[0145]一種“防腐劑”為一種化合物，其可以包括於配方中以實質減少在其中的細菌作用，因而促進一種多用途配方的產生，舉例而言。可能的防腐劑之實例包括氯化十八基二甲基苺基銨、氯化六羥季銨、氯化烷基二甲基苺基銨 (benzalkonium chloride) (氯化烷基二甲基苺基銨 (alkylbenzyldimethylammonium chlorides)之混合物，其中烷基為長鏈化合物)，以及陽性皂。其他類型的防腐劑包括芳醇類，譬如苯酚醇，丁基醇與苯甲基醇，對羥苺酸烷基酯，譬如對羥苺酸甲酯或對羥苺酸丙酯，兒茶酚，間苯二酚，環己醇，3-戊醇，以及間甲酚。本文中最佳的防腐劑為苯甲基醇。

[0146]本發明亦提供了藥學組成物，其等包含一或更多個抗體，連同至少一個生理上可接受的載劑或賦形劑。藥學組成物可以包含，舉例而言，的一者或多者水、緩衝劑(例如，中性的緩衝食鹽水或磷酸鹽緩衝食鹽水)、乙醇、礦物油、植物油、二甲亞砷、碳水化合物(例如，葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖)、甘露糖醇、蛋白、佐劑、多肽或胺基

酸(譬如甘胺酸)、抗氧化劑、螯合劑(譬如EDTA)或麩胱甘肽及/或防腐劑。如同以上所注意到的，其他的活性成分可以(但不必要)包括在本文中所提供的藥學組成物之內。

[0147]一載劑為一種物質，其可以在投藥至一病人之前與一種抗體結合，通常為了控制該化合物之穩定性或生物可利用性的目的。供使用於此等配方之內的載劑一般為生物可相容的，以及亦可以為生物可降解的。載劑包括，舉例而言，單價的分子或多價的分子，譬如血清白蛋白(例如，人類或牛)、卵白蛋白、胜肽、聚離胺酸以及多醣類，譬如胺基葡聚糖和聚醯胺基胺(polyamidoamine)。載劑也包括固態撐體材料，譬如珠粒和微粒，其等包含，舉例而言，聚乳酸聚甘醇酸、聚(乳酸交酯-共-乙交酯)(poly(lactide-co-glycolide))、聚丙烯酸酯、乳膠、澱粉、纖維素或葡聚糖。一載劑可以以各種各樣的方式攜帶該等化合物，包括共價結合(不是直接地就是經由一連接子基團)、非共價相互作用或摻和物。

[0148]藥學組成物可以予以配方供用於任何適合的投藥方式，包括，舉例而言，眼睛的、鼻內的、耳的、舌下的、經皮的、局部的、口腔的、鼻的、直腸的或非經口的投藥。於某些具體例中，以一適合用於口腔用途的形式之組成物為較佳的。此等形式包括，舉例而言，藥片、錠劑、喉錠、菱形錠劑(lozenge)、含水的或含油的懸浮液、可分散的粉末或顆粒、乳劑、硬或軟膠囊，或是糖漿劑或酏劑。在再其他的具體例之內，本文中所提供的組成物可以配方

爲一種冷凍乾燥劑(lyophilizate)。術語非經口的當使用於本文中包括皮下的、皮內的、血管內的(例如，靜脈內的)、肌肉內的、脊髓內的、顱內的、椎管內及腹膜內的注射，以及任何相似的注射或注入技術。

[0149]於某些具體例中，本發明的抗體可以藉由眼睛的組織注射而直接地遞送至眼睛，譬如眼周的、結膜的、結膜下(subtenon)、前房內(intracameral)、玻璃體內(intravitreal)、眼內的、視網膜下的、結膜下(subconjunctival)、眼球後，或是管內的注射；藉由使用一種導管或其他的定位裝置而直接應用至眼睛，譬如一視網膜的小丸、眼內的插入物、栓劑或一種包含一多孔的、非多孔的，或凝膠狀的材料之植入物；藉由局部的眼滴劑或軟膏；或是藉由一緩慢釋放的裝置於盲囊之內或植入相鄰於鞏膜(經鞏膜的)或於鞏膜內的(鞏膜內的)或在眼睛之內。前房內的注射可以通過角膜至眼前房之內以允許該製劑到達小樑網。管內的注射可以至靜脈的收集管內排出舒萊姆氏管(Schlemm's canal)或至舒萊姆氏管之內。

[0150]關於眼的遞送，本發明的抗體可以組合以眼科學上可接受的防腐劑、共溶劑、界面活性劑、黏性增進劑、滲透增進劑、緩衝劑、氯化鈉，或是水以形成一種含水的、無菌的眼懸浮液或溶液。局部的眼部產品可以舉例而言，以多劑量形式予以包裝。因而可能需要防腐劑來防止微生物的污染在使用的整個期間。適合的防腐劑包括：氯丁醇、對羥苄酸甲酯、對羥苄酸丙酯、苯乙醇、乙二胺四乙基二

鈉 (Edetate disodium)、山梨酸、聚季銨鹽-1 (polyquaternium-1)，或是本技藝中具有技術者所知道的其他製劑。此等防腐劑典型地以由0.001至1.0% w/v的位準來使用。本發明的單元劑量組成物會是無菌的，但是典型為未防腐的。因而，此等組成物一般不會含有防腐劑。

[0151]於某些具體例中，打算局部地投藥至眼睛的組成物係予以配方為眼的滴劑或眼的軟膏，其中抗體的總量會是大約0.001至1.0% (w/w)。較佳地，TNF α 抗體的量為大約0.01至大約1.0% (w/w)。

[0152]於某些狀況中本發明的組成物會予以投藥為用於局部的投藥之溶液。基於容易配方，以及一病人藉由徐徐滴入1至2滴溶液於罹病的眼睛中而容易投藥此等組成物之能力，含水的溶液一般為較佳的。然而，該等組成物亦可以為懸浮液、黏性的或半黏性的凝膠，或是其他類型的固態或半固態的組成物。

[0153]打算用於口腔用途之組成物可以依據本技藝所知道之製造藥學組成物之任何的方法予以製備以及可以含有一或更多個製劑，譬如增甜劑、調味劑、著色劑，以及防腐劑俾以提供有吸引力且美味的製劑。錠劑含有該活性成分攪合以生理上可接受的賦形劑，其等係適合用於製造錠劑。此等賦形劑包括，舉例而言，惰性的稀釋劑(例如，碳酸鈣、碳酸鈉、乳糖、磷酸鈣或磷酸鈉)、製粒劑和破碎劑(例如，玉米澱粉或藻酸)、黏合劑(例如，澱粉、明膠或阿拉伯膠)以及潤滑劑(例如，硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石粉)。

錠劑可以為未塗覆的或其等可以藉由已知的技術予以塗覆來延遲胃腸道中的破碎和吸收以及藉此提供持續的作用於更久的期間內。舉例而言，可以使用一種時間延遲的材料，譬如甘油單硬脂酸酯(glyceryl monostearate)或甘油二硬脂酸酯。

[0154]用於口腔用途之配方亦可以呈現為硬明膠膠囊，其中該活性成分混合以一種惰性的固態的稀釋劑(例如，碳酸鈣、磷酸鈣或高嶺土)，或是為軟的明膠膠囊，其中該活性成分混合以水或油介質(例如，花生油、液態石蠟或橄欖油)。含水的懸浮液含有該抗體攪合以適合用於製造含水的懸浮液之賦形劑。此等賦形劑包括懸浮劑(例如，羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙甲基纖維素、藻酸鈉、聚乙炔吡咯啉酮(polyvinylpyrrolidone)、黃蓍膠與阿拉伯膠)；以及分散劑或濕潤劑(例如，天然存在的磷脂質，譬如卵磷脂，烯化氧(alkylene oxide)與脂肪酸的縮合產物，譬如聚氧乙炔硬脂酸酯，環氧乙烷與長鏈脂族醇的縮合產物，譬如十七基乙炔氧鯨蠟醇(heptadecaethyleneoxycetanol)，環氧乙烷和由脂肪酸與己糖醇所衍生的偏酯之縮合產物，譬如聚氧乙炔山梨醇單油酸酯，或是環氧乙烷和由脂肪酸與己糖醇所衍生的偏酯之縮合產物，譬如聚乙炔山梨醇酐單油酸酯(polyethylene sorbitan monooleate))。含水的懸浮液亦可以包含有一或更多個防腐劑(舉例而言對羥苯甲酸乙酯或羥苯甲酸正丙酯)、一或更多個著色劑、一或更多個調味劑，及一或更多個增甜劑(譬如蔗糖或糖精)。糖漿劑與

醑劑可以配方與增甜劑，譬如甘油、丙二醇、山梨糖醇，或蔗糖。此等配方亦可以包含有一或更多個緩和劑、防腐劑、調味劑，及/或著色劑。

[0155]含油的懸浮液可以藉由懸浮活性成分於一植物油內(例如，花生油、橄欖油、芝麻油，或是椰子油)或於一礦物油內，譬如液態石蠟，來配方。含油的懸浮液可以含有一增稠劑，譬如蜜蠟、硬石蠟，或是鯨蠟醇。可以添加增甜劑，譬如以上提出的該等，及/或調味劑來提供美味的口服製劑。此等懸浮液可以藉由添加一抗氧化劑，譬如抗壞血酸，來保藏。

[0156]適合用於藉由添加水來製備含水的懸浮液之可分散的粉末與顆粒提供該活性成分攪合以一分散劑或濕潤劑、懸浮劑和一或更多個防腐劑。適合的分散劑或濕潤劑以及懸浮劑係藉由以上已經提及的該等來舉例說明。額外的賦形劑，舉例而言增甜劑、調味劑以及著色劑，亦可以存在。

[0157]藥學組成物亦可以成為水中油型乳劑的形式。含油相可以為一植物油(例如，橄欖油或花生油)、一礦物油(例如，液態石蠟)，或是其之混合物。適合的乳化劑包括天然存在的膠(例如，阿拉伯膠或黃蓍膠)、天然存在的磷脂質(例如，黃豆、卵磷脂，和由脂肪酸與己糖醇所衍生的酯或偏酯)、酞(例如，山梨醇酞單油酸酯(sorbitan monoleate))，以及由脂肪酸與己糖醇所衍生的偏酯與環氧乙烷之縮合產物(例如，聚氧乙烯山梨醇酞單油酸酯)。一種乳劑亦可以包含

一或更多個增甜劑、及/或調味劑。

[0158]該藥學組成物可以製備為一種無菌的可注射(injectible)含水的或油質的懸浮液，其中調節劑，取決於所使用的媒介物和濃度，不是懸浮就是溶解於該媒介物內。此一組成物可以使用適合的分散劑、濕潤劑及/或懸浮劑，譬如以上提及的該等，依據已知的技藝予以配方。在可以使用的可接受的媒介物和溶劑之中為水、1,3-丁二醇、林格溶液以及等張的氯化鈉溶液。此外，無菌的、不揮發性油可以使用作為一溶劑或懸浮介質。為了此目的，可以使用任何溫和的不揮發性油，包括合成性的單甘油酯或二甘油酯。此外，脂肪酸，譬如油酸可以使用於製備可注射組成物，以及佐劑，譬如局部的麻醉劑、防腐劑及/或緩衝劑可以溶解於該媒介物內。

[0159]藥學組成物可以配方為持續釋放的配方(亦即，一種配方，譬如一膠囊，其影響投藥以後調節劑之緩慢釋放)。此等配方一般可以使用熟知技術予以製備以及藉由，舉例而言，口腔的、直腸的，或是皮下的植入予以投藥，或是藉由植入在所欲的標靶位址予以投藥。供使用於此等配方之內的載劑為生物可相容的，以及亦可以為生物可降解的；較佳地該配方提供一種相對不變的位準之調節劑釋放。一種持續釋放的配方內含有之抗體的量取決於，舉例而言，植入的位址、釋放的速率和預期的持續時間以及待治療或預防的疾病/障礙之本質。

[0160]本文中所提供的抗-TNF α 抗體可以以一量予以

投藥，該量於一體液(例如，血液、血漿、血清、CSF、滑液、淋巴液、細胞的間隙液、淚液或尿液)內達到一足以可偵測地結合至TNF且預防或抑制TNF媒介的疾病/障礙之濃度。會認為一劑量是有效的，設若其導致有益於一可識別的病人如本文中說明的。較佳的系統性劑量範圍每天每公斤的體重由大約0.1 mg至大約140 mg(每天大約0.5 mg至大約7 g每個病人)，且口服的劑量一般比靜脈內劑量更高大約5-20倍。可以與載劑的材料組合來產生一單一劑量形式之抗體的量會取決於治療的宿主以及投藥之特定模式而變化。劑量單位形式一般會含有介於由大約1 mg至大約500 mg之間的活性成分。

[0161]於某些具體例中，藥學組成物可以予以包裝用於治療對一種針對TNF的抗體有反應的病況。經包裝的藥學組成物可以包括一種容器，其容納如本文中說明之至少一個抗體的有效量和指南(例如，標記)，該指南指示出所含有的組成物要使用於治療一種在投藥於該病人體內以後對一抗體有反應的疾病/障礙。

[0162]本發明的抗體亦可以為化學修飾的。較佳的修飾基團為聚合物，舉例而言一種選擇性取代的直鏈或支鏈聚烯、聚伸烯基 (polyalkenylene)，或是聚氧烯基 (polyoxyalkylene) 聚合物或一種支鏈或未分支的多醣。此效應物基團可以增加該抗體活體內之半生期。合成性的聚合物之特定實例包括選擇性取代的直鏈或支鏈聚(乙二醇) (PEG)、聚(丙二醇)、聚(乙烯醇)或其之衍生物。特定的天

然存在的聚合物包括乳糖、直鏈澱粉、葡聚糖、肝醣或其之衍生物。聚合物的尺寸可以視需要而變化，但是一般會在由500Da至50000Da之平均分子量範圍。關於該抗體被設計來滲透入組織之處之局部的應用，聚合物之較佳的分子量是大約5000Da。聚合物的分子可以附著至該抗體，舉例而言經由一共價連接的樞紐胜肽而附著至一Fab片段重鏈之C-端末端如同WO0194585之中所說明的。關於PEG的部分之附著，參考“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications”，1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York and “Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”，1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York。

[0163]在如以上所說明之有興趣的抗體之製備之後，製備了包含有其之藥學配方。要配方的抗體尚未接受預先的冷凍乾燥以及本文中有興趣的配方為一種含水的配方。較佳地該配方中的抗體為一抗體片段，譬如一種scFv。於該配方中存在的抗體之治療有效量係藉由考慮到，舉例而言所欲的劑量體積和投藥模式予以決定。由大約0.1 mg/ml至大約50 mg/ml，較佳地由大約0.5 mg/ml至大約25 mg/ml以及最佳地由大約2 mg/ml至大約10 mg/ml為該配方中之示範的抗體濃度。

[0164]一種含水的配方係予以製備，其包含配於以上所說明的pH-緩衝溶液中之抗體。緩衝劑的濃度可以為由大約

1 mM至大約50 mM，較佳地由大約5 mM至大約30 mM，取決於，舉例而言，緩衝劑以及該配方所欲的等張性。

[0165]一種多元醇，其係作用為一種張力劑(tonicifier)且可以穩定該抗體，係包括於該配方中。於較佳具體例中，該配方不含有張力化(tonicifying)的量的鹽，譬如氯化鈉，因為此可能造成該抗體沉澱及/或可以導致在低pH時之氧化。於較佳具體例中，多元醇為一種非還原糖包括，譬如蔗糖與繭蜜糖。多元醇係以可以關於該配方之所欲的等張性而變化的量來添加至該配方。較佳地該含水的配方為等張性的，於該狀況下多元醇於該配方中之適合的濃度係於由大約1%至大約15% w/v的範圍內，較佳地，舉例而言於由大約2%至大約10% w/v的範圍內。然而，高滲壓性或低滲壓性配方亦可以是適合的。添加的多元醇的量亦可以在多元醇的分子量方面改變。舉例而言，與雙醣(譬如繭蜜糖)比較，可以添加較低量的一種單醣(例如，甘露糖醇)。

[0166]一種界面活性劑亦可以添加至該抗體配方。示範的界面活性劑包括非離子界面活性劑，譬如聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20、80等等)或泊洛沙姆(poloxamer) (例如，泊洛沙姆188)。典型地，所添加之界面活性劑的量係如此以致於其減少配方的抗體/抗體衍生物之聚集及/或使該配方中微粒的形成減到最小之及/或減少吸附作用。舉例而言，界面活性劑可以以由大約0.001%至大約0.5%的量，較佳地由大約0.005%至大約0.2%的量以及最佳地由大約0.01%至大約0.1%的量存在於該配方中。

[0167]於一具體例中，一配方含有以上識別的製劑(亦即，抗體、緩衝劑、多元醇和界面活性劑)以及實質沒有一或更多個防腐劑，譬如苯甲基醇、酚、間甲酚、氯丁醇和陽性皂(benzethonium Cl)。於另一具體例中，一防腐劑可以包括於該配方中，尤其該配方為一種多劑量配方之處。防腐劑的濃度可以於由大約0.1%至大約2%的範圍內，最佳地由大約0.5%至大約1%的範圍內。一個或更多個其他的藥學上可接受的載劑、賦形劑或安定劑，譬如於Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, Osol, A. Ed. (2006)之中說明的該等可以包括於該配方中，但有條件是其等不會不利地影響該配方所欲的特性。可接受的載劑、賦形劑或安定劑以所使用的劑量和濃度對接受者為無毒的以及包括；額外的緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑包括抗壞血酸和甲硫胺酸；螯合劑，譬如EDTA；金屬複合物(例如，Zn-蛋白複合物)；生物可降解的聚合物，譬如聚酯；及/或形成鹽的相對離子，譬如鈉。

[0168]要使用於活體內投藥的配方必須是無菌的。此係藉由過濾通過無菌的過濾膜而容易地完成，在配方的製備之前，或是在配方的製備以後。

[0169]該配方係予以投藥至需要該抗體之治療的一哺乳動物，較佳地一人類，根據已知道的方法，譬如靜脈內的投藥為一大丸藥或藉由連續的注入持續一時間期間，藉由肌肉內、腹膜內的、腦脊髓內的(intracerebrospinal)、皮下的、關節內的、滑膜內的、椎管內、口腔的、局部的，

或吸入途徑，或是本文中說明之其他的途徑。於某些具體例中，該配方係藉由靜脈內的投藥予以投藥至哺乳動物。爲了此等目的，該配方可以使用，舉例而言一種注射器或經由一種IV管來注射。

[0170] 抗體之適當的劑量(“治療有效量”)會取決於，舉例而言，待治療的病況種類，病況的嚴重性與過程疾病的嚴重性與過程，是否該抗體係爲了預防性或治療性目的而投藥，先前的療法，病人對該抗體之臨床病史及反應，所使用的抗體類型，以及主治醫師的判斷。該抗體係適當地以一次或是持續一系列的治療方式予以投藥至病人以及可以投藥至該病人於診斷向前之任何的時間。該抗體可以予以投藥作爲單獨的治療或是結合有用於治療正在談論的病況之其他的藥物或治療法。

[0171] 當作一普遍的提議，所投藥之抗體的治療有效量會是於大約0.1至大約100 mg/kg的病人體重的範圍內，不管是藉由一或更多個的投藥，且所使用之抗體之典型的範圍，舉例而言係大約0.3至大約20 mg/kg，更佳地大約0.3至大約15 mg/kg，每日投藥。然而，其他的劑量攝生法可以是有用的。此治療法之進展可容易地藉由慣用的技術予以監控。

[0172] 於某些具體例中，包含本發明的一抗TNF α 抗體之藥學組成物係予以投藥至一罹患一TNF媒介的障礙的病人。

[0173] 於本發明之另一具體例中，提供了一種物件之製

造，該物件包含一種容器，其容納本發明之含水的藥學配方以及選擇性地提供了其之用途之指南。適合的容器包括，舉例而言，瓶子、小瓶和注射器。容器可以由各種各樣的材料所形成，譬如玻璃或塑膠。一種示範的容器為一種3-20 cc單一使用的玻璃小瓶。任擇地，在一種多劑量配方方面，容器可以為3-100 cc玻璃小瓶。容器容納配方以及於該容器上的標記，或是與該容器有關連的標記，可以指示出使用的指示。物件之製造可以進一步包括從商業的立場和使用者的立場所欲的其他材料，包括其他的緩衝劑、稀釋液、濾器、針、注射器，以及有使用指南之包裝插入物。

[0174]遍及此說明書所引述之任何的專利、專利申請案，以及參考文獻的內容藉此以其等之整體內容併入以作為參考資料。

[0175]除了其他的文字要求，使用於本文中之單數的術語應該包括複數以及複數術語應該包括單數。

實施例

[0176]本揭示進一步藉由下列的實施例來闡明，其等不應該解釋為進一步的限制。遍及此申請案所引述之全部的圖示以及全部的參考文獻、專利和公開的專利申請書的內容係明確地以其等之整體內容併入至本文中作為參考資料。

[0177]遍及實施例，除另有說明外係使用下列的材料和方法。

一般的材料和方法

[0178]一般而言，本發明之實施使用，除另有指出外，化學、分子生物學、重組型DNA技術、免疫學的慣用技術(尤其，例如，抗體技術)，以及多肽的製備之標準技術。見，例如，Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow等人，C.S.H.L. Press, Pub. (1999)；以及 *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel等人，John Wiley & Sons (1992)。

熱穩定性測量

[0179]各種各樣的單鏈以及後續的分子係使用FT-IR Bio-ATR細胞於Tensor Bruker內獲得衰減全反射傅氏轉換紅外線(FTIR-ATR)光譜。使分子濃縮高至3mg/ml且予以透析過夜於4°C對PBS，pH 6.5以及收集緩衝劑順流(buffer flow through)作為空白。變性剖面圖係藉由用以5°C步進之廣泛的溫度範圍(25至95°C)予以熱挑戰(thermo challenging)該等分子而獲得。全部的光譜操控係使用OPUS軟體予以執行。主要的緩衝劑和暫時的大氣(CO₂和H₂O)背景係由該蛋白的光譜減去(subtracted)。產生的蛋白光譜接而予以基線校正以及蛋白醯胺I光譜係由預期的區域內之最寬的可分

辨峰之寬度予以決定。第二衍生物光譜係使用一種3次多項式函數及一種平滑函數而獲得醯胺I帶譜。藉由醯胺I第二衍生物分析來估計蛋白結構的變化、使用一種線性校正曲線用於起始的曲線擬合計算，假定3個較低的測量為0%的變性以及3個較高的測量為100%的變性。變性剖面圖係使用來大致估計應用波茲曼S形模型之每一個變異體之熱展開轉變(thermal unfolding transitions) (TM)的中點。

溶解度的測量

[0180]各種各樣的scFv分子之相對溶解度係在硫酸銨存在的情況下提高蛋白的聚集和沉澱之後予以測量。硫酸銨係添加至配於含水的溶液內之蛋白以出產5%增量之飽和於最終混合物鹽-蛋白內。動力的範圍內之沉澱係憑經驗來決定以及於此範圍內之飽和的間隔減少到2.5%的間隔飽和於最終混合物之內。在硫酸銨的添加之後，溫和地混合樣本以及以6000rpm離心30分鐘。上清液內剩餘的蛋白係回收各個飽和硫酸銨百分比。溶解度曲線係藉由使用NanoDropTM 1000分光光度計來測量上清液內蛋白的濃度而決定。上清液內剩餘的可溶蛋白之測量係予以正規化以及使用來大致估計應用波茲曼S形模型之每一個變異體之相對溶解度的中點。

短期穩定性測試

[0181]蛋白係於40°C下2週孵育後檢查可溶的聚集體以及降解的產物。具有10mg/ml的濃度之蛋白係予以透析過夜於4°C對PBS用廣泛範圍的pHs (3.5、4.5、5.5、6.5、7.0、

7.5及8.5)。的的 in 配於標準的緩衝劑PBS(pH 6.5)之具有相同濃度的對照蛋白係儲存於-80℃在2週的整個期間。藉由SDS-PAGE之降解帶的判定係在t=0和t=14d時間點予以實行以及可溶的聚集體系以SEC-HPLC予以評估。於40℃下2週之後剩餘的活性之判定係使用Biacore予以實行。

實施例1

抗-TNF α scFv抗體，34rFW1.4之最佳化，來減少聚集作用

[0182] 34rFW1.4抗體顯示出溶液內pH依賴性聚集作用之傾向。578rFW1.4抗體(見國際申請案WO2009155724)，其共有如34rFW1.4之相同的框架結構，沒有顯示出聚集作用的傾向。同源性模型係予以產生來識別34rFW1.4中可能的殘基，其等可以予以修飾來減少其之聚集傾向如下列。

[0183] 可變異領域序列係使用來建造34rFW1.4抗體及578rFW1.4抗體之同源性模型。爲了產生該等模型，BLAST演算法爲主的檢索係使用來分別地識別各個抗體的輕鏈(VL)與重鏈(VH)可變異領域序列之模板結構。BLOSUM80(用於較不分歧的排列之矩陣)係由於抗體中之框架區域的高守恆性而使用作爲排列的矩陣。各個鏈(VL/VH)之個別的模板係予以選擇，其顯示出對於詢問序列多於70%的同一性。

[0184] Discovery Studio 版本2.5.5 (DS 2.5.5)軟體的程式MODELER (Accelrys, Inc., San Diego, CA)係以經識別的可變異領域模板爲基礎而使用來產生100個scFv模型。參考抗體序列的排列要模型化模板結構係使用作爲輸入資料。

產生了含有全部的非氫原子之100個模型。最佳的模型結構係以PDF(機率密度函數)物理能分數(physical energy score)為基礎來選擇。VH與VL領域之相對的方位設定成配對由可變異領域模板結構對模型化的二個(VL與VH)序列具最高同源性的該者。移除該模型中之任擇的構形，添加末端，以及添加缺掉的側鏈原子。施加CHARMM力場至scFv模型且進行2000個週期之能量最小化使用一種0.01之RMS Gradient以及Generalized Born with Molecular Volume (GBMV)作為隱性溶劑模型。

[0185]實施該等抗體之各者的蛋白離子化和殘基的pK之計算。計算係使用包括在Discovery Studio版本2.5.5 (DS 2.5.5)之內的協定實施予以實行，以由Bashford與Karplus，1991，發展的理論為基礎。比較2個分子之蛋白離子化和殘基的pK之計算的結果，在側鏈的 $pK_{1/2}$ 以及各可滴定的殘基之滴定曲線方面，包括Asp、Glu、Arg、Lys、His、Tyr、Cys、the 該等抗體之N-端與C端殘基。

[0186]施加CHARMM力場至scFv模型以及於pH 7.4予以質子化，個別的殘基之滴定曲線與pKs係使用0.2的pH步進而由pH 2至pH 14的範圍予以計算。於578rFW1.4抗體的輕鏈之位置47和50處之2個守恆的Lys殘基與34rFW1.4內之該等位置處之Lys比較為不同的(見第1圖)。

較佳的取代之導入

[0187]使用Discovery Studio軟體來實施分子動力學模擬以預測會改善介於VL與VH之間的相互作用親和性之突

變，藉此避免該等領域不破碎開且形成低聚合物及或較高級的(higher order)聚集體。34rFW1.4抗體的VL/VH介面之穩定性係估計為能量術語如自由能G。A CHARMM協定因應(protocol adaptation) (也包括在DS 2.5.5之內)係使用來計算介於整個scFv異二聚複合物和個別的可變異領域之各者的能之總合之間的能量差。就隱性溶劑的方法而論使用Generalized Born with Molecular Volume 積分(GBMV)來實行計算。計算二個領域的能和複合物的能，以及輸出係決定為介於複合物和個別的領域之總合之間的能量差異，依據下列的計算： $G_{\text{介面}} = G(a) - G(b) - G(c)$ ，該處G(a)為該抗體的能，G(b)為VL的能，以及G(c)為VH的能。

[0188]精胺酸(R)係選擇作為關於位置47和50處之離胺酸(K)之一可能的殘基取代，因為R之側鏈pKa值(12.5)係比K的pKa(10.5)更高。突變體K47R和K50R係藉由在各自的位置分別地以R置換K所產生。2000個週期的能量最小化係對於在該突變附近10埃或更接近的區域之殘基予以執行以允許新的溶劑分子適應該變化。此等能量最小化循環之隱性溶劑模型為GBMV。該等突變體之預測平均 ΔG 為-94 kcal/mol。因而該等突變的貢獻係估計為4 kcal/mol，與親代抗-TNF scFv抗體相比。

實施例2

最佳化的34rFW1.4抗體之穩定性分析

[0189]K50R突變體與K47R突變體係產生於34rFW1.4抗體內(其係揭示於2009年6月25日提申之共審查國際申請

案號 PCT/CH2009/000219之中，其之內容係以其之整體藉此併入以作為參考資料)。34rFW1.4之另一個突變體，其具有額外的取代來減少其之活體內免疫原性，係依據於US專利申請案號碼12/973,968之中說明的方法來製備。特別地，第三種突變體，稱作34rFW1.4_VLK50R_DHP，含有一絲胺酸(S)於重鏈位置12處(AHo編號)，一蘇胺酸(T)於重鏈位置103處(AHo編號)，以及一蘇胺酸(T)於重鏈位置144處(AHo編號)。親代和突變體34rFW1.4抗體之穩定性研究係於如下列之加速的條件下實施。

[0190]將34rFW1.4抗體、突變體34rFW1.4_VL_K50R，以及34rFW1.4_VLK50R_DHP濃縮高至20、40和60 mg/mL於磷酸鹽緩衝食鹽水(50 mM Na₂HPO₄，150 mM NaCl，pH 6.5) 配方內以及於40°C下孵育2週。將34rFW1.4和34rFW1.4_K47R抗體濃縮高至20和60 mg/mL於磷酸鹽緩衝食鹽水(50 mM Na₂HPO₄，150 mM NaCl，pH 6.5)配方內以及於40°C下孵育2週。樣本係在14天孵育之前與14天孵育之後予以分析關於降解方面，使用還原和非還原的條件下之12.5 %十二基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)。使用分子篩選高效液相層析術(SE-HPLC)來決定在孵育期間之前和在孵育期間之後的樣本之單體含量和可溶的聚集體。單體係於一TSKgel Super SW2000管柱(TOSOH Bioscience)上由非單體種類解析以及單體蛋白之百分比係計算為單體峰的面積除以全部產物峰的總面積。34rFW1.4和34rFW1.4_VLK50R_DHP的研究結果係各自地顯示於第

2A-B、3A-B，和4A-B圖中。34rFW1.4_VL_K50R之結果係顯示於第5B、6B，和7B圖中。此等實驗展現出34rFW1.4_VLK50R_DHP與34rFW1.4比較具有減少的聚集傾向。突變體34rFW1.4_K47R亦也展現出此一減少，如第8B和9B圖中顯示的。

[0191]此外，比較34rFW1.4和34rFW1.4_VLK50R_DHP抗體之熱穩定性和結合的親和性。結果展現出做出要產生34rFW1.4_VLK50R_DHP抗體的突變不會影響穩定性或結合活性，與親代34rFW1.4抗體相比。

均等物

[0192]本發明之許多的修飾和任擇的具體例鑒於前述的說明對於本技藝中具有技術者會是明顯的。因此，此說明要被解釋為僅僅作例證以及為了教示本技藝中具有技術者進行本發明之最好的模式的目的。結構的細節可以實質上變化而不背離本發明的精神，以及達到附隨的申請專利範圍之範疇之內的全部的修飾之排他的用途係予以保留。意思是，本發明僅僅限制於附隨的申請專利範圍以及可適用的法律條例所要求的程度。

[0193]於此申請案中引述的全部的文獻和相似的材料，包括，專利、專利申請案、文章、書籍、論文、專題論文、網頁、圖示及/或附錄，不論此等文獻的格式和相似的材料，係以其等之整體內容明確併入以作為參考資料。於併入的文獻和相似的材料之一者或多者與此申請案不同或是與此申請案抵觸的事件中，包括所定義的術語、術語

用法、所說明的技術，或類似物，此申請案會支配。

[0194]使用於本文中之節標題係僅僅爲了組織上的目的以及無論如何不解釋爲限制所說明的主題。

[0195]雖然本發明已經結合各種各樣的具體例和實施例予以說明，但不打算本教示爲限制於此等具體例或實施例。相反地，本發明包含各種各樣的選擇方案、修飾，以及均等物，如同熟悉此藝者會了解到的。

[0196]申請專利範圍不應該理解爲限制於所說明的順序或元件除非聲明該效應。應該了解到可以做出形式和細節上之各種各樣的變化但不背離附隨的申請專利範圍之範疇。因而，達到下列的申請專利範圍和其之均等物的範疇和精神之內之所有的具體例爲所主張的。

【符號說明】

(無)

序 列 表

- <110> ESBA 科技, 愛爾康生物醫學研究單位有限責任公司
波雷斯 里歐納度
尤奇 大衛
- <120> 穩定且可溶的抗體
- <130> 3921 US
- <160> 18
- <170> PatentIn 版本 3.4
- <210> 1
- <211> 231
- <212> PRT
- <213> 人造的
- <220>
- <223> 合成肽
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (24) .. (73)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (89) .. (138)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (171) .. (220)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <400> 1

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80
Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 2
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 232
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (26)..(75)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (90)..(139)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (172)..(221)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
130 135 140

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230

- <210> 4
- <211> 232
- <212> PRT
- <213> 人造的
- <220>
- <223> 合成肽
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (26)..(75)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (90)..(139)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (172)..(221)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230

<210> 5
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

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

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

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

Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr Ala Asn
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<400> 6
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 8
<211> 483
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

•
•
•
•

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24) .. (73)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89) .. (138)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171) .. (220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (277) .. (326)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (341) .. (390)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (423) .. (483)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 8
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
260 265 270

Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

- <210> 9
- <211> 483
- <212> PRT
- <213> 人造的
- <220>
- <223> 合成肽
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (24)..(73)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <220>
- <221> 其他特徵
- <222> (89)..(138)
- <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸
- <220>
- <221> 其他特徵

<222> (171) .. (220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (277) .. (326)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (341) .. (390)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (423) .. (483)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 9

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Gly	Gln	Gly	
	210						215					220				
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	
				245					250					255		
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	
			260					265					270			
Cys	Thr	Val	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
	275						280						285			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
	290						295					300				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
305						310					315				320	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				325					330					335		
Glu	Trp	Val	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			340					345					350			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
		355					360					365				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
	370					375					380					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	
385					390					395					400	
Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	
				405					410						415	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			420					425					430			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
		435					440					445				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
	450					455					460					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
465					470					475					480	
Val	Ser	Ser														

<210> 10
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人造的

<220>
 <223> 合成肽

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

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

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

Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro
 180 185 190

Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr
 195 200 205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
 225 230 235 240

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 11
<211> 231
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24) .. (73)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89) .. (138)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171) .. (220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 11

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 12
<211> 231
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24)..(73)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89)..(138)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171)..(220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 12

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 13
<211> 231
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24) .. (73)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89) .. (138)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171) .. (220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 13

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 483
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24) .. (73)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89) .. (138)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171) .. (220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (277) .. (326)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (341) .. (390)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (423) .. (483)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 15

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	65	70	75	80
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	85	90	95	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	100	105	110	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	115	120	125	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	130	135	140	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	145	150	155	160
Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	165	170	175	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	180	185	190	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	195	200	205	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Gly	Gln	Gly	210	215	220	
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	225	230	235	240
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	245	250	255	
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	260	265	270	
Cys	Thr	Ala	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	275	280	285	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	290	295	300	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	305	310	315	320
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	325	330	335	

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 16
<211> 483
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (24)..(73)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (89)..(138)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (171)..(220)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
<221> 其他特徵
<222> (277)..(326)
<223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>

<221> 其他特徵
 <222> (341) .. (390)
 <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (423) .. (483)
 <223> X 可為任何天然存在的胺基酸。 可以出現一個且高至 50 個胺基酸

<400> 16

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Thr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20				25						30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		35				40						45			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	50					55					60				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly
65					70					75					80
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85					90					95	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			100					105					110		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		115				120					125				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
	130					135					140				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
145					150					155					160
Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				165					170					175	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			180					185					190		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		195					200					205			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Gly	Gln	Gly
	210					215					220				
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
260 265 270

Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 17
<211> 253
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成肽

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

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

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

Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro
180 185 190

Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
225 230 235 240

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 18

<211> 253

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 合成肽

<400> 18

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	20	25	30	
Ile	Trp	Met	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	35	40	45	
Leu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	65	70	75	80
Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gly	Asn	Phe	Asn	Thr	85	90	95	
Gly	Asp	Arg	Tyr	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	100	105	110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	115	120	125	
Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	130	135	140	
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	145	150	155	160
Ile	Ser	Arg	Ser	Tyr	Trp	Ile	Cys	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	165	170	175	
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Cys	Ile	Tyr	Gly	Asp	Asn	Asp	Ile	Thr	Pro	180	185	190	
Leu	Tyr	Ala	Asn	Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	195	200	205	
Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	210	215	220	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Ala	Tyr	225	230	235	240
Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	245	250					

發明摘要

I652068

※ 申請案號：104135587(由100138294分割)

※ 申請日：100/10/21

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

穩定且可溶的抗體/STABLE AND SOLUBLE ANTIBODIES

【中文】

本發明提供了經修飾來減少聚集傾向之抗體，以及產生此等抗體的方法。本發明亦提供了對TNF專一之特別穩定且可溶的scFv抗體和Fab片段，其等包含專一性輕鏈與重鏈序列，其等係在穩定性、溶解度、TNF之活體外和活體內結合，以及低的免疫原性方面予以最佳化。也揭示了本發明的核酸、用於重組型抗體之表現的載體和宿主細胞，用於單離其等之方法以及該等抗體於醫學之用途。

【英文】

The invention provides antibodies that are modified to reduce aggregation propensity, and methods of producing such antibodies. The present invention also provides particularly stable and soluble scFv antibodies and Fab fragments specific for TNF, which comprise specific light chain and heavy chain sequences that are optimized for stability, solubility, in vitro and in vivo binding of TNF, and low immunogenicity. The nucleic acids, vectors and host cells for expression of the recombinant antibodies of the invention, methods for isolating them and the use of said antibodies in medicine are also disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

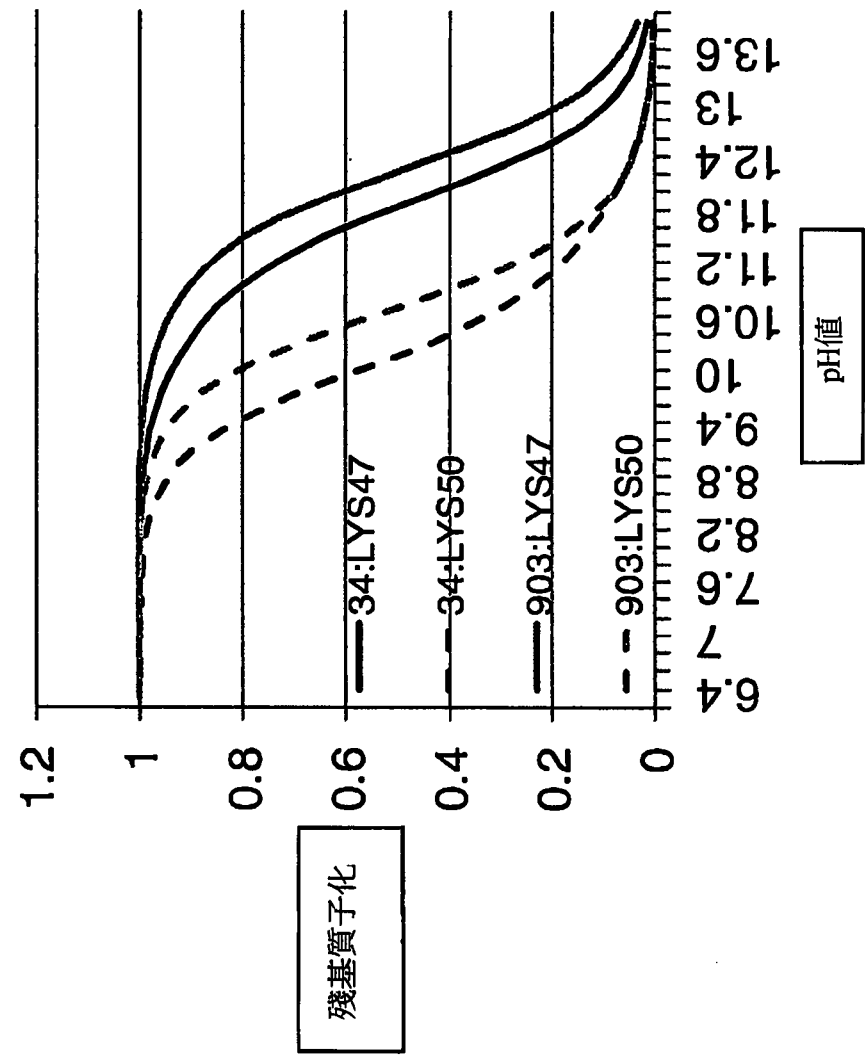
【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

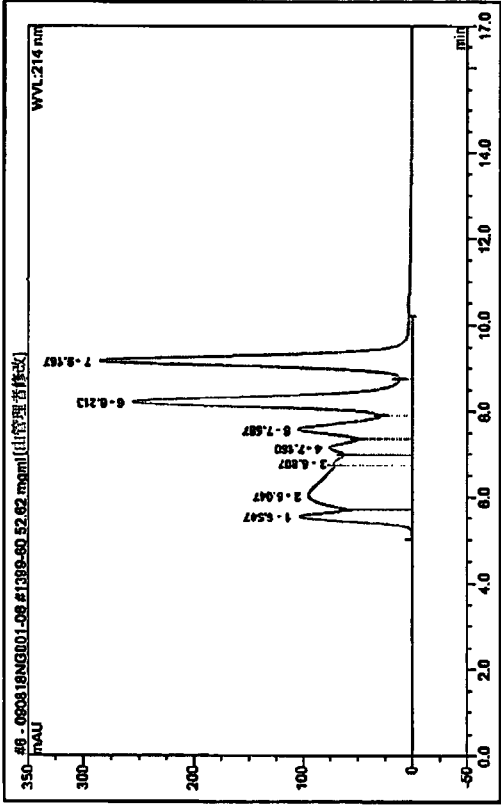
(無)

1 / 9



第1圖

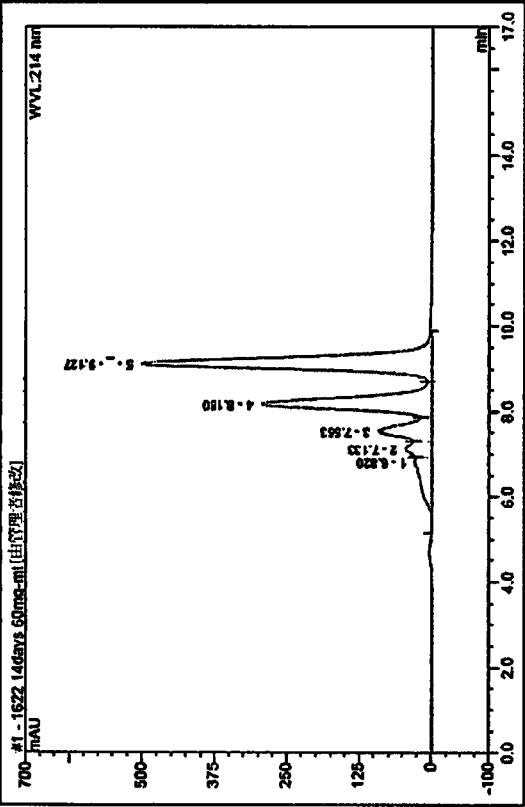
2 / 9
34rFW1.4



No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰寬度 min	面積 mAU*min	Rel. 面積 %	conc. 214nm mg/ml	inj.Vol. ul
1	5.55	n.a.	0.50	28.489	7.89	5.222	0.1
2	6.05	n.a.	2.83	85.058	23.57	15.591	0.1
3	6.81	n.a.	6.78	17.860	4.95	3.274	0.1
4	7.16	n.a.	1.05	24.529	6.80	4.486	0.1
5	7.59	n.a.	0.60	38.597	10.14	6.708	0.1
6	8.21	n.a.	0.48	82.137	22.76	15.056	0.1
7	9.17	n.a.	0.44	86.245	23.90	15.809	0.1
			12.682	360.914	100.00	66.156	

第2A圖

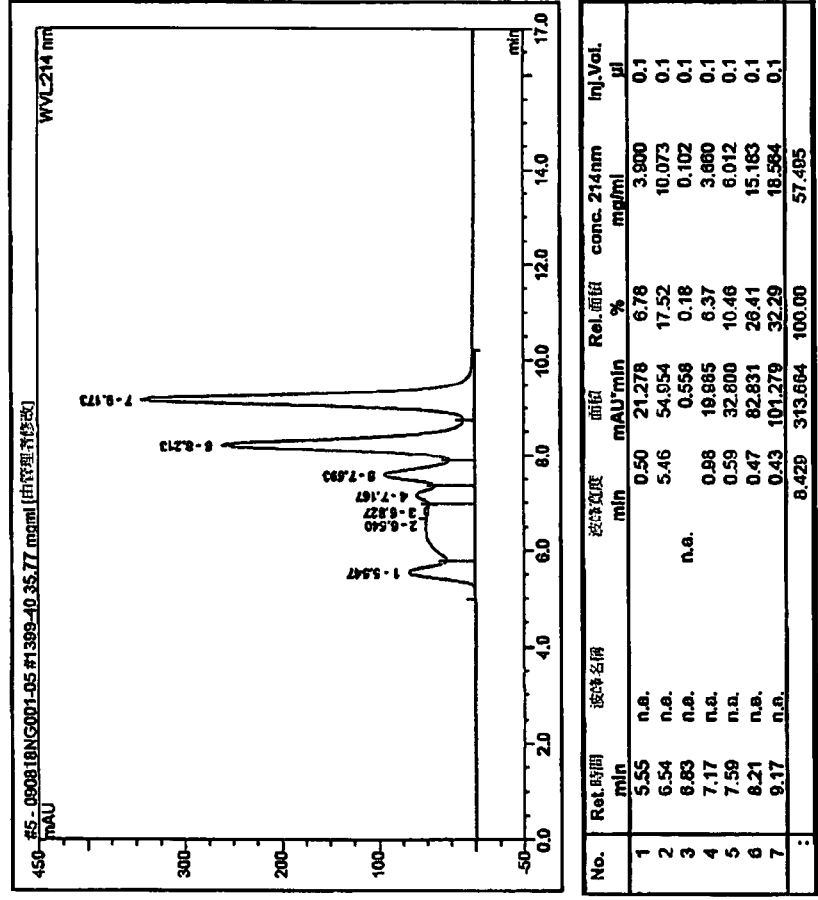
2 / 9
34rFW1.4_VLK50R_DHP



No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰寬度 min	面積 mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.面積 %
1	6.82	n.a.	2.02	22.251	5.076	7.09
2	7.13	n.a.	0.77	14.333	3.270	4.57
3	7.55	n.a.	0.54	30.410	6.937	9.70
4	8.18	n.a.	0.49	93.408	21.309	29.78
5	9.13		0.48	153.232	34.956	48.86
			4.298	313.635	71.548	

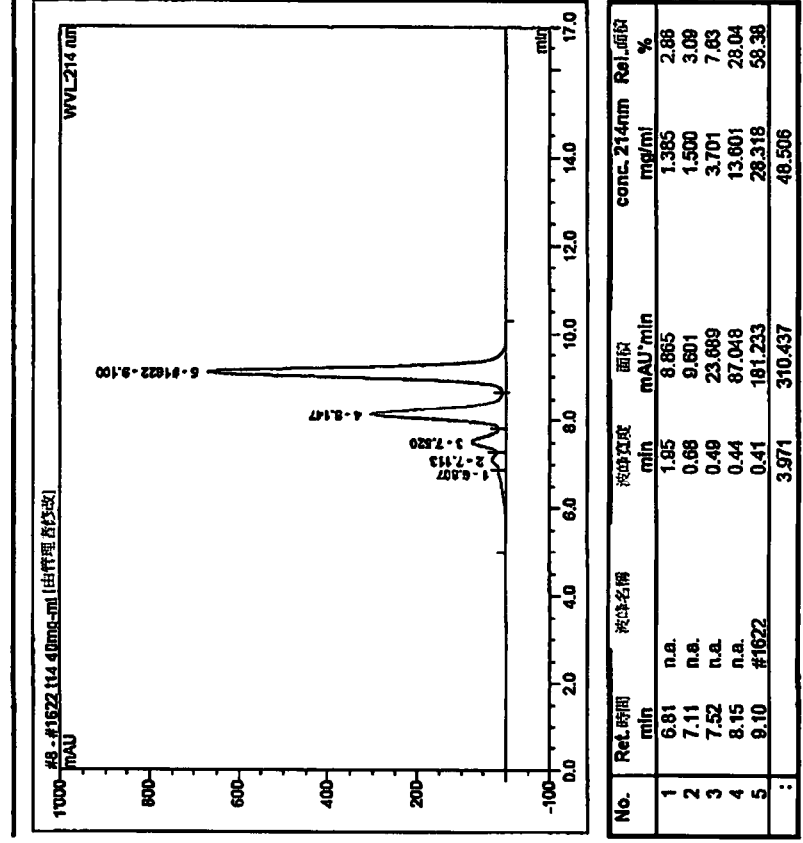
第2B圖

3 / 9
34rFW1.4



第3A圖

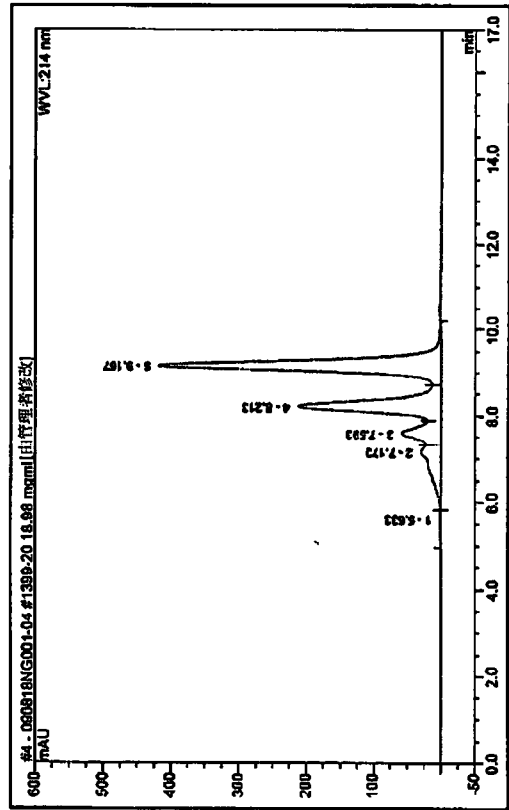
3 / 9
34rFW1.4_VLK50R_DHP



第3B圖

4 / 9

34rFW1.4

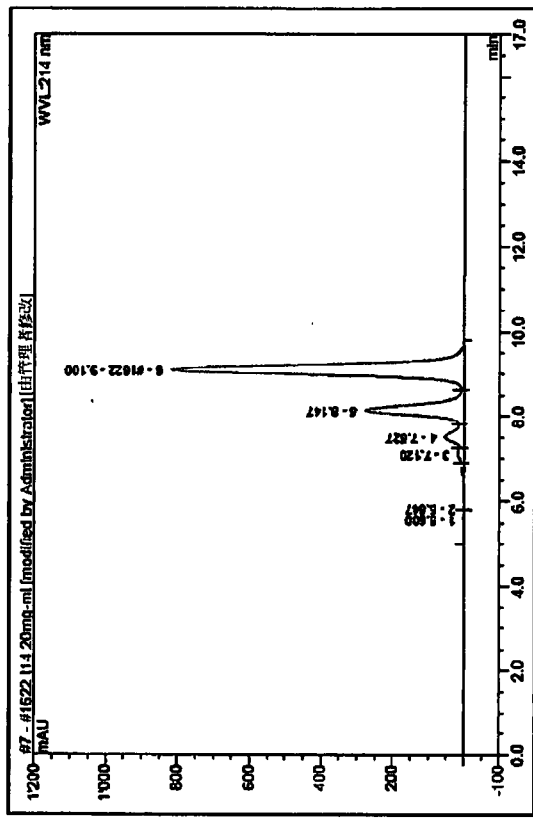


第4A圖

No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰寬度 min	面積 mAU*min	Rel.面積 %	conc. 214nm mg/ml	Inj.Vol. ul
1	5.03	n.a.	0.62	0.611	0.26	0.056	0.2
2	7.17	n.a.	0.95	21.021	9.02	1.927	0.2
3	7.59	n.a.	0.60	21.285	9.13	1.949	0.2
4	8.21	n.a.	0.47	67.889	28.14	6.222	0.2
5	9.17	n.a.	0.44	122.204	52.45	11.200	0.2
:			3.076	232.991	100.00	21.354	

4 / 9

34rFW1.4_VLK50R_DHP

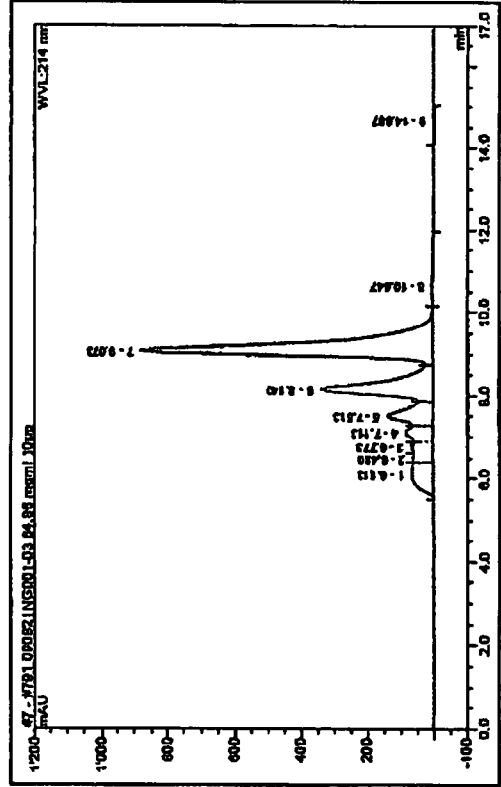


第4B圖

No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰寬度 min	面積 mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.面積 %
1	5.60	n.a.	0.61	0.280	0.024	0.09
2	5.85	n.a.	n.a.	3.142	0.274	0.96
3	7.12	n.a.	0.72	5.116	0.446	1.57
4	7.53	n.a.	0.50	17.058	1.488	5.24
5	8.15	n.a.	0.44	78.772	6.959	24.49
6	8.10	#1622	0.41	220.374	19.225	67.65
:			2.676	325.743	28.417	

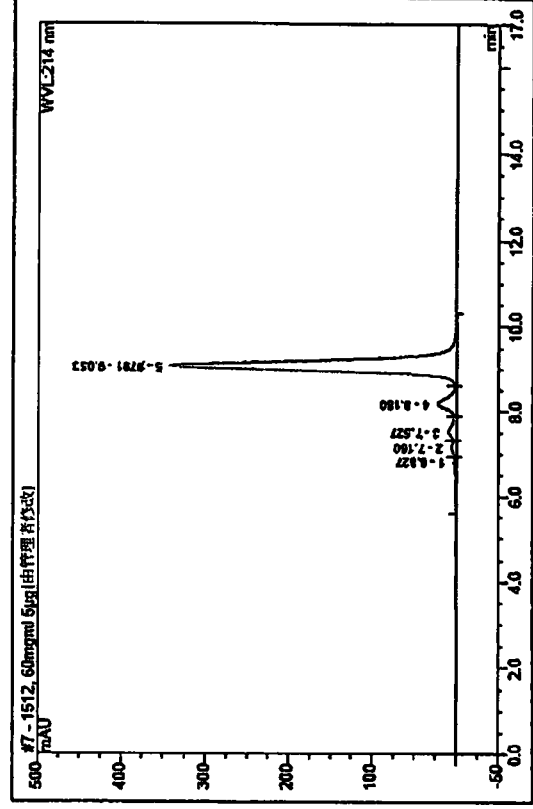
34rFW1.4

34rFW1.4_K50R



No.	Ret. 時間 min	波峰名稱	峰高 mAU	面積 mAU*min	Rel. 面積 %	conc. 214nm mg/ml	Inj. Vol. μl
1	6.11	n.a.	64.631	42.111	7.20	4.985	0.2
2	6.46	n.a.	62.227	31.054	5.31	3.735	0.2
3	6.77	n.a.	7.663	1.138	0.19	0.355	0.2
4	7.11	n.a.	83.912	27.230	4.68	3.303	0.2
5	7.51	n.a.	135.977	51.875	8.84	8.085	0.2
6	8.14	n.a.	337.621	125.727	21.60	14.432	0.2
7	8.97	n.a.	878.224	303.391	51.88	34.489	0.2
8	10.65	n.a.	3.004	2.353	0.40	0.492	0.2
9	14.69	n.a.	0.144	0.065	0.01	0.234	0.2

第5A圖



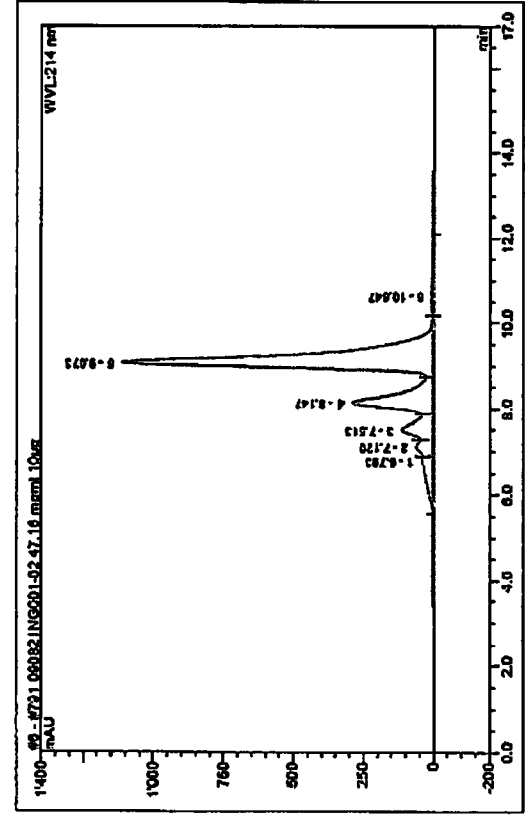
No.	Ret. 時間 min	波峰名稱	峰高 mAU	面積 mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel. 面積 %
1	8.83	n.a.	1.17	1.632	0.781	1.50
2	7.16	n.a.	0.73	1.580	0.782	1.46
3	7.53	n.a.	0.68	3.369	1.169	3.09
4	8.18	n.a.	0.48	7.137	1.988	6.54
5	9.05	#791	0.42	95.400	21.186	87.42
:			3.388	109.128	25.917	

第5B圖

6 / 9

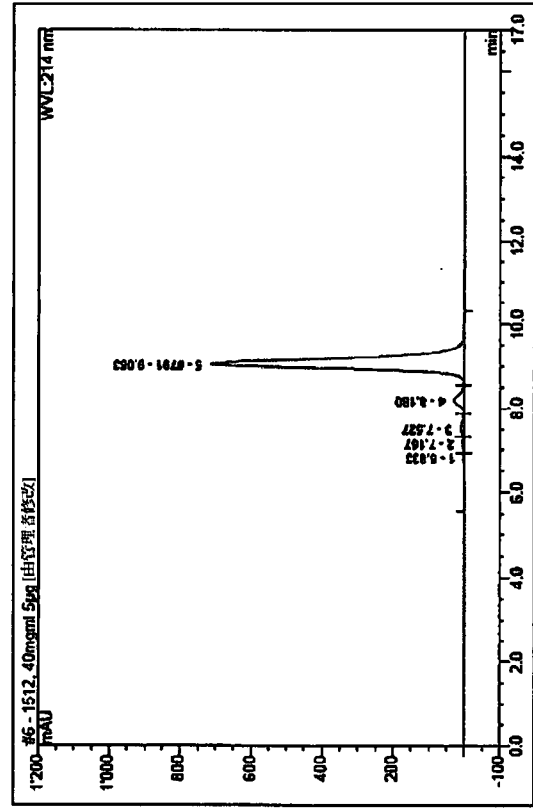
34rFW1.4

K50R



No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰強度 mAU	面積 mAU*min	Rel.面積 %	conc. 214nm mg/ml	Inj.Vol. μl
1	6.79	n.a.	41.657	29.591	4.94	2.592	0.2
2	7.12	n.a.	61.900	20.143	3.36	1.818	0.2
3	7.51	n.o.	112.576	44.283	7.39	3.800	0.2
4	8.15	n.a.	291.178	110.556	18.45	9.239	0.2
5	9.07	n.a.	1110.854	368.532	64.84	32.054	0.2
6	10.55	n.a.	6.065	6.153	1.03	0.670	0.2

第6A圖

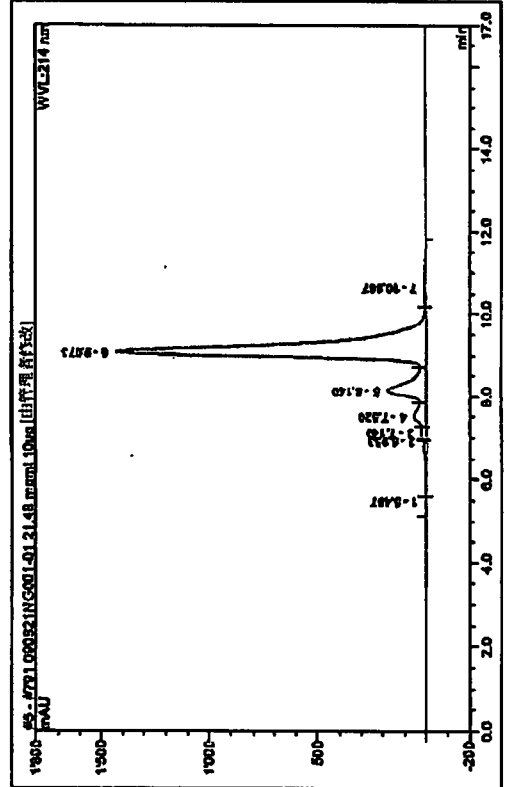


No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰強度 mAU	面積 mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.面積 %
1	6.83	n.a.	1.23	1.405	0.475	0.65
2	7.17	n.a.	0.76	1.878	0.541	0.87
3	7.53	n.a.	0.63	4.500	0.908	2.08
4	8.18	n.a.	0.49	9.943	1.663	4.60
5	9.05	#791	0.42	198.228	27.873	91.79
			3.538	215.954	31.457	

第6B圖

7/9

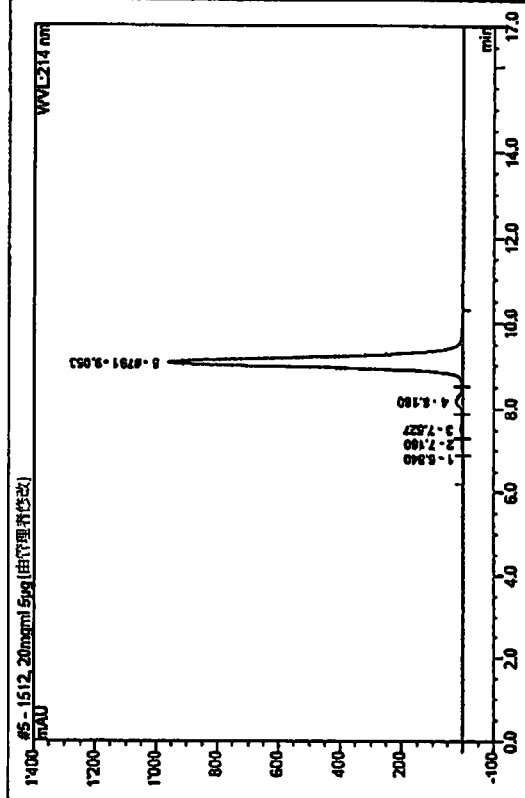
34rFW1.4



No.	Ret.時間 min	峰峰名稱	峰峰高度 mAU	面積 mAU*min	Rel.面積 %	conc. 214nm mg/ml	inj.Vol μl
1	5.49	n.a.	0.189	0.051	0.01	0.077	0.5
2	6.95	n.a.	12.394	5.352	0.88	0.275	0.5
3	7.14	n.a.	22.368	6.197	1.02	0.307	0.5
4	7.52	n.a.	55.428	22.875	3.72	0.924	0.5
5	8.14	n.a.	177.856	89.849	11.41	2.681	0.5
6	8.07	n.a.	1428.809	498.873	81.72	18.735	0.5
7	10.87	n.a.	7.947	7.825	1.25	0.360	0.5

第7A圖

34rFW1.4_K50R

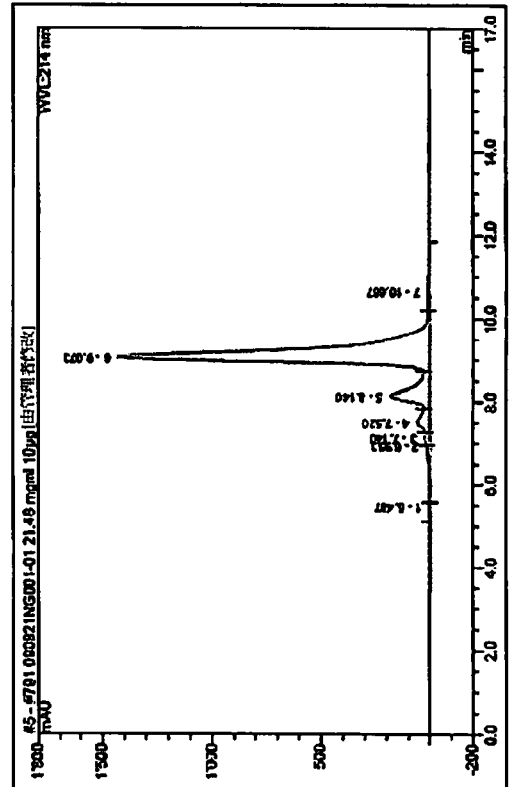


No.	Ret.時間 min	峰峰名稱	峰峰高度 mAU	面積 mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.面積 %
1	6.84	n.a.	1.29	0.333	0.183	0.12
2	7.18	n.a.	0.79	0.949	0.206	0.34
3	7.53	n.a.	0.73	2.045	0.345	1.08
4	8.18	n.a.	0.50	7.617	0.870	2.75
5	9.05	#781	0.42	265.515	18.619	95.73
..			3.734	277.358	20.002	

第7B圖

9 / 9

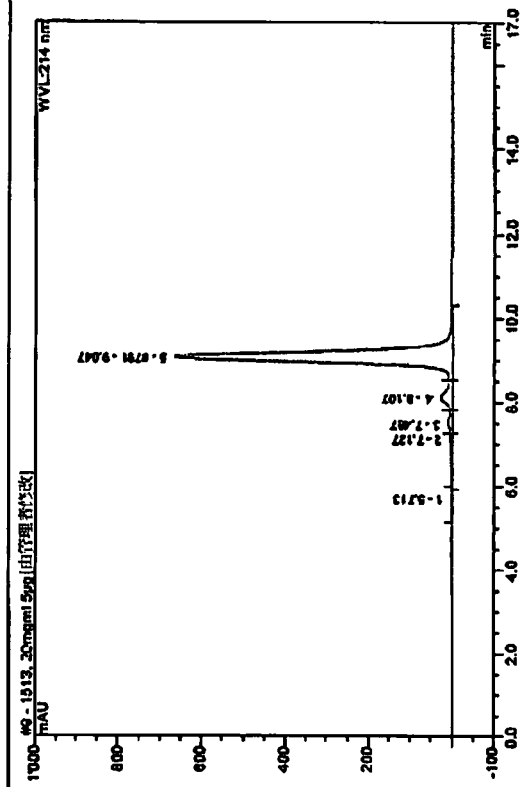
34rFW1.4



No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰高度 mAU	面積 mAU*min	Rel.面積 %	conc. 214nm mg/ml	Inj.Vol. µl
1	5.49	n.a.	0.189	0.051	0.01	0.077	0.5
2	6.89	n.a.	12.364	6.352	0.88	0.275	0.5
3	7.14	n.a.	22.368	6.197	1.02	0.307	0.5
4	7.62	n.a.	59.428	22.876	3.72	0.924	0.5
5	8.14	n.a.	177.858	89.848	11.41	2.881	0.5
6	9.07	n.a.	1429.809	488.673	61.72	18.735	0.5
7	10.67	n.a.	7.047	7.826	1.26	0.360	0.5

第9A圖

34rFW1.4_K47R



No.	Ret.時間 min	波峰名稱	波峰高度 min	面積 mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.面積 %
1	5.71	n.a.	0.40	0.061	0.144	0.03
2	7.13	n.a.	1.04	1.840	0.288	0.91
3	7.49	n.a.	0.71	3.539	0.396	1.75
4	8.11	n.a.	0.51	9.839	0.824	4.88
5	9.05	#791	0.43	187.050	13.158	92.45
			3.085	202.330	14.780	

第9B圖

申請專利範圍

1. 一種減少一抗體之聚集傾向的方法，該方法包含於該抗體之可變異輕鏈(VL)與可變異重鏈(VH)的介面內導入一個或更多個胺基酸取代，其中該一或更多個取代位於選擇來降低該 VL 與該 VH 之間的自由能達至少 0.5 kcal/mol 之殘基位置，藉此減少該抗體相較於一親代抗體之聚集傾向，其中修飾包含一位於該可變異輕鏈之 AHo 位置 50 處之取代。
2. 如請求項 1 之方法，其中該抗體為一個 Fab、Fab'、一個 F(ab)'₂、單鏈 Fv(scFv)、一個 Fv 片段、一個雙抗體(a diabody)、一個單鏈雙抗體、一串聯抗體(a tandem antibody)或一線狀的抗體(a linear antibody)。
3. 如請求項 1 之方法，其中該抗體之可變異輕鏈的序列與序列辨識編號：1 的序列有至少 65% 的同一性。
4. 如請求項 3 之方法，其中該取代為一位於該可變異輕鏈之 AHo 位置 50 處之精胺酸(R)。
5. 如請求項 4 之方法，其中於該可變異輕鏈之 AHo 位置 50 處，離胺酸(K)係由精胺酸(R)來取代。
6. 如請求項 1 之方法，其中該抗體具有一可變異輕鏈序列，其與序列辨識編號：1 的序列有至少 85% 的同一性。
7. 如請求項 1 之方法，其中該抗體具有一可變異重鏈序列，其與序列辨識編號：3 的序列或序列辨識編號：4 的序列有至少 85% 的同一性。

8. 如請求項1之方法，其進一步包含位於該可變異重鏈之
AHo位置12、103及144處之胺基酸取代。
9. 一種抗體，其係藉由如請求項1之方法所生產。