



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I873084 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：107132681

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 17 日

(51)Int. Cl. : C07K16/24 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P1/04 (2006.01)

(30)優先權：2017/09/19 歐洲專利局

17191989.7

(71)申請人：瑞士商迪洛特醫藥有限公司 (瑞士) TILLOTTS PHARMA AG (CH)
瑞士(72)發明人：費羅 艾斯特 瑪麗亞 FURRER, ESTHER MARIA (CH)；安德森，珍 堤瑞
ANDERSEN, JAN TERJE (NO)；桑迪利，英格 SANDLIE, INGER (NO)；福斯，史
蒂安 FOSS, STIAN (NO)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

期刊 Rong Deng et al., Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- α antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys. Drug Metab Dispos. 38(4): doi: 10.1124/dmd.109.031310. 2010 Apr; Epub 2010 Jan 13. 600-605.

期刊 Yik Andy Yeung et al., Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. J Immunol. 182(12): doi: 10.4049/jimmunol.0804182. 2009 Jun 15; 7663-7671.

期刊 Timothy T Kuo et al., Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. MAbs. 3(5): doi: 10.4161/mabs.3.5.16983. 2011 Sep-Oct; Epub 2011 Sep 1. 422-430.

期刊 Takuo Suzuki et al., Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. J Immunol. 184(4): doi: 10.4049/jimmunol.0903296. Epub 2010 Jan 18. 2010 Feb 15; 1968-1976.

期刊 Yasmina Noubia Abdiche et al., The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. MAbs. 7(2): doi: 10.1080/19420862.2015.1008353. 2015; 331-343.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：10 共 75 頁

(54)名稱

抗體變異體

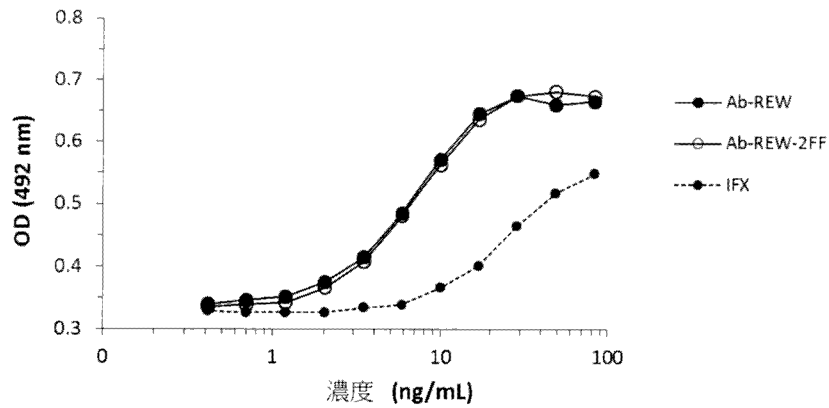
(57)摘要

本發明係有關結合 $\text{TNF}\alpha$ 並展現經修飾的 FcRn 結合性之抗體。本發明之抗體具有良好的效應功能及/或藥物動力特性。

The present invention relates to antibodies which bind to $\text{TNF}\alpha$ and exhibit modified FcRn -binding. The antibodies of the invention have good effector functions and/or pharmacokinetic properties.

指定代表圖：

圖 1



I873084

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

抗體變異體

Antibody variants

【中文】

本發明係有關結合 $\text{TNF}\alpha$ 並展現經修飾的 FcRn 結合性之抗體。本發明之抗體具有良好的效應功能及/或藥物動力特性。

【英文】

The present invention relates to antibodies which bind to $\text{TNF}\alpha$ and exhibit modified FcRn -binding. The antibodies of the invention have good effector functions and/or pharmacokinetic properties.

【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】：

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)

抗體變異體

Antibody variants

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於效應功能改變及/或藥物動力特性改變的經修飾抗體。該抗體係有益於各種病症的治療處理，尤其是發炎病狀。

【先前技術】

【0002】 在過去 20 年中，單株抗體在臨床醫學中做為治療試劑的重要性越來越大。多年來，改善抗體的努力成果集中在降低其潛在的免疫原性，致使其人源化甚至成為完全人類抗體。另一種方法旨在藉由改善抗體的效應功能以使抗體最佳化。直接的效應是由抗體的可變抗原結合區介導，而間接的效應是由恒定 Fc 區介導。改善效應功能的努力成果主要集中在調變 Fc 區。此外，期望能改善治療性抗體的血清半衰期，這可以降低所需抗體的數量，且可藉由延長治療間隔而增加對於患者的便利性。

【0003】 就治療應用而言，免疫球蛋白 G (IgG) 已成為首選類別的原因有幾個：IgG 容易純化、在儲存上相對穩定、可靜脈施用、已延長其在活體內的生物半衰期，且能夠參與許多生物效應功能，諸如啟動補體依賴型細胞毒性作用(CDC)及通過各種 Fc 受體相互作用（抗體依賴型細胞毒性作用；ADCC）補充募集效應細胞。在五個免疫球蛋白類別之中，IgG 由於與 IgG 再循環受體，新生兒 Fc 受體(FcRn)，有獨特的相互作用，因而展現出最長的生物半衰期。該受體的已知功能之一為從催化降解作用中對 IgG 進行救援。在解出的 FcRn-Fc 共結晶結構中已顯示 Fc 的相互作用是在 IgG 的

鉸鏈- C_{H2} - C_{H3} 區域發生。此相互作用是以嚴格的 pH 依賴性方式在酸性 pH 6.0-6.5 下發生於胞內體中。結合的 IgG 分子在生理 pH 7.4 下再循環回到其被釋放出的細胞表面上而進入到循環之中，而非複合的 IgG 分子則預定會進行溶酶體降解。此再循環作用為 IgG 延長半衰期的機制；調變 FcRn-IgG 的相互作用因而可特異性控制 γ 免疫球蛋白與 Fc 融合蛋白的血清半衰期。

【0004】 取決於應用情況，會期望能增加或減少 IgG 的血清滯留時間。對於治療性的應用會期望有較長半衰期的，因為將會需要較小的劑量及較少的注射。已調查了若干增加半衰期的方法，包含使用聚乙二醇 (PEG)、生成白蛋白-或 Fc-融合蛋白並增強 FcRn-IgG 的相互作用。聚乙二醇化藥物自 1990 年開始出現在臨床上，而聚乙二醇化是一個延長藥物在血液中滯留的成熟技術。由於人類血清白蛋白(HSA)也是藉 FcRn 經由 pH 依賴型的相互作用而再循環，因此也已產生了若干增強穩定性及半衰期的白蛋白融合蛋白。此外，在臨床前研究中，與白蛋白或白蛋白結合域融合的抗體片段已展現出長期的血清滯留時間。Fc 融合蛋白的生成是另一個使蛋白質或肽具有類似於完整抗體特性的策略。

【0005】 已調查的 Fc 區修飾係彙整於 Saxena (2016) *Frontiers in Immunology*, 第 7 冊, 第 580 篇文章。

【0006】 持續的需要具有改進的效應功能及/或藥物動力學之抗體。

【發明內容】

【0007】 本申請案之發明人發現，在抗體 Fc 區中某些的特定突變會急遽地提高抗體在 pH 6 下對 FcRn 的親和力，但在 pH 7.4 下仍保持低親和力。帶有所述突變的抗體係期望能改進藥物動力學特性。此外，與諸如英夫利昔單抗(infliximab, IFX)之已知抗體相比，該等抗體展現出優異的效應功能。

【0008】 因此，本發明係關於在以下項目[1]至[88]中所界定的標的：

[1] 一種抗體，其包括一 $\text{TNF}\alpha$ 結合域及一 FcRn 結合位點，該抗體在 pH 6 下對人類 FcRn 有高親和力，所述高親和力的特徵為解離平衡常數(K_D)小於 100 nM，且進一步在 pH 7.4 下對人類 FcRn 有低親和力，所述低親和力的特徵為 K_D 大於 1 μM ，其中該抗體之胺基酸序列包括胺基酸 434W。

[2] 如項目[1]之抗體，其中該抗體之胺基酸序列進一步包括胺基酸 428E 及/或胺基酸 311R。

[3] 如項目[1]或[2]之抗體，其中該抗體之胺基酸序列包括胺基酸 311R、428E 及 434W。

[4] 如前述項目中任一項之抗體，其該抗體係藉由在位置 434 用色胺酸取代天冬醯胺(N434W)而獲得，可選擇地在位置 428 用麩胺酸取代甲硫胺酸(M428E)，且可選擇地在位置 311 用精胺酸取代麩醯胺(Q311R)。

[5] 如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體係藉由在位置 428 用麩胺酸取代甲硫胺酸(M428E)而獲得。

[6] 如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體係藉由在位置 311 用精胺酸取代麩醯胺(Q311R)而獲得。

[7] 如前述項目中任一項之抗體，其包括一包括有如 SEQ ID NO:13 中所示胺基酸序列的重鏈。

[8] 如前述項目中任一項之抗體，其在 pH 6 下對於人類 FcRn 的親和力係大於英夫利昔單抗對人類 FcRn 的親和力。

[9] 如前述項目中任一項之抗體，其中所述在 pH 6 下對人類 FcRn 之高親和力的特徵為解離常數 K_D 小於 50 nM。

[10]如前述項目中任一項之抗體，其中所述在 pH 6 下對人類 FcRn 之高親和力的特徵為解離常數 K_D 小於 25 nM。

[11]如前述項目中任一項之抗體，其中所述在 pH 6 下對人類 FcRn 之高親和力的特徵為解離常數 K_D 小於 10 nM。

[12]如前述項目中任一項之抗體，其在 pH 6 下對人類 FcRn 具有親和力，其特徵為解離常數 K_D 在 1 nM 至 500 nM、或 2 nM 至 100 nM、或 3 nM 至 50 nM、或 4 nM 至 25 nM、或 5 nM 至 10 nM 之範圍內。

[13]如前述項目中任一項之抗體，其中所述高親和力，或描述高親和力特徵之 K_D 係由表面電漿子共振(SPR)所測定。

[14]如前述項目中任一項之抗體，其中所述在 pH 7.4 下對人類 FcRn 之低親和力的特徵為解離常數 K_D 大於 10 μ M。

[15]如前述項目中任一項之抗體，其中描述在 pH 7.4 下對人類 FcRn 的親和力特徵之 K_D 係由 SPR 所測定。

[16]如項目[1]至[15]中任一項之抗體，其中在 pH 7.4 下對人類 FcRn 的親和力太低，以至於無法藉由 SPR 測定 K_D 值。

[17]如前述項目中任一項之抗體，其係結合人類 TNF α 且 K_D 小於 200 pM。

[18]如前述項目中任一項之抗體，其係結合人類 TNF α 且 K_D 小於 100 pM。

[19]如前述項目中任一項之抗體，其係結合人類 TNF α 且 K_D 小於 50 pM。

[20]如前述項目中任一項之抗體，其係結合人類 TNF α 且 K_D 小於 25 pM。

[21]如前述項目中任一項之抗體，其係結合人類 TNF α 且 K_D 小於 10 pM。

[22]如前述項目中任一項之抗體，其係從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層。

[23]如前述項目中任一項之抗體，其與包括有一具有如 SEQ ID NO:1 中所示胺基酸序列之輕鏈與一具有如 SEQ ID NO:2 中所示胺基酸序列之重鏈的對照抗體相比時，從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層的數量較大。

[24]如前述項目中任一項之抗體，其與包括有一具有如 SEQ ID NO:1 中所示胺基酸序列之輕鏈與一具有如 SEQ ID NO:2 中所示胺基酸序列之重鏈的對照抗體相比時，從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層的數量較大。

[25]如項目[24]之抗體，其中運輸通過極化細胞單層的抗體數量係大於運輸通過極化細胞單層的英夫利昔單抗數量兩倍。

[26]如項目[23]至[25]中任一項之抗體，其中所述數量係指在 4 小時內運輸通過極化細胞單層的質量。

[27]如項目[22]至[26]中任一項之抗體，其中該抗體運輸通過極化細胞單層的數量係大於親本免疫球蛋白運輸通過極化細胞單層的數量兩倍，其中所述親本免疫球蛋白與所述抗體的不同之處僅在於其 Fc 區僅具有野生型胺基酸。

[28]如前述項目中任一項之抗體，其中在有 10 倍過量的競爭免疫球蛋白之存在下，有比英夫利昔單抗更大比例的抗體從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層，其中該比例係指運輸通過極化細胞單層的免疫球蛋白總質量。

[29]如項目[28]之抗體，其中該抗體運輸通過極化細胞單層的比例係大於親本免疫球蛋白運輸通過極化細胞單層的比例三倍，其中所述親本免疫球蛋白與所述抗體的不同之處僅在於其 Fc 區僅具有野生型胺基酸。

[30]如項目[28]或[29]之抗體，其中運輸通過極化細胞單層的抗體比例係大於運輸通過極化細胞單層的英夫利昔單抗比例三倍。

[31]如項目[22]至[30]中任一項之抗體，其中該極化細胞單層為單層的極化 T84 細胞。

[32]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD64 且 K_D 小於 100 nM，較佳為小於 10 nM。

[33]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD32a(H)且 K_D 小於 10 μ M。

- [34]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD32a(R)且 K_D 小於 10 μ M。
- [35]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD32b 且 K_D 小於 10 μ M。
- [36]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD16a(V)且 K_D 小於 500 nM，較佳為小於 100 nM。
- [37]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD16a(F)且 K_D 小於 10 μ M，較佳為小於 1 μ M。
- [38]如前述項目中任一項之抗體，其係結合 CD16b(NA2)且 K_D 小於 10 μ M，較佳為小於 1 μ M。
- [39]如前述項目中任一項之抗體，其係以比英夫利昔單抗更高的強度結合人類 C1q。
- [40]如前述項目中任一項之抗體，在相對的 EC_{50} 及/或相對的最大死亡率方面，其具有比英夫利昔單抗更大之兔子補體的補體依賴型細胞毒性作用。
- [41]如前述項目中任一項之抗體，其能夠以等於或大於英夫利昔單抗的程度誘導 CD14⁺CD206⁺巨噬細胞。
- [42]如前述項目中任一項之抗體，其能夠以等於或大於英夫利昔單抗的程度抑制 T 細胞增生。
- [43]如前述項目中任一項之抗體，其為非岩藻醣化的抗體或岩藻醣化降低的抗體。
- [44]如前述項目中任一項之抗體，其包括(i) V_L 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:3 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:4 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:5 中所示胺基酸序列之 CDR3 區；以及(ii) V_H 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:6 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:7 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:8 中所示胺基酸序列之 CDR3 區。

[45]如前述項目中任一項之抗體，其包括具有如 SEQ ID NO:9 中所示胺基酸序列之 V_H 結構域，以及具有如 SEQ ID NO:10 中所示胺基酸序列之 V_L 結構域。

[46]如前述項目中任一項之抗體，其包括具有如 SEQ ID NO:4 中所示胺基酸序列之輕鏈，以及具有如 SEQ ID NO:11 中所示胺基酸序列之重鏈。

[47]如項目[1]至[43]中任一項之抗體，其中該抗體包括(i) V_L 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:14 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:15 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:16 中所示胺基酸序列之 CDR3 區；以及(ii) V_H 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:17 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:18 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:19 中所示胺基酸序列之 CDR3 區。

[48]如項目[47]之抗體，其包括具有如 SEQ ID NO:20 中所示胺基酸序列之 V_H 結構域，以及具有如 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:22 中所示胺基酸序列之 V_L 結構域。

[49]如項目[47]或[48]之抗體，其包括具有如 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:24 中所示胺基酸序列之輕鏈，以及具有如 SEQ ID NO:12 中所示胺基酸序列之重鏈。

[50]如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體特異性結合人類 $TNF\alpha$ 。

[51]如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體未明顯結合 $TNF\beta$ 。

[52]如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體：

- (i) 結合人類 $TNF\alpha$ 且解離常數(K_D)小於 125 pM；
- (ii) 會與恆河獼猴(*Macaca mulatta*) $TNF\alpha$ 及食蟹獼猴(*Macaca fascicularis*) $TNF\alpha$ 交叉反應；
- (iii) 於藉由 L929 分析法測定時，具有比英夫利昔單抗更高的效價；及/或

(iv) 能夠以至少 2 的化學計量比 (抗體:TNF α 三聚體) 結合至人類 TNF α 三聚體。

[53]如前述項目中任一項之抗體，其係結合來自恆河獼猴的 TNF α 且 K_D 小於 1 nM。

[54]如前述項目中任一項之抗體，其係結合來自食蟹獼猴的 TNF α 且 K_D 小於 1 nM。

[55]如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體抑制 TNF α 誘導的細胞凋亡的效價相對於英夫利昔單抗之效價 (相對效價) 在 L929 分析法中經測定為大於 3.5，且其中所述相對效價為在 L929 分析法中英夫利昔單抗之以 ng/mL 計的 IC_{50} 值與在 L929 分析法中該抗體之以 ng/mL 計的 IC_{50} 值的比率。

[56]如前述項目中任一項之抗體，其中呈 scFv 形式之抗體之可變域的熔融溫度藉由差示掃描螢光測定法測定係至少 65°C。

[57]如前述項目中任一項之抗體，其中呈 scFv 形式之抗體之可變域的熔融溫度藉由差示掃描螢光測定法測定係至少 68°C。

[58]如前述項目中任一項之抗體，其中藉由差示掃描螢光測定法測定之熔融溫度係至少 70°C。

[59]如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體能夠阻斷人類 TNF α 與 TNF 受體 I (TNFRI) 之間的相互作用。

[60]如前述項目中任一項之抗體，其中該抗體能夠阻斷人類 TNF α 與 TNF 受體 II (TNFRII) 之間的相互作用。

[61]如前述項目中任一項之抗體，其能夠抑制混合淋巴細胞反應中周邊血液單核細胞的細胞增生。

[62]如前述項目中任一項之抗體，其能夠抑制 LPS 誘導 CD14⁺ 單核細胞分泌介白素-1 β 。

[63]如項目[62]之抗體，其中抑制 LPS 誘導分泌介白素-1 β 的 IC₅₀ 值係小於 1 nM。

[64]如項目[63]之抗體，其中抑制 LPS 誘導分泌介白素-1 β 的 IC₅₀ 值（以莫耳計）係低於阿達木單抗(adalimumab)之 IC₅₀ 值。

[65]如前述項目中任一項之抗體，其能夠抑制 LPS 誘導 CD14⁺ 單核細胞分泌 TNF α 。

[66]如項目[65]之抗體，其中抑制 LPS 誘導分泌 TNF α 的 IC₅₀ 值係小於 1 nM。

[67]如項目[66]之抗體，其中抑制 LPS 誘導分泌 TNF α 的 IC₅₀ 值（以莫耳計）係低於阿達木單抗(adalimumab)之 IC₅₀ 值。

[68]如前述項目中任一項之抗體，其為免疫球蛋白 G (IgG)，較佳為 IgG1。

[69]一種編碼如前述項目中任一項之抗體的核酸。

[70]一種包括有如項目[69]之核酸的載體或質體。

[71]一種包括有如項目[69]之核酸或如項目[70]之載體或質體的細胞。

[72]一種製備如項目[1]至[68]中任一項之抗體的方法，其包括於培養基中在允許編碼該抗體之核酸表現的條件下培養如項目[71]之細胞，並自該等細胞或自該培養基回收該抗體。

[73]如項目[1]至[68]中任一項之抗體，其係用於發炎病狀或 TNF α 相關病症的治療之中。

[74]如項目[73]之抗體，其中所述發炎病症係選自在下文「待治療之病症」部分中所列的疾病及病症的清單。

[75]如項目[73]之抗體，其中所述發炎病症為胃腸道之發炎病症。

[76]如項目[75]之抗體，其中所述胃腸道之發炎病症為發炎性腸病。

[77]如項目[75]或[76]之抗體，其中所述胃腸道之發炎病症為克羅恩氏病 (Crohn's disease)。

[78]如項目[77]之抗體，其中所述克羅恩氏病係選自由以下組成之群：迴腸的、結腸的、迴腸結腸的及/或隔離的上部的克羅恩氏病（胃的、十二指腸的及/或空腸的）且包含非狹窄型/非穿透型、狹窄型、穿透型及肛周的疾病行為，允許有以上所提及者中之任一者的區域化及疾病行為的任何組合。

[79]如項目[75]或[76]之抗體，其中所述胃腸道之發炎病症為潰瘍性結腸炎。

[80]如項目[79]之抗體，其中所述潰瘍性結腸炎係選自由以下組成之群：潰瘍性直腸炎、直腸乙狀結腸炎、左側結腸炎、全潰瘍性結腸炎及結腸袋炎。

[81]如項目[75]或[76]之抗體，其中所述胃腸道之發炎病症為微性結腸炎。

[82]如項目[73]之抗體，其中所述發炎病症為關節炎。

[83]如項目[73]或[82]之抗體，其中所述發炎病症為風濕性關節炎。

[84]如項目[73]至[83]中任一項之抗體，其中所述方法包括向個體經口施與該抗體。

[85]如項目[73]至[84]中任一項之抗體，其中所述方法包括局部敷用該抗體。

[86]一種包括有如項目[1]至[68]中任一項之抗體的醫藥組成物。

[87]一種用於改進針對 $\text{TNF}\alpha$ 之抗體之胞吞轉送的方法，包括在抗體的胺基酸中引入 Q311R、M428E 及 N434W 的置換。

[88]一種用於延長針對 $\text{TNF}\alpha$ 之抗體之血漿半衰期的方法，包括在抗體的胺基酸中引入 Q311R、M428E 及 N434W 的置換。

【圖式簡單說明】

【0009】 圖 1: 在 L929 分析法中抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體中和人類 $\text{TNF}\alpha$ 的效價。顯示了抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體及參考的英夫利昔單抗之劑量反應曲線。

【0010】 圖 2: 運輸通過極化 T84 細胞之抗 $\text{TNF}\alpha$ IgG 變異體。其顯示在添加 4 小時後，抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體及英夫利昔單抗(IFX)從頂部到基

底貯存胞器的數量。以 ng/cm^2 表示。誤差槓係指示二至四個個別單層的 SD。

【0011】 圖 3：於過量骨髓瘤 IgG 的存在下，運輸通過極化 T84 細胞之抗 $\text{TNF}\alpha$ IgG 變異體。其顯示在添加 4 小時後，於 10 被過量的人類骨髓瘤 IgG 的存在下，抗 $\text{TNF}\alpha$ Ab 變異體及 IFX 從頂部運輸到基底貯存胞器的數量。以 ng/cm^2 表示。誤差槓係指示三至四個個別單層的 SD。

【0012】 圖 4：ADCC 活性。藉由抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體、野生型抗體及 IFX 之 ADCC 誘導結果。

【0013】 圖 5：與人類 C1q 的結合。IFX 及抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體與與人類 C1q 的結合。以二重複測定各濃度。誤差槓係指示 SD。

【0014】 圖 6：CDC 活性。各種抗 $\text{TNF}\alpha$ 變異體與 IFX 相比之細胞死亡百分比。每個樣本點為 6 個獨立重複之平均值。

【0015】 圖 7：相較於 IFX 的誘導之藉由各化合物誘導 $\text{CD14}^+\text{CD206}^+$ 巨噬細胞的結果。4 次獨立實驗的彙整資料。長條表示平均值，誤差槓表示 SEM。

【0016】 圖 8：相較於 IFX 之藉由各化合物抑制 T 細胞增生的結果。3 次獨立實驗的彙整資料。長條表示平均值，誤差槓表示 SEM。

【0017】 圖 9：定點突變之示意性圖示。

【0018】 圖 10：連接抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體之決定性 N 型醣鏈形式之示意圖。在測試的抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體組別中最具影響力的兩個 N 型醣鏈組為 4GlcNac-1Fuc-3Man 與 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal，而在產生有 2FF 的 IgG 變異體中也存在有相同的雙觸角結構，除了缺少岩藻糖的之外。

【實施方式】

【0019】 本發明係有關一種抗體，其能夠結合 $\text{TNF}\alpha$ 且包括一個 FcRn 結合位點。根據本發明，若該抗體能夠在 pH 6 下結合 FcRn（較佳為

人類 FcRn)，則其包括一個 FcRn 結合位點。在 pH 6 下與 FcRn 的結合係可藉由 SPR 來測定，例如在本發明實例 4 中所述。若可藉由 SPR 來測定抗體在 pH 6 下與 FcRn 的結合，這類抗體則有一個 FcRn 結合位點。本發明之抗體在 pH 6 下對人類 FcRn 有高親和力，其特徵為解離平衡常數(K_D)小於 100 nM。該抗體進一步在 pH 7.4 下對人類 FcRn 有低親和力，其特徵為 K_D 大於 1 μ M。該抗體之胺基酸序列包括在位置 434 的色胺酸胺基酸 (EU 編號)。

【0020】 在本說明書及申請專利範圍之全文中，於提及可變域中的殘基時，通常使用 Kabat 編號系統 (大約為輕鏈的殘基 1-107 及重鏈的殘基 1-113) (Kabat 等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, 國家衛生研究院, Bethesda, Md. (1991))。於提及免疫球蛋白重鏈恆定區中的殘基時，通常使用「EU 編號系統」或「EU 指數」(例如，於 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, 國家衛生研究院, Bethesda, Md. (1991)中所報告的 EU 指數，其係以引用方式明確併入本文中)。除非本文中另有說明，否則提及抗體可變域中之殘基數意謂藉由 Kabat 編號系統編號之殘基。除非本文中另有說明，否則提及抗體恆定域中之殘基數意謂藉由 EU 編號系統編號之殘基 (參見(例如) WO 2006/073941)。

抗體

【0021】 在本申請案之上下文中，術語「抗體」係用作「免疫球蛋白」(Ig)之同義詞，其被定義為屬於類別 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD (或其任何子類別)之蛋白質，且包括所有習知地已知的抗體及其功能性片段。在本發明之上下文中，抗體/免疫球蛋白之「功能性片段」被定義為親本抗體之抗原結合片段或基本上維持此類親本抗體之特性中之一或多者的其他衍生物。抗體/免疫球蛋白之「抗原結合片段」或「抗原結合域」被定義為

保留抗原結合區之片段（例如，IgG 之可變區）。抗體之「抗原結合區」通常存在於抗體之一或多個高變區中，亦即，CDR-1、CDR-2 及/或 CDR-3 區。本發明之抗體可以是雙功能或多功能構築體之一部分。

【0022】 該抗體較佳為單株抗體。如本文中所用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。術語「單株抗體」係指源自單一殖株，包含任何真核、原核或噬菌體殖株的抗體，而非產生抗體的方法。可以使用本領域中已知之各種技術製備單株抗體，該等技術包含使用融合瘤、重組及噬菌體呈現技術或其組合。(Harlow 及 Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.)。

【0023】 在其他實施例中，包含與抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體在人類中之活體內使用有關的實施例，可以使用嵌合抗體、靈長類化抗體、人源化抗體或人類抗體。在一個較佳實施例中，抗體為人類抗體或人源化抗體，更佳為單株人類抗體或單株人源化抗體。

【0024】 本發明之抗體於另一特定實施例中為免疫球蛋白，較佳為免疫球蛋白 G (IgG)。本發明之 IgG 的子類別不限於且包含 IgG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 及 IgG_4 。較佳地，本發明之 IgG 為子類別 1、2 或 4，即其分別為 IgG_1 、 IgG_2 或 IgG_4 分子。最佳地，本發明之 IgG 為子類別 1，即其分別為 IgG_1 分子。

TNF α 結合域

【0025】 本發明之抗體之 $\text{TNF}\alpha$ 結合域沒有特別限制。其可衍生自任何能夠結合 $\text{TNF}\alpha$ 之抗體。

【0026】 較佳地，本發明之抗體係特異性結合 $\text{TNF}\alpha$ 。如本文中所用，於抗體能夠區分人類 $\text{TNF}\alpha$ 與一或多個參考分子時，抗體係「特異性辨識」或「特異性結合」人類 $\text{TNF}\alpha$ 。較佳地，結合到參考分子中之每一者的 IC_{50} 值係比結合到 $\text{TNF}\alpha$ 的 IC_{50} 值大至少 1,000 倍。在其最普遍的形式中

(且當未提及限定參考時)，「特異性結合」係指抗體區分人類 TNF α 與不相關生物分子之能力，如例如根據本領域中已知的特異性分析方法所測定。這類方法包括(但不限於)西方墨點法及 ELISA 試驗。例如，可執行標準的 ELISA 分析法。通常不是藉由使用單一參考生物分子，而是使用一組約三至五個不相關的生物分子，諸如奶粉、BSA、運鐵蛋白等，來測定結合特異性。在一個實施例中，特異性結合係指抗體區分人類 TNF α 與人類 TNF β 之能力。

【0027】 本發明之抗體包括 V_L 結構域及 V_H 結構域。V_L 結構域包括 CDR1 區(CDRL1)、CDR2 區(CDRL2)、CDR3 區(CDRL3)及構架區。V_H 結構域包括 CDR1 區(CDRH1)、CDR2 區(CDRH2)、CDR3 區(CDRH3)及構架區。

【0028】 術語「CDR」係指抗體可變域內主要促進抗原結合的六個高變區之一。六個 CDR 之最常用定義之一係由 Kabat E. A.等人, (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242 所提供。如本文中所用，Kabat 的 CDR 定義僅適用於輕鏈可變域(CDR L1、CDR L2、CDR L3，或 L1、L2、L3)之 CDR1、CDR2 及 CDR3，以及重鏈可變域(CDR H2、CDR H3，或 H2、H3)之 CDR2 及 CDR3。然而，如本文中所用的重鏈可變域(CDR H1 或 H1)之 CDR1 係由以下殘基(Kabat 編號)定義：其始於位置 26 且在位置 36 之前結束。

【0029】 於本發明之一實施例中，本發明之抗體為一種如原初提交之 PCT 申請案第 PCT/EP2017/056218、PCT/EP2017/056246、PCT/EP2017/056237 及 PCT/EP2017/056227 號中之任一者所述之抗 TNF α 抗體。於本發明之又一實施例中，本發明之抗體為一種具有輕鏈可變域及/或重鏈可變域之抗 TNF α 抗體，其包括有若干具有如原初提交之 PCT 申請案

第 PCT/EP2017/056218、PCT/EP2017/056246、PCT/EP2017/056237 及 PCT/EP2017/056227 號中之任一者所述胺基酸序列的互補決定區(CDR)。

【0030】 於本發明之一較佳實施例中，該抗體為一種具有輕鏈可變域及/或重鏈可變域之抗 TNF α 抗體，其包括有一或多個具有如 PCT 申請案第 PCT/EP2017/056218、PCT/EP2017/056246、PCT/EP2017/056237 及 PCT/EP2017/056227 號中所述胺基酸序列的 CDR。於本發明之另一較佳實施例中，該抗體為一種具有輕鏈可變域及重鏈可變域之抗 TNF α 抗體，其包括有若干具有如原初提交之 PCT 申請案第 PCT/EP2017/056218 號的請求項 2、第 PCT/EP2017/056246 號的請求項 2、第 PCT/EP2017/056237 號的請求項 2 或第 PCT/EP2017/056227 號的請求項 2 中所述胺基酸序列的 CDR。於本發明之又一較佳實施例中，該抗體係選自由以下組成之群：包括有根據 PCT 申請案第 PCT/EP2017/056218 號的請求項 4、第 PCT/EP2017/056246 號的請求項 5 及 6、第 PCT/EP2017/056237 號的請求項 5 及 6、第 PCT/EP2017/056227 號的請求項 4 及其組合之重鏈可變域胺基酸序列及/或輕鏈可變域胺基酸序列之抗 TNF α 抗體。該等國際專利申請案第 PCT/EP2017/056218、PCT/EP2017/056246、PCT/EP2017/056237 及 PCT/EP2017/056227 號中之每一者之揭露內容全文係併入本文中。該等國際專利申請案構成了本申請案的部分揭露內容。

【0031】 於一特定實施例中，本發明之抗體包括(i) V_L 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:3 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:4 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:5 中所示胺基酸序列之 CDR3 區；以及(ii) V_H 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:6 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:7 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:8 中所示胺基酸序列之 CDR3 區。

【0032】 於一更佳實施例中，本發明之抗體包括具有如 SEQ ID NO:9 中所示胺基酸序列的 V_H 結構域。於另一更佳實施例中，該抗體包括具有如 SEQ ID NO:10 中所示胺基酸序列的 V_L 結構域。最佳地，本發明之抗體包括(i)具有如 SEQ ID NO:9 中所示胺基酸序列的 V_H 結構域，及(ii)具有如 SEQ ID NO:10 中所示胺基酸序列的 V_L 結構域。

【0033】 於另一特定實施例中，本發明之抗體包括(i) V_L 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:14 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:15 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:16 中所示胺基酸序列之 CDR3 區；以及(ii) V_H 結構域，包括具有如 SEQ ID NO:17 中所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:18 中所示胺基酸序列之 CDR2 區、及具有如 SEQ ID NO:19 中所示胺基酸序列之 CDR3 區。

【0034】 於一更佳實施例中，本發明之抗體包括具有如 SEQ ID NO:20 中所示胺基酸序列的 V_H 結構域。於另一更佳實施例中，該抗體包括具有如 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:22 中所示胺基酸序列的 V_L 結構域。最佳地，本發明之抗體包括(i)具有如 SEQ ID NO:20 中所示胺基酸序列的 V_H 結構域，及(ii)具有如 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:22 中所示胺基酸序列的 V_L 結構域。

【0035】 本發明之抗體對人類 $TNF\alpha$ 具有高親和力。術語「 K_D 」係指特定抗體-抗原相互作用之解離平衡常數。一般而言，於使用表面電漿共振(SPR)技術用 BIACORE 儀器測定時，本發明之抗體係按以下解離平衡常數(K_D)結合至人類 $TNF\alpha$ ：小於約 2×10^{-10} M、較佳地小於 1.5×10^{-10} M、較佳地小於 1.25×10^{-10} M、更加地小於 1×10^{-10} M、最佳地小於 7.5×10^{-11} M 或甚至小於 5×10^{-11} M。特定而言， K_D 的判定係如實例 1 中所述般執行。

會影響對 FcRn 之親和力的修飾

【0036】 本發明之抗體係包括憑藉本文中所定義之至少一「胺基酸修飾」而與野生型抗體的天然序列不同之胺基酸序列。該至少一胺基酸修飾係影響該抗體對人類 FcRn 的親和力。一般而言，該至少一胺基酸修飾增進該抗體在 pH 6 下對人類 FcRn 的親和力。於一實施例中，該至少一胺基酸修飾增進該抗體在 pH 6 下對人類 FcRn 的親和力，其中其並未實質改變在 pH 7.4 下對人類 FcRn 的親和力。較佳地，與野生型抗體或親本抗體的胺基酸序列相比，經修飾的抗體具有至少一胺基酸置換，例如自約一至約十個胺基酸置換，且較佳地自約一至約五個胺基酸置換。較佳地，該至少一胺基酸修飾係位於該抗體的 FcRn 結合位點之內。該抗體可具有一或多個在抗體 FcRn 結合位點之外的胺基酸修飾且其影響 FcRn 的結合，例如藉由結構的改變。該(等)胺基酸修飾可藉由本身已知的方法來產生，例如藉由如在「Antibody Engineering – Methods and Protocols», Patrick Chames 編, 第 2 版, 2012, 第 31 章 (ISBN 978-1-61779-973-0)」中所述的定點突變。

【0037】 本發明之抗體包括在位置 434 的胺基酸色胺酸(EU 編碼)。此於本文中係稱為「434W」。未經修飾的人類 IgG 抗體在位置 434 的天然胺基酸為天冬醯胺(N)。因此，本發明之抗體可藉由將突變 N434W 引入至抗體內而獲得。較佳地，本發明之抗體係可藉由用色胺酸取代位置 434 的天冬醯胺而獲得或由該取代來獲得。

【0038】 本發明之抗體包括在位置 428 的胺基酸麩胺酸(EU 編碼)。這在本文中係稱為「428E」。未經修飾的人類 IgG 抗體在位置 428 的天然胺基酸為甲硫胺酸(M)。因此，本發明之抗體可藉由將突變 M428E 引入至抗體內而獲得。較佳地，本發明之抗體係可藉由用麩胺酸取代位置 428 的甲硫胺酸而獲得或由該取代來獲得。

【0039】 較佳地，本發明之抗體進一步包括在位置 311 的胺基酸精胺酸 (EU 編碼)。這在本文中係稱為「311R」。未經修飾的人類 IgG 抗體在位置 311 的天然胺基酸為麩醯胺(Q)。因此，本發明之抗體可藉由將突變 Q311R 引入至抗體內而獲得。較佳地，本發明之抗體係可藉由用麩醯胺取代位置 311 的精胺酸而獲得或由該取代來獲得。

【0040】 於一實施例中，本發明之抗體包括胺基酸 434W 及胺基酸 428E。於另一實施例中，本發明之抗體包括胺基酸 434W 及胺基酸 311R。於本發明之一較佳實施例中，該抗體包括胺基酸 434W、428E 及 311R。此抗體可藉由將突變 Q311R、M428E 及 N434W 引入至抗體內而獲得。

【0041】 該恆定域的其餘胺基酸序列係可與典型人類 IgG 的原生胺基酸序列相同。然而，只要該抗體在 pH 6.0 下仍具有 TNF α 結合活性及效應功能，該抗體的胺基酸序列有可能包括一或多個於原生抗體 Fc 區之原生胺基酸序列上的額外突變或置換。

【0042】 於一較佳實施例中，本發明之抗體之包含有鉸鏈區的 Fc 區係包括選自由 SEQ ID NO:13 中所示的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0043】 於一實施例中，本發明之抗體重鏈係具有如 SEQ ID NO:11 中所示的胺基酸序列。較佳地，此抗體進一步包括一具有如 SEQ ID NO:1 中所示胺基酸序列之輕鏈。

【0044】 於另一實施例中，本發明之抗體重鏈係具有如 SEQ ID NO:12 中所示的胺基酸序列。較佳地，此抗體進一步包括一具有如 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:24 中所示胺基酸序列之輕鏈。

【0045】 於本發明之一較佳態樣中，本發明之抗體為非岩藻醣化的抗體或岩藻醣化降低的抗體。

【0046】 如本文中所用，術語「岩藻醣化降低的抗體」係指其中有

小於 90%的抗體 N 型醣鏈被岩藻醣化之抗體。測定岩藻醣化比例的方法在本領域中是已知的。較佳地，岩藻醣化的比例係如本申請案之實例 11 中所述般測定。

【0047】 於一實施例中，小於 75%、或小於 50%、或小於 25%的抗體 N 型醣鏈被岩藻醣化。最佳地，小於 15%的抗體 N 型醣鏈被岩藻醣化。於一特定實施例中，本發明之抗體之 N 型醣鏈不含有任何岩藻糖。

【0048】 較佳地，在抗體的 N297 (EU 編號) 有小於 90%的 N 型醣鏈被岩藻醣化。於另一實施例中，在抗體的 N297 (EU 編號) 有小於 75%、或小於 50%、或小於 25%的 N 型醣鏈被岩藻醣化。最佳地，在抗體的 N297 (EU 編號) 有小於 15%的 N 型醣鏈被岩藻醣化。

【0049】 於另一實施例中，在抗體的 N297 的 N 型醣鏈不含有任何岩藻糖。

【0050】 非岩藻醣化抗體有時也被稱為非典型岩藻醣化抗體，其可以藉由各種方法來生成。例如，在 CHO 細胞中協同敲除 $\alpha 1,6$ -岩藻糖轉移酶(*FUT8*)及 GDP-甘露糖 4,6-脫水酶(*GMD*)基因係可用以產生完全非典型岩藻醣化且增強 ADCC 之單株抗體變異體 (參見(例如) Imai-Nishiya 等人 (2007) BMC Biotechnol. 7, 84)。使用鋅指核酸酶(ZFNs)在編碼 $\alpha 1,6$ -岩藻糖轉移酶催化核心的區域中裂解 *FUT8* 基因並因此破壞在 CHO 細胞中對應的酶解作用之方法，係可用以產生完全缺少核心岩藻糖之單株抗體 (參見(例如) Malphettes 等人 (2010) Biotechnol. Bioeng. 106, 774–783)。

【0051】 岩藻醣化降低的抗體可藉由將諸如 2-脫氧-2-氟-2-岩藻糖之誘餌受質添加到培養基來製備 (參見(例如) Dekker 等人 (2016) Sci Rep 6:36964)，導致 IgG-Fc 醣鏈中的岩藻糖併入降低。

【0052】 於另一實施例中，本發明之抗體具有高唾液酸含量。可以

藉由(例如)同時轉染胞苷單磷酸-唾液酸合成酶(CMP-SAS)、胞苷單磷酸-唾液酸轉運蛋白 (CMP-SAT)、及 α 2,3-唾液酸轉移酶來達到唾液酸化的增加(參見(例如) Son 等人 (2011) Glycobiology 21, 1019–1028)。

對於 *FcRn* 的親和力

【0053】 本發明之抗體在 pH 6 下對於人類 *FcRn* 有高親和力。在 pH 6 下該抗體與人類 *FcRn* 的高親和性結合之特徵為 K_D 值小於 100 nM。較佳地，在 pH 6 下高親和性結合的 K_D 值係小於 75 nM、或小於 50 nM、或小於 25 nM、或甚至小於 10 nM。例如，表現 pH 6 下對人類 *FcRn* 之親和力特徵的 K_D 值係在 1 nM 至 500 nM、或 2 nM 至 100 nM、或 3 nM 至 50 nM、或 4 nM 至 25 nM 或 5 nM 至 10 nM 的範圍內。

【0054】 於一較佳實施例中，本發明之抗體在 pH 6 下對於人類 *FcRn* 的親和力係大於英夫利昔單抗在 pH 6.0 下對人類 *FcRn* 的親和力。

【0055】 本發明之抗體對於人類 *FcRn* 的親和力較佳地係藉由表面電漿子共振(SPR)來測定，例如於本申請案之實例 4 中所述。

【0056】 本發明之抗體一般在 pH 7.4 下對於人類 *FcRn* 有低親和力。該低親和力的特徵為 K_D 值大於 1 μ M。較佳地，所述在 pH 7.4 下對人類 *FcRn* 的低親和力的特徵為 K_D 值大於 2 μ M、或大於 5 μ M、或大於 10 μ M。

【0057】 於一特定實施例中，低親和力太低，以至於無法藉由 SPR 測定 K_D 值。

【0058】 於一特別的實施例中，(i)在 pH 7.4 下本發明之抗體與人類 *FcRn* 結合的 K_D 值相比於(ii)在 pH 6.0 下與人類 *FcRn* 結合的 K_D 值，其比率為至少 100。較佳地，此比率係至少 200、或至少 300、或至少 400、或至少 500、或至少 600、或至少 700、或至少 800、或至少 900、或至少 1000。

抗體的功能特點

【0059】 本發明之抗體係有效從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層。一般而言，係以比英夫利昔單抗的運輸量更大的數量來運輸通過極化細胞單層，其中英夫利昔單抗的抗體量係指每 cm^2 的極化細胞單層質量。相對於運輸通過極化細胞單層的英夫利昔單抗數量相比，運輸通過極化細胞單層的抗體數量為至少 110%、較佳為至少 125%、更佳為至少 150%、或至少 175%、或至少 200% (其中所運輸的英夫利昔單抗數量係設定為 100%)。

【0060】 再者，在存有過量的競爭免疫球蛋白下，該抗體係特異性地從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層。這在本文中係稱為特異性運輸。

【0061】 在存有 10 倍過量的競爭免疫球蛋白下，運輸通過極化細胞單層的免疫球蛋白總質量比率係大於從頂側到基底側運輸通過極化細胞單層的英夫利昔單抗比率。本發明抗體在存有 10 倍過量的不相關免疫球蛋白下之運輸通過極化細胞單層的比率，相對於英夫利昔單抗在存有 10 倍過量的不相關免疫球蛋白下之運輸通過極化細胞單層的比率，係為至少 150%、或至少 200%、或至少 250%、或至少 300% (英夫利昔單抗係設定為 100%)。

【0062】 較佳地，該極化細胞單層係為一單層的極化 T84 細胞。模擬胞吞轉送過程的運輸測定法係可如本申請案之實例 5 所述般執行。

【0063】 本發明之抗體係結合 CD64、CD32a(H)、CD32a(R)、CD32b、CD16a(V)、CD16a(F) 及 CD16b(NA2)。

【0064】 本發明之抗體一般係結合 CD64 且 K_D 小於 100 nM，較佳地小於 10 nM。

【0065】 本發明之抗體一般係結合 CD32a(H) 且 K_D 小於 10 μM 。

【0066】 本發明之抗體一般係結合 CD32a(R) 且 K_D 小於 10 μM 。

【0067】 本發明之抗體一般係結合 CD32b 且 K_D 小於 10 μM 。

【0068】 本發明之抗體一般係結合 CD16a(V)，且（例如） K_D 小於 500 nM，較佳地小於 100 nM。

【0069】 本發明之抗體一般係結合 CD16a(F)，且（例如） K_D 小於 10 μ M，較佳地小於 1 μ M。

【0070】 本發明之抗體一般係結合 CD16b(NA2)，且（例如） K_D 小於 10 μ M，較佳地小於 1 μ M。

【0071】 本發明之抗體係進一步結合人類 C1q。較佳地，此結合係比英夫利昔單抗與人類 C1q 的結合更強。

【0072】 本發明之抗體進一步具有兔子補體的補體依賴型細胞毒性作用(CDC)。在相對的 EC_{50} 及/或相對的最大死亡率方面，本發明抗體的 CDC 較佳地係大於英夫利昔單抗的 CDC。

【0073】 本發明之抗體進一步能夠引入 $CD14^+CD206^+$ 巨噬細胞。引入的程度較佳地係相當於、等於、或大於英夫利昔單抗的引入程度。

【0074】 本發明之抗體進一步能夠引入 $CD14^+CD206^+$ 巨噬細胞。引入的程度較佳地係相當於、等於、或大於英夫利昔單抗的引入程度。

醫藥組成物及治療

【0075】 疾病治療涵蓋已被診斷為患有處於任何臨床階段或臨床表現的任何形式之疾病的患者的治療；疾病之症狀或徵象之發作或演變或加重或惡化的延遲；及/或預防疾病及/或減小疾病之嚴重程度。

【0076】 施與抗 $TNF\alpha$ 抗體之「個體」或「患者」可以為哺乳動物，諸如非靈長類動物(例如，牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等)或靈長類動物(例如，猴或人類)。在某些態樣中，人類係兒科患者。在其他態樣中，人類係成年患者。

【0077】 本文係描述包括有抗 $TNF\alpha$ 抗體及可選擇之一或多種額外

治療劑的組成物，所述治療劑諸如為下文所述之第二治療劑。該等組成物通常係提供為無菌醫藥組合物的一部分，所述無菌醫藥組合物包含醫藥學上可接受的載劑。此組成物可以呈任何適宜形式（視所期望的向患者投與組合物之方法而定）。

【0078】 可以藉由各種途徑向患者施與抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體，諸如經口、經皮、皮下、鼻內、靜脈內、肌肉內、鞘內、局部敷用或局部施與（例如，黏膜給藥）。在任何指定情況下最合適的投藥途徑將視特定抗體、個體、及疾病之性質及嚴重程度以及個體之身體狀況而定。一般而言，抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體將會通過靜脈注射。

【0079】 於一特定的較佳實施例中，本發明之抗體係經口施與。若經由經口途徑給藥，該抗體較佳地為 IgG，最佳地為 IgG₁。

【0080】 於一般的實施例中，抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體係以足以允許以 0.5 毫克/公斤體重至 20 毫克/公斤體重靜脈注射的濃度存在於醫藥組合物中。在一些實施例中，適用於本文所述組合物及方法中的抗體濃度包含(但不限於) 0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13 mg/kg、14 mg/kg、15 mg/kg、16 mg/kg、17 mg/kg、18 mg/kg、19 mg/kg、20 mg/kg，或在任何前述值之間的濃度範圍，例如 1 mg/kg 至 10 mg/kg、5 mg/kg 至 15 mg/kg 或 10 mg/kg 至 18 mg/kg。

【0081】 視待治療之病狀、投藥途徑及個體之年齡、體重及狀況而定，抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體之有效劑量可以根據單次投藥(例如，快速投藥)、多次投藥或連續投藥而在約 0.001 至約 750 mg/kg 的範圍內，或根據單次投藥(例如，快速投藥)、多次投藥或連續投藥而達成 0.01 至 5000 $\mu\text{g/mL}$ 的血清濃度，或任何有效範圍或範圍內的值。在口服給藥的情況下，血清濃度可能

非常低或甚至在偵測極限以下。在某些實施例中，各劑量可以在每公斤體重約 0.5 mg 至約 50 mg 或每公斤體重約 3 mg 至約 30 mg 的範圍內。可以將抗體調配為水溶液。

【0082】 在一特定的較佳實施例中，本發明之抗體係經口施與。若經由經口途徑給藥，該抗體較佳地為 IgG，最佳地為 IgG₁。若抗體係經口施與，抗體的每日劑量一般在每公斤體重約 0.01 mg 至約 100 mg、或每公斤體重約 0.05 mg 至約 50 mg、或每公斤體重約 0.1 mg 至約 25 mg、或每公斤體重約 0.15 mg 至約 10 mg、或每公斤體重約 0.16 mg 至約 5 mg、或每公斤體重約 0.2 mg 至約 2 mg、或每公斤體重約 0.2 mg 至約 1 mg 的範圍內。通常有利劑量為每天 1 至 200 mg 的劑量，較佳為每天 5 至 100 mg 或 10 至 50 mg。

【0083】 醫藥組合物可以方便地按每劑量含有預定量之抗 TNF α 抗體的單位劑型呈現。此類單元可以含有 0.5 mg 至 5 g，例如(但不限於) 1 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、750 mg、1000 mg，或在以上任何兩個值之間的任何範圍，例如 10 mg 至 1000 mg、20 mg 至 50 mg、或 30 mg 至 300 mg。例如視待治療之病狀或投藥途徑而定，醫藥學上可接受之載劑可以採用各種形式。

【0084】 抗 TNF α 抗體的有效劑量、劑量總數及治療長度之確定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，且可以使用標準的劑量遞增研究確定。

【0085】 適合本文所述之方法中的抗 TNF α 抗體的治療性調配物可以藉由將具有所要純度之抗體與視情況選用之此項技術中通常採用的醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(其在本文中皆稱為「載劑」)混合而製備成凍乾調配物或水溶液進行儲存，該等載劑亦即緩衝劑、穩定劑、防腐劑、等張劑、非離子清潔劑、抗氧化劑及其他各種添加劑。參見 Remington's

Pharmaceutical Sciences, 第 16 版 (Osol 編, 1980)。此類添加劑在所採用的劑量及濃度下必須對接受者無毒。

【0086】 緩衝劑有助於將 pH 維持在接近生理條件的範圍內。其可以按在約 2 mM 至約 50 mM 範圍內的濃度存在。適合緩衝劑包括有機及無機酸及其鹽，諸如檸檬酸鹽緩衝劑(例如，檸檬酸單鈉-檸檬酸二鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸單鈉混合物等)、檸檬酸鹽-磷酸鹽緩衝劑、丁二酸鹽緩衝劑(例如，丁二酸-丁二酸單鈉混合物、丁二酸-氫氧化鈉混合物、丁二酸-丁二酸二鈉混合物等)、酒石酸鹽緩衝劑(例如，酒石酸-酒石酸鈉混合物、酒石酸-酒石酸鉀混合物、酒石酸-氫氧化鈉混合物等)、反丁烯二酸鹽緩衝劑(例如，反丁烯二酸-反丁烯二酸單鈉混合物、反丁烯二酸-反丁烯二酸二鈉混合物、反丁烯二酸單鈉-反丁烯二酸二鈉混合物等)、葡萄糖酸鹽緩衝劑(例如，葡萄糖酸-葡萄糖酸鈉混合物、葡萄糖酸-氫氧化鈉混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸鉀混合物等)、草酸鹽緩衝劑(例如，草酸-草酸鈉混合物、草酸-氫氧化鈉混合物、草酸-草酸鉀混合物等)、乳酸鹽緩衝劑(例如，乳酸-乳酸鈉混合物、乳酸-氫氧化鈉混合物、乳酸-乳酸鉀混合物等)及乙酸鹽緩衝劑(例如，乙酸-乙酸鈉混合物、乙酸-氫氧化鈉混合物等)。另外，可以使用磷酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑及三甲胺鹽，諸如 Tris。

【0087】 本發明之醫藥組成物可進一步包括至少一種鹽類，例如氯化鈉。鹽的濃度範圍較佳為 100 mM 至 200 mM，例如約 150 mM。

【0088】 可以添加防腐劑來阻礙微生物生長，且防腐劑可以按 0.2% 至 1% (w/v)範圍內的量添加。適合防腐劑包括苯酚、苯甲醇、間甲苯酚、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、氯化十八烷基二甲基苯甲基銨、苄烷銨鹵化物(例如，氯化物、溴化物及碘化物)、氯化六羥季銨及對羥基苯甲酸烷基酯(諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯)、兒茶酚、間苯二

酚、環己醇及 3-戊醇。等張劑有時稱為「穩定劑」，可以添加等張劑來確保液體組合物之等張性且等張劑包括多羥基糖醇，較佳三羥基糖醇或更多羥基的糖醇，諸如甘油、赤藻糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇及甘露糖醇。穩定劑係指廣泛類別之賦形劑，其功能範圍可以係自增積劑至使治療劑溶解或有助於防止變性或黏附於容器壁上的添加劑。典型的穩定劑可以係多羥基糖醇(以上所列舉的)；胺基酸，諸如精胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等；有機糖或糖醇，諸如乳糖、海藻糖、水蘇糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌肉肌醇、半乳糖醇、甘油及其類似者，包括環醇，諸如肌醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，諸如脲、麩胱甘肽、硫辛酸、巯乙酸鈉、硫甘油、 α -單硫甘油及硫代硫酸鈉；低分子量多肽(例如，具有 10 個殘基或更少殘基的肽)；蛋白質，諸如人類血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮單醣，諸如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；雙醣，諸如乳糖、麥芽糖、蔗糖；及三醣，諸如棉子糖；以及多醣，諸如聚葡萄糖。每重量份活性蛋白質可以存在在 0.1 至 10,000 重量範圍內的穩定劑。

【0089】 可以添加非離子型界面活性劑或清潔劑(亦稱為「濕潤劑」)來幫助溶解治療劑以及避免攪拌誘導治療蛋白聚集，其亦允許調配物暴露於有應力的剪切表面而不引起蛋白質變性。適合的非離子型界面活性劑包括聚山梨醇酯(20、80 等)、泊洛沙姆(poloxamer) (184、188 等)、普洛尼克多元醇(Pluronic polyol)、聚氧乙烯山梨聚糖單醣(TWEEN®-20、TWEEN®-80 等)。非離子型界面活性劑可以按約 0.05 mg/mL 至約 1.0 mg/mL 的範圍或約 0.07 mg/mL 至約 0.2 mg/mL 的範圍存在。

【0090】 另外各種賦形劑包括增積劑(例如，澱粉)、螯合劑(例如，

EDTA)、抗氧化劑(例如，抗壞血酸、甲硫胺酸、維生素 E)、蛋白酶抑制劑及共溶劑。

【0091】 本文中之調配物除了抗 TNF α 抗體之外亦可以含有第二治療劑。適合第二治療劑之實例提供於下文中。

【0092】 給藥時程可以在一月一次至每天一次之範圍內變化，視多種臨床因素而定，包括疾病類型、疾病嚴重程度及患者對抗 TNF α 抗體之敏感性。在特定實施例中，抗 TNF α 抗體係每天一次、每週兩次、一週三次、每隔一天、每 5 天、每週一次、每 10 天、每兩週、每三週、每四週或一月一次或按任何介於以上任何兩個值之間的範圍投與，例如每四天至每月、每 10 天至每兩週、或一週兩次至一週三次等。

【0093】 待投與之抗 TNF α 抗體的劑量將根據特定抗體、個體、及疾病之性質及嚴重程度、個體之身體狀況、治療方案(例如，是否使用第二治療劑)及所選擇的投藥途徑而改變；恰當的劑量可以容易地由熟習此項技術者確定。

【0094】 熟習此項技術者應認識到，抗 TNF α 抗體之個別劑量之最佳數量及間隔將由待治療病狀之性質及程度、投藥形式、途徑及部位以及待治療之特定個體的年齡及狀況決定，且最終將由醫師確定恰當的使用劑量。此劑量適當時可以經常重複。若出現副作用，則可以根據正常臨床實踐更改或降低給藥量及/或給藥頻率。

待治療之病症

【0095】 本發明係關於一種治療或預防個體之人類 TNF α 相關疾病的方法，其包含向個體投與如本文所定義之抗體。術語「TNF 相關病症」或「TNF 相關疾病」係指要求 TNF α 參與的症狀或疾病病況的任何紊亂、發作、進展或持久性。例示性 TNF 相關病症包括(但不限於)慢性及/或自體

免疫性一般發炎病況；免疫介導之一般發炎病症；發炎性 CNS 疾病；影響眼睛、關節、皮膚、黏膜、中樞神經系統、胃腸道、泌尿道或肺的發炎疾病；一般葡萄膜炎病況；視網膜炎；HLA-B27+葡萄膜炎；貝塞特氏病(Behçet's disease)；乾眼症候群；青光眼；休格連氏症候群(Sjögren syndrome)；糖尿病(包括糖尿病性神經病)；胰島素抗性；一般關節炎病況；類風濕性關節炎；骨關節炎；反應性關節炎及萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)；幼年期關節炎；僵直性脊椎炎；多發性硬化症；格-巴二氏症候群(Guillain-Barré syndrome)；重症肌無力；肌肉萎縮性側索硬化；類肉瘤病；腎小球性腎炎；慢性腎病；膀胱炎；牛皮癬(包括牛皮癬性關節炎)；化膿性汗腺炎；脂層炎；壞疽性膿皮病；SAPHO 症候群(滑膜炎、痤瘡、膿皰病、骨肥厚及骨炎)；痤瘡；斯威特氏症候群(Sweet's syndrome)；天疱瘡；克羅恩氏病(包括腸外表現)；潰瘍性結腸炎；支氣管哮喘；過敏性肺炎；一般過敏；過敏性鼻炎；過敏性竇炎；慢性阻塞性肺病(COPD)；肺纖維化；韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)；川崎症候群；巨大細胞動脈炎；徹奇-斯全司血管炎(Churg-Strauss vasculitis)；結節性多動脈炎；燒傷；移植物抗宿主疾病；宿主抗移植物反應；器官或骨髓移植後的排斥事件；全身性及局部一般血管炎病況；全身性及皮膚性紅斑狼瘡；多發性肌炎及皮肌炎；硬皮病；子癰前症；急性及慢性胰臟炎；病毒性肝炎；酒精性肝炎；術後發炎，諸如在以下手術之後：眼部手術(例如，白內障(眼睛晶狀體更換)或青光眼手術)、關節手術(包括關節鏡手術)、在關節相關結構(例如，韌帶)處的手術、口腔及/或牙齒手術、微創心血管程序(例如，PTCA、動脈粥樣硬塊切除、支架置入術)、腹腔鏡及/或內視鏡腹膜內及婦科程序、內視鏡泌尿程序(例如，前列腺手術、輸尿管鏡檢、膀胱鏡檢、間質性膀胱炎)或一般圍手術期發炎(預防)；大皰性皮炎；嗜中性皮炎；中毒性表皮壞死溶解；膿皰性皮炎；腦型

瘡；溶血性尿毒症候群；同種異體移植排斥反應；中耳炎；蛇咬傷；結節性紅斑；骨髓發育不良症候群；原發性硬化性膽管炎；血清陰性脊椎關節病(seronegative spondylarthritis)；自體免疫性溶血性貧血；口面部肉芽腫病；增殖性化膿性口炎；口瘡性口炎；地圖狀舌症；遷徙性口炎；阿茲海默病；帕金森氏病；亨廷頓氏病；伯耳氏癱(Bell's palsy)；庫賈氏病(Creutzfeld-Jakob disease)以及一般神經退化性病狀。

【0096】 癌症相關骨質溶解、癌症相關發炎、癌症相關疼痛、癌症相關惡病質、骨轉移、急性及慢性疼痛形式(不管此等疾病是否係由 $\text{TNF}\alpha$ 之中樞或外周作用引起且不管其是否歸類為發炎性、感受傷害性或神經性疼痛形式)、坐骨神經痛、下背痛、腕隧道症候群、複雜區域疼痛症候群(CRPS)、痛風、疱疹後遺神經痛、肌肉纖維疼痛、局部疼痛病況、因為轉移性腫瘤所致的慢性疼痛症候群、痛經。

【0097】 待治療之特定病症包括一般關節炎病況；類風濕性關節炎；骨關節炎；反應性關節炎；幼年期關節炎；牛皮癬，包括牛皮癬性關節炎；發炎性腸病，包括克羅恩氏病；潰瘍性結腸炎，包括直腸炎、乙狀結腸炎、直腸乙狀結腸炎、左側結腸炎、廣泛性結腸炎及全結腸炎；不明原因結腸炎(undetermined colitis)；微性結腸炎，包括膠原性及淋巴球性結腸炎；結締組織結腸炎疾病；轉移性結腸炎(diversion colitis)；憩室結腸炎疾病；嗜酸性結腸炎及結腸袋炎。

【0098】 最佳地，本發明之抗體係用於治療發炎性腸病，尤其是克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎或微性結腸炎。克羅恩氏病可以係迴腸的、結腸的、迴腸結腸的或隔離的上部的克羅恩氏病(胃的、十二指腸的及/或空腸的)，包括非狹窄型/非穿透型、狹窄型、穿透型及肛周的疾病行為，允許以上所提及者中之任一者的定位及疾病行為的任何組合。潰瘍性結腸炎可以

係潰瘍性直腸炎、直腸乙狀結腸炎、直腸乙狀結腸炎、左側結腸炎、全潰瘍性結腸炎及結腸袋炎。

組合療法及其他態樣

【0099】 較佳地，經抗 TNF α 抗體治療之患者亦用另一種習知藥物治療。舉例而言，患有發炎性腸病、尤其是若患有中度至重度疾病之患者通常亦用美沙拉嗪(mesalazine)或其衍生物或前藥、皮質類固醇(例如布地奈德(budesonide)或潑尼龍(prednisolone) (經口或靜脈內))、免疫抵制劑(例如硫唑嘌呤(azathioprine)/6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine；6-MP)或甲胺喋呤(methotrexate))、環孢靈(cyclosporine)或他克莫司(tacrolimus)治療。其他可共投與至患者之藥物包含其他抗 TNF α 抗體 (例如英利昔單抗、阿達木單抗、依那西普(etanercept)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(certolizumab pegol)、戈利木單抗(golimumab))、整聯蛋白拮抗物 (例如，那他珠單抗(natalizumab)、維多珠單抗(vedolizumab))、抗 IL-23 抗體 (例如，MEDI2070)、抗 β 7 抗體 (例如，艾托珠單抗(etrolizumab))、JAK/STAT 路徑中的 JAK 抑制物 (例如，托法替尼(tofacitinib))、以及其他。其他可共投與至患者之藥物包括免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤/6-MP 或甲胺喋呤或口服環孢靈)以便維持穩定及較長緩解。本發明之又一個態樣係如上文所定義之抗 TNF α 抗體用於減少發炎的用途。

【0100】 本發明之又一個態樣為如上文所定義之抗 TNF α 抗體，其用於減少患有發炎病狀之患者的發炎。

【0101】 本發明之另一態樣為一種治療發炎病狀之方法，其包含向有需要之患者投與有效量的如上文所定義之抗 TNF α 抗體。發炎病狀較佳為上文所述之病狀中之一者。

【0102】 本發明之另一態樣為一種預防發炎病狀之方法，其包含向有需要之患者投與有效量的如上文所定義之抗 TNF α 抗體。發炎病狀較佳為上文所述之病狀中之一者。

【0103】 本發明之又一態樣為一種改進針對 TNF α 之抗體之胞吞轉送的方法，包括在抗體的胺基酸序列中引入 Q311R、M428E 及 N434W 的置換，藉以獲得一可改進胞吞轉送之經修飾的抗體。該經修飾的抗體較佳為本說明書上文所述之抗體。

【0104】 本發明之又一態樣為一種用於延長針對 TNF α 之抗體之血漿半衰期的方法，包括在抗體的胺基酸序列中引入 Q311R、M428E 及 N434W 的置換，藉以獲得一可延長血漿半衰期之經修飾的抗體。該經修飾的抗體較佳為本說明書上文所述之抗體。相對於未經修飾的抗體（即缺少 Q311R、M428E 及 N434W 的置換之親本抗體）之血漿半衰期，該血漿半衰期可增加至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%。

表 1. 序列表之序列概述

SEQ ID NO:	胺基酸序列的說明
1	Ab-wt 的輕鏈，使用於該等實例中之經修飾抗體的親本抗體
2	Ab-wt 的重鏈，使用於該等實例中之經修飾抗體的親本抗體
3	殖株 16-22-H05 的 CDR L1
4	殖株 16-22-H05 的 CDR L2
5	殖株 16-22-H05 的 CDR L3
6	殖株 16-22-H05 的 CDR H1
7	殖株 16-22-H05 的 CDR H2
8	殖株 16-22-H05 的 CDR H3

SEQ ID NO:	胺基酸序列的說明
9	殖株 16-22-H05 之人源化 IgG 之 V _H
10	殖株 16-22-H05 之人源化 IgG 之 V _L
11	Ab-REW 之重鏈(基於殖株 16-22-H05)
12	Ab-REW 之重鏈(基於殖株 17-22-B03)
13	Ab-REW 之 Fc 區(包含鉸鏈區)
14	殖株 17-22-B03 的 CDR L1
15	殖株 17-22-B03 的 CDR L2
16	殖株 17-22-B03 的 CDR L3
17	殖株 17-22-B03 的 CDR H1
18	殖株 17-22-B03 的 CDR H2
19	殖株 17-22-B03 的 CDR H3
20	殖株 17-22-B03 之人源化 IgG 之 V _H
21	殖株 17-22-B03 (sc08)之人源化 IgG 之 V _L
22	殖株 17-22-B03 (sc02)之人源化 IgG 之 V _L
23	殖株 17-22-B03 (sc08)之人源化 IgG 之輕鏈
24	殖株 17-22-B03 (sc02)之人源化 IgG 之輕鏈

實例

抗體變異體

【0105】 若干抗 TNF α 抗體之變異體（在下文中係稱為「親本抗體」或「Ab-wt」）係藉由在抗體胺基酸序列的 Fc 區中引入置換而生成。Ab-wt

的輕鏈具有如 SEQ ID NO:1 中所示胺基酸序列，且 Ab-wt 的重鏈具有如 SEQ ID NO:2 中所示胺基酸序列。該等突變係藉由已建立的定點突變方法而引入。簡言之，藉由 PCR 來引入該等突變。於設計反向引子時，正向引子係設計成含有預定的突變，使得兩個引子的 5'端以背對背方式黏合（但不重疊）（圖 9）。PCR 係運行 25 個循環（98°C 10 秒，64°C 30 秒，72°C 3 分鐘）。在瓊脂糖凝膠上跑 PCR 產物之前，用限制酶 DpnI 從 PCR 產物混合液中移除未突變的 PCR 模板。在以凝膠純化 PCR 產物之後接合齊平端，以得到環形化的質體而轉型至大腸桿菌勝任細胞內。在隔夜培養之後挑選若干個菌落，分離出質體 DNA 並定序，以確認已併入突變。

【0106】 非岩藻醣化的變異體係藉由將 0.15 mM 的誘餌受質 2-脫氧-2-氟-2-岩藻糖添加到培養基而生成(Dekkers 等人 (2016) Sci Rep 6:36964)。這在 IgG-Fc 醣鏈中導致岩藻糖的併入顯著降低，如下文實例 11 中所示。

表 2. 所生成之抗 TNF α 抗體的抗體變異體（EU 編號）

名稱	相對於親本抗體的突變
Ab-wt*	無 (=親本抗體)
Ab-REW**	Q311R/M428E/N434W
Ab-REW-2FF**	Ab-REW 之非岩藻醣化的變異體

*非依據本發明的抗體； **依據本發明的抗體

【0107】 抗體 Ab-REW 及 Ab-REW-2FF 係為依據本發明之抗體。

實例 1. 對 TNF α 的親和力

方法：

【0108】 對於 $\text{TNF}\alpha$ 的親和力係藉由 Biacore 來測量。使用標準的胺固定化 Biacore 程序來製備 CM5 晶片。於插入 CM5 晶片時，已沖洗系統並接著用 BIA 標準化溶液(Biacore 預防性維護套組 2 (Preventative Maintenance Kit 2)) 進行標準化。將晶片放入系統中並用 PBS-T 運行緩衝液；於固定化之前，注入三次 50 mM NaOH 沖洗晶片表面。蛋白質 A 被固定在晶片表面上。為此，在 pH 4.5 下將蛋白質稀釋到醋酸鹽緩衝液中至 5 $\mu\text{g/mL}$ 並注入，以在全部 4 個流動槽中產生約 1000 RU 的結合反應。為了將非共價結合的物質移除出全部的晶片流動槽，以 50 mM NaOH 洗滌 15 秒三次。於蛋白質 A 晶片上，抗體係捕獲於流動槽 2 及 4 中，流動槽 1 及 3 係供參考相減用。實驗抗體係稀釋於 PBS-T 中至 10 nM 並注入 2.5-7.5 μL ，以得到 120 RU 的捕獲抗體。分析物 $\text{TNF}\alpha$ 係按照供應商的指示以 500 $\mu\text{g/mL}$ 製備於水中，並進一步稀釋到運行緩衝液 PBS-T 中。使用單循環動力學來估計穩定態的親和力。在每個單循環分析循環中，將 5 分析物濃度的滴定量注進於配體上，接著測量複合物的解離。使用 pH 1.7 的甘胺酸使表面再生。利用雙重參照法，其中來自於配位體結合捕獲表面之數據（流動槽 2 及 4）係從沒有捕獲配位體的參照表面（分別為流動槽 1 及 3）扣除。每 3 至 4 次循環注進空白緩衝液並接著從分析物注進循環中扣除，以校正配位體捕獲表面中的微小變化。在每次分析運行的開始及結束重複注進分析物，以檢查樣品降解或是儀器性能的變化。全部的分析皆在 25°C 下執行，且樣品架於實驗運行期間係於 10°C 下培養。每個實驗係運行至少三次。使用 1:1 結合模型來擬合所得動力學數據。

結果：

【0109】 全部的抗體對於 $\text{TNF}\alpha$ 皆顯示出相似的結合動力學，表明任一引入的突變並未導致抗原結合區的顯著變化。對於抗體 Ab-REW-2FF 之

解離速率係無法測得，因此無法判定其親和力(K_D)。然而，結合速率則與其他抗體相當，這指出引入突變並未顯著影響到其結合作用。

表 3：藉由 SPR 所測定之人類 IgG 變異體對於 $TNF\alpha$ 的結合動力學

	k_a ($10^6/Ms$)	k_d ($10^{-5}/s$)	K_D (pM)
Ab-wt	8.37 ± 0.11	3.45 ± 0.20	4.13 ± 0.19
Ab-REW	6.22 ± 0.91	2.04 ± 0.52	3.30 ± 0.74
Ab-REW-2FF	5.80 ± 0.58	nd*	nd*

*無法測定解離速率(kd)。

實例 2. 效價

方法：

【0110】 L929 細胞係在連續稀釋的抗 $TNF\alpha$ 抗體變異體之存在下，與 0.25 ng/mL 的 $TNF\alpha$ 及 1 μ g/孔的放線菌素一起培養。於 37°C/5% CO_2 下培養 20 小時之後，使用 MTS (3-(4,5-二甲基噁唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑) 及電子偶聯劑 (吩嗪硫酸乙酯, PES)測量增生反應。藉由存在於代謝活躍的細胞中之去氫酶將 MTS 轉化為甲臍產物。以吸光度 492 nm 測得之甲臍產物的量係與培養物中的活細胞數目成正比。

結果：

【0111】 結果係顯示於圖 1 中。將該等突變引入至抗 $TNF\alpha$ 抗體的 Fc 區不會影響效價。

實例 3. 對 $Fc\gamma$ 受體(CD64、CD32a、CD32b、CD16a, CD16b)的親和力

方法：

【0112】 對於 FcγR 的親和力係藉由 Biacore 來測量。使用標準的胺固定化 Biacore 程序來製備 CM5 晶片。於插入 CM5 晶片時，已將系統充滿所有液體處理系統管路並接著用 BIA 標準化溶液（Biacore 預防性維護套組 2）進行標準化。將晶片放入系統中並用磷酸鹽緩衝溶液 Tween-20 (PBS-T) 運行緩衝液；於固定化之前，注入三次 50 mM NaOH 沖洗晶片表面。使用 His-tag（組胺酸標籤）捕獲系統將 FcγR 固定在晶片表面上。抗 His-tag 晶片係根據 Biacore 套組說明書製備，以約 12000 RU 的抗體沉積在全部 4 個流動槽上。為了將非共價結合的物質移除出全部的晶片流動槽，以 10 mM 甘胺酸(pH 1.5)洗滌 30 秒三次。Fcγ 受體係稀釋於 PBS-T 中至 0.5-2 μg/mL 的範圍，並注進 2.5-5.0 uL 到晶片上以生成 60 至 200 RU 之間的捕獲量。使用單循環動力學來估計穩定態的親和力。在每個單循環分析循環中，將 5 抗體濃度的滴定量注進於 FcγR 配體上，接著測量複合物的解離。使用建議的溶液 10 mM 甘胺酸(pH 1.5)，針對抗 His 捕獲表面使表面再生。利用雙重參照法，其中來自於配位體結合捕獲表面之數據（流動槽 2 及 4）係從沒有捕獲配位體的參照表面（分別為流動槽 1 及 3）扣除。每次的抗體滴定循環注進空白緩衝液並接著從分析物注進循環中扣除，以校正配位體捕獲表面中的微小變化。全部的分析皆在 25°C 下執行，且樣品架於實驗運行期間係於 10°C 下培養。每個實驗係運行至少三次。

結果：

【0113】 該等經工程改造之抗 TNFα 抗體之與 CD64 的結合並未受到影響。該等突變的引入並未影響到對於 CD32a(H)、CD32a(R)及 CD32b 的親和力。然而，Ab-REW-2FF 顯示出其對 CD16a(V)的親和力增加 5.5 倍。非岩藻醣化的抗體 Ab-REW-2FF 對於低親和力的 CD16a 受體以及對 CD16b 的結合也有改善。

表 4:藉由 SPR 所測定之對於 Fcγ 受體 CD64、CD32a(H)、CD32a(R)及 CD32b 的親和力。顯示了從二或多個獨立實驗計算出的平均親和力及標準差。

	親和力 (K _D)			
	CD64	CD32a(H)	CD32a(R)	CD32b
	(nM)	(μM)	(μM)	(μM)
Ab-wt	2.92 ± 0.07	0.67 ± 0.04	nd	3.14 ± 0.80
Ab-REW	2.80 ± 0.24	0.78 ± 0.05	1.60 ± 0.01	1.21 ± 0.32
Ab-REW-2FF	2.93 ± 0.16	1.87 ± 0.37	1.45 ± 0.01	1.13 ± 0.25

表 5:藉由 SPR 所測定之對於 Fcγ 受體 CD16a(V)、CD16a(F)及 CD16b 的親和力。顯示了從二或多個獨立實驗計算出的平均親和力及標準差。

	親和力 (K _D)		
	CD16a(V)	CD16a(F)	CD16b(NA2)
	(nM)	(μM)	(μM)
Ab-wt	184 ± 31.9	nd	> 3.00
Ab-REW	280 ± 36.1	2.41 ± 0.68	1.65 ± 0.36
Ab-REW-2FF	33.5 ± 0.99	0.15 ± 0.01	0.40 ± 0.07

實例 4. 對 FcRn 的親和力

方法：

【0114】 SPR 係使用 Biacore 3000 儀器來執行，使用如製造商所述的胺偶聯化學作用，以 CM5 感測晶片與抗 TNFα IgG1 抗體偶聯（約 500 共振單位(RU)）。所述偶聯係藉由使用胺偶聯套組（GE Healthcare 公司），注進 2.0 ug/mL 之各個於 10 mM 醋酸鈉(pH 4.5)中的蛋白質來執行。使用 pH 7.4 之 HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% 界面活性劑 P20)或 pH 6.0

之磷酸鹽緩衝液（67 mM 磷酸鹽緩衝液, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20）做為運行緩衝液及稀釋緩衝液。結合動力學係在 pH 7.4 或 pH 6.0 下藉由注進滴定量(1000 – 31.2 nM)的單體 His-tagged 人類 FcRn (hFcRn)於經固定的抗體上來測定。全部的 SPR 實驗係於 25°C 下以 40 ul/min 的流速進行。結合數據係經零點調整，並扣除參考槽的值。使用 BIAevaluation 軟體(4.1 版)提供的朗謬 1:1 配位體結合模型來測定結合動力學。

結果：

【0115】 結果顯示野生型抗體 Ab-wt 是以嚴格的 pH 依賴性方式來結合 hFcRn。全部經工程改造的抗體變異體在 pH 6.0 下皆對 FcRn 有較高的親和力，但仍保持其 pH 依賴性且在 pH 7.4 不會結合受體。意外的是，含有變異體的 REW 顯示出在酸性 pH 下有大於 160 倍的較強結合力，但在中性 pH 下的測試條件中仍無法測得。與含有野生型 IgG1 Fc 區的英夫利昔單抗相比，該等抗體變異體皆顯示其對 FcRn 的結合提高。

表 6：藉由 SPR 所測定之抗 TNF α 抗體變異體對於 FcRn 的親和力

	pH 6.0			pH 7.4
	K _D (nM)	與 wt 的倍數 變化	與 IFX 的倍 數變化	K _D (nM)
Ab-wt	1000			NA
Ab-REW	5.61	178	75.8	NA
Ab-REW-2FF	6.24	160	68.1	NA
IFX	425			NA

NA: 因結合微弱而未獲得。

實例 5. 胞吞轉送

方法：

【0116】 具有膠原蛋白塗覆之聚四氟乙烯(PTFE)膜且孔徑為 $0.4\ \mu\text{m}$ 之細胞穿透濾器($1.12\ \text{cm}^2$)係於完全生長培養液中隔夜培養，接著在每孔中種入 1.0×10^6 的 T84 細胞。使用 MILLICELL-ERS-2 伏特-歐姆儀來監測經上皮層電阻(TEER)。在達到匯合之前培養物係以約 1000 至 $1300\ \Omega \times \text{cm}^2$ 的 TEER 值生長 4 至 5 天。在實驗之前，使該等單層在漢克平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) 中飢餓培養 1 小時。接著，將 400 nM 的抗體變異體或 IFX，單獨添加或與具有不相關特異性的 4000 nM 人類骨髓瘤 IgG 一起添加至頂側的通孔小室(Transwell chamber)。在添加後的 0 及 4 小時從基底貯存胞器收集樣本。於基底貯存胞器中的抗體濃度係藉由 ELISA 測定。簡言之，將於 PBS 中皆稀釋至 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 之重組 $\text{TNF}\alpha$ 抗體或來自山羊的抗人類 Fc 特異性抗體塗佈於 96 孔 Maxisorp 培養盤上過夜。隨後該等培養盤係在室溫下以含有 4%脫脂奶粉的 PBS 進行阻斷 2 小時，然後用含有 0.05% Tween 20 的 PBS 洗滌四次。於胞吞轉送實驗期間收集的樣本係添加至該等小孔中並在室溫下培養 2 小時，之後以上述方式洗滌。經捕獲的抗體變異體 IFX 或總 IgG 係使用來自山羊之與鹼性磷酸酶(ALP)共軛的抗人類 Fc 特異性抗體來偵測。結合係藉由添加 $100\ \mu\text{l}$ ALP 受質並記錄 405 nm 的吸光光譜而視覺化。經運輸之抗體變異體、IFX 及總 IgG 之數量係藉由各別抗體變異體的標準曲線來計算。

通過極化人類上皮細胞之抗體變異體胞吞轉送

結果：

【0117】 經工程改造的抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體變異體係經測試其通過細胞單層的胞吞轉送，並與野生型抗體或另一人類 IgG1 抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗體 IFX 進行比

較。結果係繪示於圖 2 中。野生型抗 TNF α 抗體係從頂部運輸到基底貯存胞器。與另一個具有野生型 Fc 區的 IgG1 抗體 IFX 相比，有 2.8 倍的更多 Ab-REW 被運輸通過，Ab-REW-2FF 的情況也是如此。

在存有競爭 IgG 下之通過極化人類上皮細胞之抗體變異體胞吞轉送

結果：

【0118】 於抗 TNF α 抗體變異體與 10 被過量的人類骨髓瘤 IgG 一起培養 4 小時之後，從頂部到基底貯存胞器運輸通過極化 T84 細胞單層的免疫球蛋白總量係相當於全部的抗體。然而，在 pH 6.0 下與 FcRn 的親和力增加會導致有顯著較高比例的特異性抗 TNF α 抗體運輸通過該細胞單層，在存有過量之特異性不相關的競爭人類 IgG 之形況下亦同。結果係繪示於圖 3 中。

實例 6. ADCC

方法：

【0119】 使用獲自 Promega 公司的 ADCC 報告生物測定核心套組。簡言之，將 1×10^5 /mL 的 mTNF α CHO-K1 標靶細胞種在白色（透明底）的組織培養盤上，每孔 100 μ L。該等培養盤係於 37°C/5% CO₂ 下隔夜培養。第二天，移除 95 μ L 的測定培養液並代之以 3×10^6 /mL 之 25 μ L 經工程改造的 Jurkat 效應細胞。接著將培養基於 37°C/5% CO₂ 下培養 6 小時。在培養結束時製備 BioGlo™ 試劑。於每孔添加 75 μ L 的 BioGlo™ 試劑之前，將培養盤置於室溫下 10 至 20 分鐘使其平衡。於黑暗中培養 5 至 10 分鐘之後，測量螢光。使用 4-PL 模式來擬合數據。

結果：

【0120】 結果（見圖 4）顯示全部的抗 TNF α 抗體誘導了 ADCC 但強度有所區別。與野生型抗體 Ab-wt 相比，該等抗體變異體顯示出 ADCC 增加。尤其該非岩藻醣化的抗體變異體 Ab-REW-2FF 有顯著增進的 ADCC。

實例 7. C1q 的結合

方法：

【0121】 ELISA 係使用 96 孔的 Maxisorp 培養盤執行，其中該等小孔係塗佈有於 PBS 中稀釋至 1 μ g/mL 的人類 TNF α 。於 4°C 下過夜培養後，該等培養盤係以含有 4%脫脂奶粉的 PBS 進行阻斷 1 小時，並用含有 0.05% Tween 20 (PBS-T)的 PBS 洗滌四次。接著，將滴定量的抗 TNF α IgG 抗體稀釋於 PBS-T 中，添加入並在室溫下培養 1 小時。於使用 PBS-T 洗滌之後，將稀釋於 0.1 M Veronal 緩衝液(0.25 mM CaCl₂ 及 0.8 mM MgCl₂ pH 7.2)中的人類 C1q (0.5 μ g/mL)添加至該等小孔中並培養 1 小時。隨後，該等小孔係以上述方式洗滌，之後將以 1:5000 稀釋於 PBS-T 中的兔子抗人類 C1q 添加至該等小孔中並培養 1 小時。洗滌之後，添加以 1:5000 稀釋於 PBS-T 中之來自於驢之與 HRP 共軛的抗兔子 IgG。隨後，該等小孔係經洗滌並添加 100 μ L 的 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺受質於每個小孔中。使用 Sunrise 分光光度計以 620 nm 測量吸光值。

結果：

【0122】 於添加人類 C1q 之前，該等抗 TNF α 抗體變異體係捕獲在人類 TNF α 上。該等結果（見圖 5）顯示該等抗體會結合 C1q 但結合強度有所區別。尤其，Ab-REW 及 Ab-REW-2FF 的結合係比 IFX 稍微強。在雙觸角結構上存在的岩藻醣連接到 N297 對於結合並沒有影響或只有輕微的影響。從最強至最弱的結合等級如下：Ab-REW > Ab-REW-2FF > IFX。

實例 8. CDC

方法：

【0123】 以抗 TNF α CDC 測定法測量兔子補體之抗體依賴型細胞毒性作用。將表現有 mTNF α 之標靶細胞種入存在有可促進補體的細胞毒性潛能之抗 TNF α 抗體的微量盤中。6 個獨立重複之樣本(抗 TNF α 抗體變異體)及 4 重複的參考標準物(IFX)係製備成 60 $\mu\text{g/mL}$ ，並連續稀釋(1.3 倍稀釋步驟)且將稀釋微量盤密封直至使用。含有 LUC 存活報告基因的標靶細胞係製備成 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ ，並儲存在 37°C 下的水浴中。將兔子補體於含高濃度葡萄糖的 DMEM 中稀釋至 3 倍的最終測試濃度。製備後立即以 1:1 的比例(v/v)使補體與標靶細胞結合。將 40 μL 的補體/標靶細胞製備物轉移到分析培養盤的每個孔中。將製備於稀釋微量盤中的抗體轉移到細胞中(20 μL /孔)並接著在 36°C/1% CO₂ 下培養 3.5 小時。於黑暗中將分析培養盤置於室溫下 35 分鐘使其平衡。Steady Glo 係於使用前置於環境溫度下 120 分鐘使其平衡，並添加至分析培養盤(20 μL /孔)，且於測量螢光值之前在室溫下儲存於黑暗中 35 分鐘。接著計算每個樣本在每個濃度下的細胞死亡率，並使用 4-PL 模型來擬合數據。

結果：

【0124】 該等結果係顯示於圖 6 及表 7 中。試驗細胞在 CDC 測定法中所表現出之相對的 EC₅₀ 及相對的最大死亡百分率結果提供了很清楚的活性次序，其結果在兩個活性測量中皆為一致。在不管岩藻糖的含量下，Ab-REW 顯示出比 IFX 更大的 CDC 活性。在直接比較岩藻糖變異體樣本之間時，為更能理解岩藻糖含量對於 CDC 活性的衝擊，Ab-REW-2FF 與 Ab-REW 相比下，可提供近似的 CDC 活性反應。這比較結果顯示出相對的 EC₅₀ 反應為 97.1% ，且相對的最大死亡百分率反應為 100.4%。

表 7：與 IFX 相比下，在相對的 EC₅₀ 及相對的死亡表現率方面之抗 TNF α 抗體變異體的 CDC 活性。

樣本編號	相對的 EC ₅₀ (%)	相對的最大死亡率 (%)
IFX	100	100
Ab-REW	123.7	113.8
Ab-REW-2FF	120.1	114.2

實例 9. 調節性巨噬細胞的誘導

方法：

【0125】 周邊血液單核細胞(PBMC)係從健康的白膜血球層中分離。通過 Ficoll 梯度離心法分離出細胞。將兩個捐贈者個體的細胞以相等數量混合，並將 2 x 10⁵ 個混合細胞以每孔 100 μ L 的總體積培養於 96 孔培養盤中。細胞係於 37°C/5% CO₂ 下培養 48 小時。48 小時之後，添加抗 TNF α 抗體變異體或 IFX 且達到最終濃度 10 μ g/mL。以五或六重複方式添加每一種化合物。最終體積為每孔 150 μ L。使用人類血清 IgG1 (Sigma #I5154)做為對照組。添加該等化合物之後，混合的淋巴球反應物(MLR)係於 37°C/5% CO₂ 下再培養 4 天。之後，用 PBS/5 mM EDTA (PBS/EDTA)洗滌培養盤並在室溫下以每孔 50 μ L 的 PBS/ EDTA 培養 20 分鐘。將培養盤離心而拂掉液體。將抗體稀釋於 PBS/EDTA (抗 CD14-PE、抗 CD206-APC，皆以 1:10 稀釋)中。使細胞重新懸浮在 50 μ L 的抗體溶液中並在室溫下培養 20 分鐘。之後，用 PBS/EDTA 洗滌細胞並重新懸浮在 50 μ L PBS/EDTA 之中。染色的樣本係於使用 FACSDiva 軟體的 FACS Fortessa 上分析。使用 FlowJo 軟體進行分析。

結果：

【0126】 調節性巨噬細胞之誘導係於四個獨立的 MLR 中分析並在全部實驗中獲得成功（與 IFX 及 IgG 對照組相比）。結果係顯示於圖 7 中。由 IFX 誘導的程度在該等實驗之間會因為每個實驗是使用具有個體差異的不同捐贈者進行而有所不同。全部經測試的抗 TNF α 抗體變異體皆誘導了 CD14⁺CD206⁺調節性巨噬細胞，該等化合物之間略有差異。Ab-REW 及 Ab-REW-2FF 係比 IFX 誘導出稍微較多的調節性巨噬細胞，然而，只有在 Ab-REW-2FF 的例子中顯著增長。

實例 10. T 細胞增生的抑制

方法：

【0127】 PBMC 係從健康者的白膜血球層中分離。通過 Ficoll 梯度離心法分離出細胞。將兩個捐贈者個體的細胞以相等數量混合，並將 2×10^5 個混合細胞以每孔 100 μ L 的總體積培養於 96 孔培養盤中。細胞係於 37°C/5% CO₂ 下培養 48 小時。48 小時之後，添加抗 TNF α 抗體變異體或 IFX 且達到最終濃度 10 μ g/mL。以五或六重複方式添加每一種化合物。最終體積為每孔 150 μ L。使用人類血清 IgG1 (Sigma #I5154) 做為對照組。添加該等化合物之後，混合的淋巴球反應物(MLR)係於 37°C/5% CO₂ 下再培養 2 天。之後，添加氘化胸苷於培養物（³H 胸苷，每孔 0.5 微居里）中。培養物係於 37°C/5% CO₂ 下再培養 18 小時。使用 Microbeta Filtermat 96 收集器來收集樣本，並使用配備有單偵測器之 Microbeta MicroplateCounter 微盤計數器來分析。以每孔 10 秒來計數樣本，並轉為每分鐘計數(cpm)。

結果：

【0128】 T 細胞增生的抑制係於三個獨立的 MLR 中測量並於 IFX 做為誘導抑制的陽性對照組時係定義為成功的。IFX 的抑制程度在個別實驗中可因為調節性巨噬細胞的誘導變動而推測為不同的。在每個實驗中，抗 TNF α 抗體變異體抑制 T 細胞增生的潛在性係與陽性對照組 IFX 相對計算。與 IFX 相比，抗體 Ab-REW-2FF 明顯顯示其抑制增強，而 Ab-REW 的抑制則與 IFX 相當（見圖 8）。

實例 11：N 型醣鏈的分析

方法：

【0129】 將 50 μ l 的每個 IgG 變異體(1 mg/ml)以 13,000 $\times$ g 離心 10 分鐘，之後添加 1 μ g 之溶解於 100 μ l 50 mM 碳酸氫銨(pH 7.8)中的胰蛋白酶並在 37°C 下過夜培養。離心裝置係以 13,000 $\times$ g 離心 10 分鐘，將流過液轉移到 Eppendorf 管並在 SpeedVac (真空濃縮機 Heto Maxi dry)中乾燥。將乾燥的樣本溶解於 20 μ l 1%的甲酸中，超音波震盪 30 秒，並以 16,100 $\times$ g 離心 10 分鐘。隨後，將每個樣本轉移到新的小管中，使用 Dionex Ultimate 3000 UHPLC 系統(Thermo Fisher Scientific, USA)執行蛋白分解性肽之反相(C18)奈米在線模式(nano online)液相層析串聯式質譜儀(LC-MS/MS)分析。將 5 μ l 的肽溶液注入萃接管柱中，以反吹操作模式將肽從萃接管柱溶析到分析管柱中。移動相係由乙腈及質譜儀等級的水所組成，其均含有 0.1%甲酸。使用二元梯度以 3 至 50%的乙腈水溶液及 0.3 μ l/min 的流速進行層析分離 60 分鐘。LC 系統係經由奈電噴灑離子源而耦合 Q Exactive Hybrid Quadrupole Orbitrap 質譜儀(Thermo Fisher Scientific, USA)。以高能量碰撞解離(HCD)破碎法來分析肽樣本，碰撞能量歸一化為 20，以質譜範圍 m/z 300-2000 取

得一次電場軌道阱(Orbitrap)勘查掃描，接著取得該電場軌道阱中十個最強的離子的 MS/MS。

【0130】 在 Xcalibur v2.0 上執行數據分析。全部 N-醣-肽的 MS/MS 光譜係藉由搜索氧陽離子而提取；204.086 (N-乙醯己糖胺)及 366.1388 (N-乙醯己糖胺-己糖)。藉由使用碰撞能量歸一化為 20 之 HCD 破碎來偵測 IgG 的醣結構及肽質量。目標醣-肽(IgG1 的 EEQYNSTYR)之萃取離子層析圖係以 10 ppm 的準確度且經人工驗證相應的 MS/MS 光譜。使用碰撞能量歸一化為 35 之 HCD 破碎來偵測肽的序列，並驗證肽的質量對應正確的肽序列。所有萃取的醣-肽之曲線下面積係經計算並判定每個醣形式的百分比率。

結果：

【0131】 Ab-REW 有兩個主要的 N 型醣鏈形式且對應大於 90%的總 N 型醣鏈庫，即 4GlcNac-1Fuc-3Man 及 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal。這兩種主要的 N 型醣鏈形式皆含有核心岩藻糖。為產生「非岩藻糖化」變化形的 Ab-REW (Ab-REW-2FF)，使用 2-脫氧-2-氟-1-岩藻糖(2FF)做為誘餌受質。此抗體的 MS 圖譜顯示出此策略成功地導致了岩藻糖的合併大大降低，偵測到的降幅從大於 90%降至 13%。處理後的主要 N 型醣鏈形式係與缺乏 2FF 時所產生的變異體相同，只是這些結構缺少岩藻糖（亦見圖 10）。

表 8：連接抗 TNF α IgG 抗體之 N297 的 N 型醣鏈形式比例

N型醣鏈結構	Ab-REW (%)	Ab-REW-2FF (%)
4GlcNac-1Fuc-3Man	69.1	8.5
4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal	21.7	4.5
4GlcNac-3Man	0.7	64.3
4GlcNac-3Man-1Gal	0	17.3
其他醣化形式	8.5	5.4

【序列表】

<110> 迪洛特醫藥有限公司(Tillotts Pharma AG)

<120> 抗體變異體

<130> PEP02929TIL-P012-Ab-REW

<140> TW107132681

<141> 2018-09-17

<150> EP17191989.7

<151> 2017-09-19

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab-wt的輕鏈，使用於實例中之經修飾抗體的親本抗體(殖株16-22-H05)

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser

859095

Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100105110

Leu Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
115120125

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
130135140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
145150155160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
165170175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
180185190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
195200205

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210215220

<210> 2
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab-wt的重鏈，使用於實例中之經修飾抗體的親本抗體(殖株16-22-H05)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr

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

Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
		275					280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
		355					360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				405					410					415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05?的CDR L1
<400> 3

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05的CDR L2

<400> 4

Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05的CDR L3

<400> 5

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05的CDR H1

<400> 6

Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05的CDR H2

<400> 7

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05的CDR H3

<400> 8

Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 122

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05的人源化IgG的VH

<400> 9

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株16-22-H05?的人源化IgG的VL
<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

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

Leu Gly

<210> 11
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab-REW的重鏈(基於殖株16-22-H05)

<400> 11

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
				245					250					255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
			260					265					270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
		275					280					285				
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
	290					295					300					
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
				325					330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
		340						345					350			
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
		355					360					365				
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
	370					375				380						
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
385					390					395					400	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
				405					410					415		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
		420						425					430			
Glu	His	Glu	Ala	Leu	His	Trp	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	

435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 12
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab-REW的重鏈(基於殖株17-22-B03)

<400> 12

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ala Gly
20 25 30

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

Ile Ala Cys Ile Asp Ser Arg Arg Glu Glu Ser Asp Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Asp Gly Val Asp Gly Ala Phe Asp
100 105 110

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

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

130					135					140						
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
145					150					155					160	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
165					170					175						
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
180					185					190						
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
195					200					205						
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
210					215					220						
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
245					250					255						
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
260					265					270						
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
275					280					285						
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
290					295					300						
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Arg	Asp	Trp	
305					310					315					320	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
325					330					335						

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Glu His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab-REW的Fc區(包含鉸鏈區)

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

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

225230

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株17-22-B03的CDR L1

<400> 14

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1510

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株17-22-B03的CDR L2

<400> 15

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
15

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

<220>
<223> 殖株17-22-B03的CDR L3

<400> 16

Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser Tyr Val Phe Arg Ala
1510

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 菌株17-22-B03的CDR H1

<400> 17

Gly Ile Asp Phe Ser Ala Gly Tyr Asp Met Cys
1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 菌株17-22-B03的CDR H2

<400> 18

Cys Ile Asp Ser Arg Arg Glu Glu Ser Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 菌株17-22-B03的CDR H3

<400> 19

Gly Gly Tyr Gly Gly Asp Gly Val Asp Gly Ala Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 菌株17-22-B03的人源化IgG的VH

<400> 20

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ala Gly
20 25 30

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

Ile Ala Cys Ile Asp Ser Arg Arg Glu Glu Ser Asp Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Asp Gly Val Asp Gly Ala Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株17-22-B03?的人源化IgG的VL (sc08)

<400> 21

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

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

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株17-22-B03?的人源化IgG的VL (sc02)

<400> 22

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

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

<210> 23
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株17-22-B03?的人源化IgG的輕鏈(sc08)

<400> 23

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 24
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 殖株17-22-B03?的人源化IgG的輕鏈(sc02)

<400> 24

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

申請專利範圍

1. 一種抗體，其為免疫球蛋白 G1 (IgG1)，其包括一 TNF α 結合域及一 FcRn 結合位點，該抗體在 pH 6 下對人類 FcRn 有高親和力，該高親和力的特徵為由表面電漿子共振所測定之解離平衡常數(K_D)小於 100 nM，且進一步在 pH 7.4 下對人類 FcRn 無親和力或有低親和力，該低親和力的特徵為由表面電漿子共振所測定之 K_D 大於 10 μ M，其中該抗體之胺基酸序列包括胺基酸 311R (EU 編號)、428E (EU 編號)及 434W (EU 編號)，且其中該抗體包含(i) V_L 結構域，其包含具有如 SEQ ID NO:3 所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:4 所示胺基酸序列之 CDR2 區及具有如 SEQ ID NO:5 所示胺基酸序列之 CDR3 區；以及(ii) V_H 結構域，其包含具有如 SEQ ID NO:6 所示胺基酸序列之 CDR1 區、具有如 SEQ ID NO:7 所示胺基酸序列之 CDR2 區及具有如 SEQ ID NO:8 所示胺基酸序列之 CDR3 區；其中該表面電漿子共振在 25°C 下進行。
2. 如請求項 1 之抗體，其為非岩藻醣化的抗體或岩藻醣化降低的抗體。
3. 一種如請求項 1 或 2 之抗體之用途，其係用於製備供治療發炎病狀的藥物。
4. 如請求項 3 之用途，其中該發炎病狀為胃腸道之發炎病症。
5. 如請求項 3 或 4 之用途，其中該治療包括口服施與有效量之該抗體。
6. 如請求項 3 或 4 之用途，其中該抗體係局部敷用。
7. 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 或 2 之抗體。

圖式

圖 1

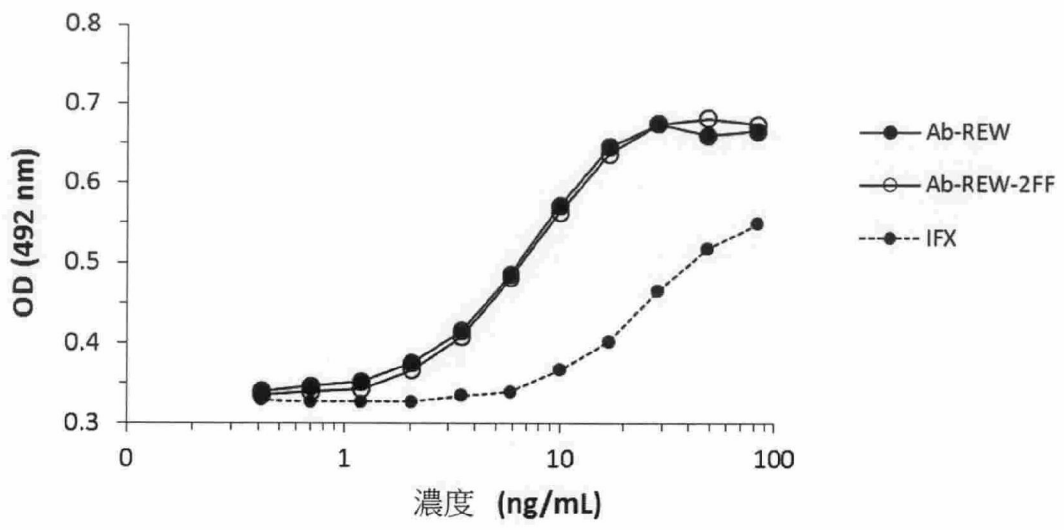


圖 2

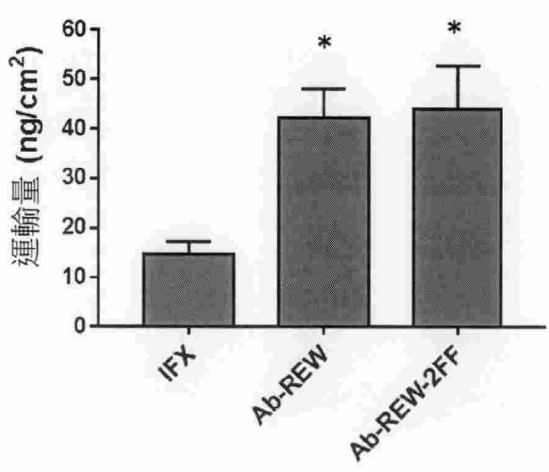


圖 3

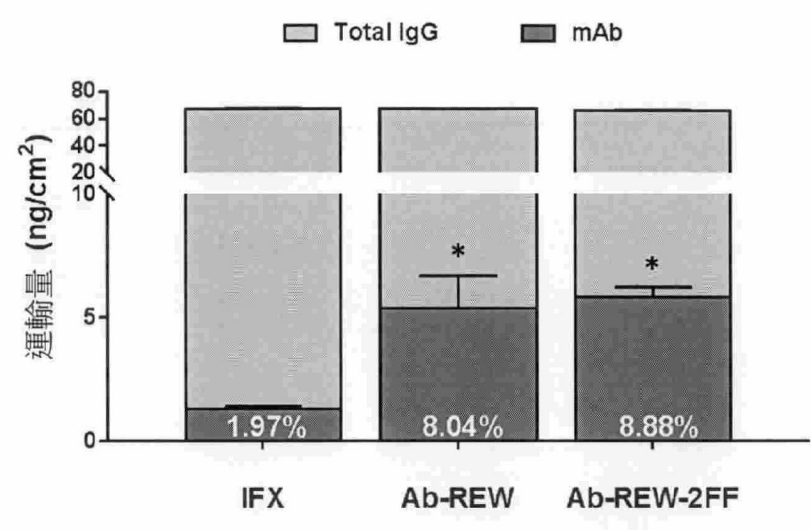


圖 4

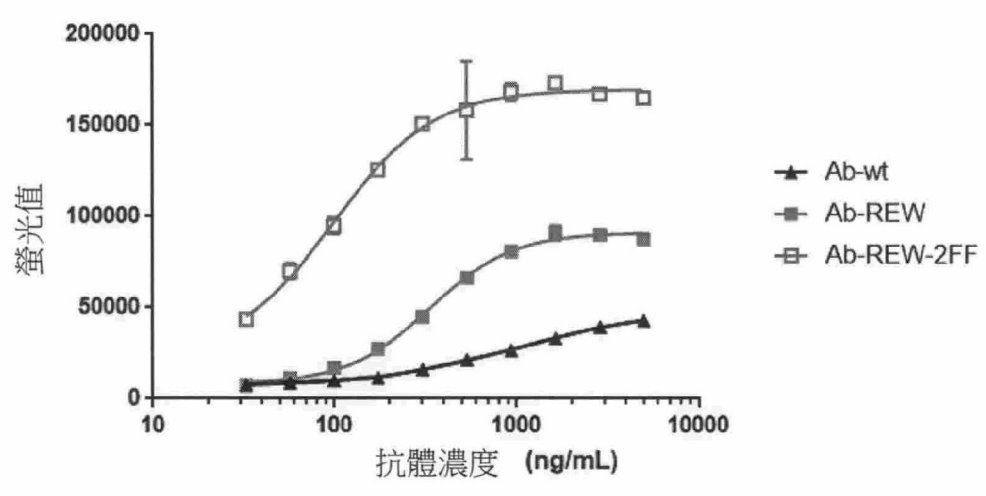


圖 5

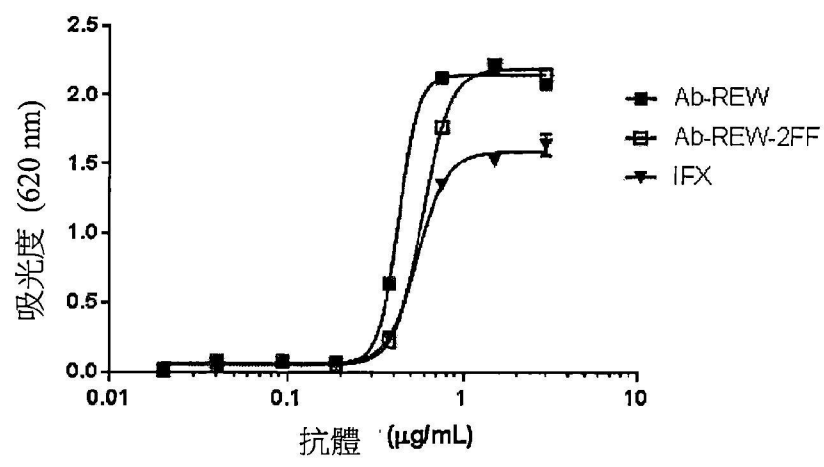


圖 6

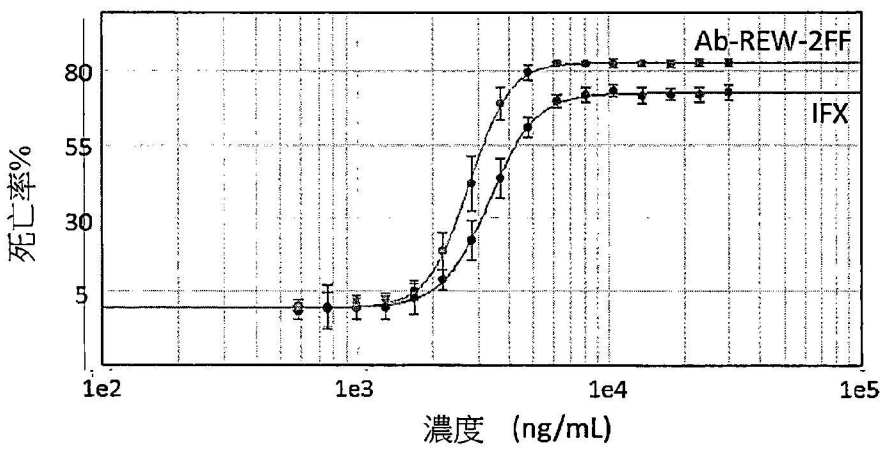
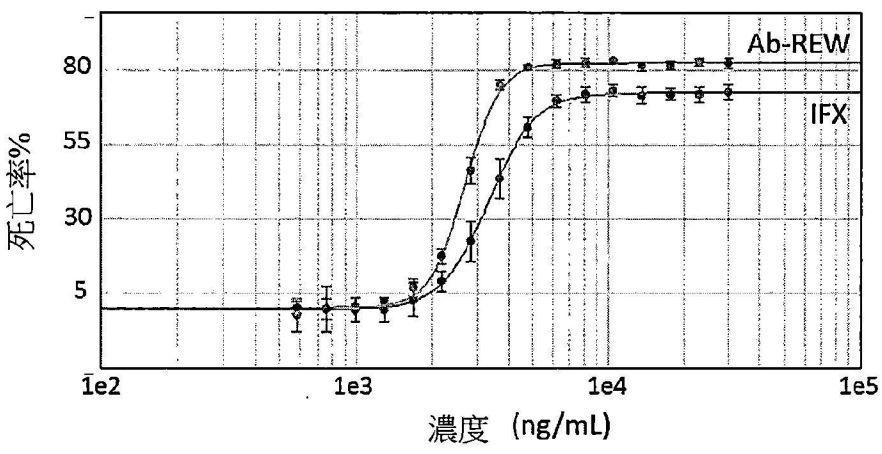


圖 7

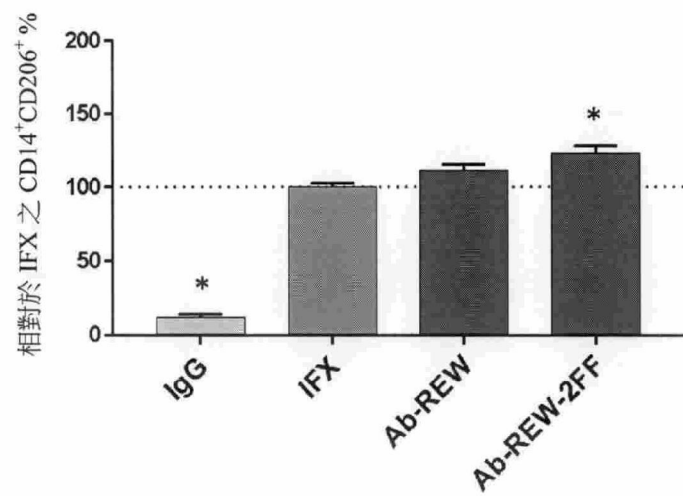


圖 8

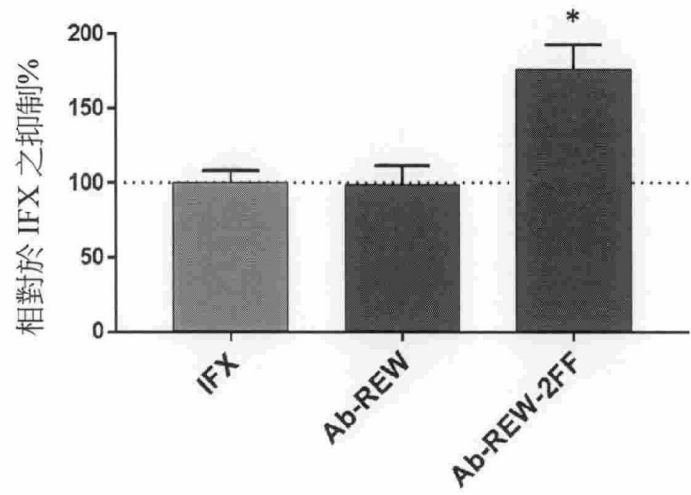


圖 9

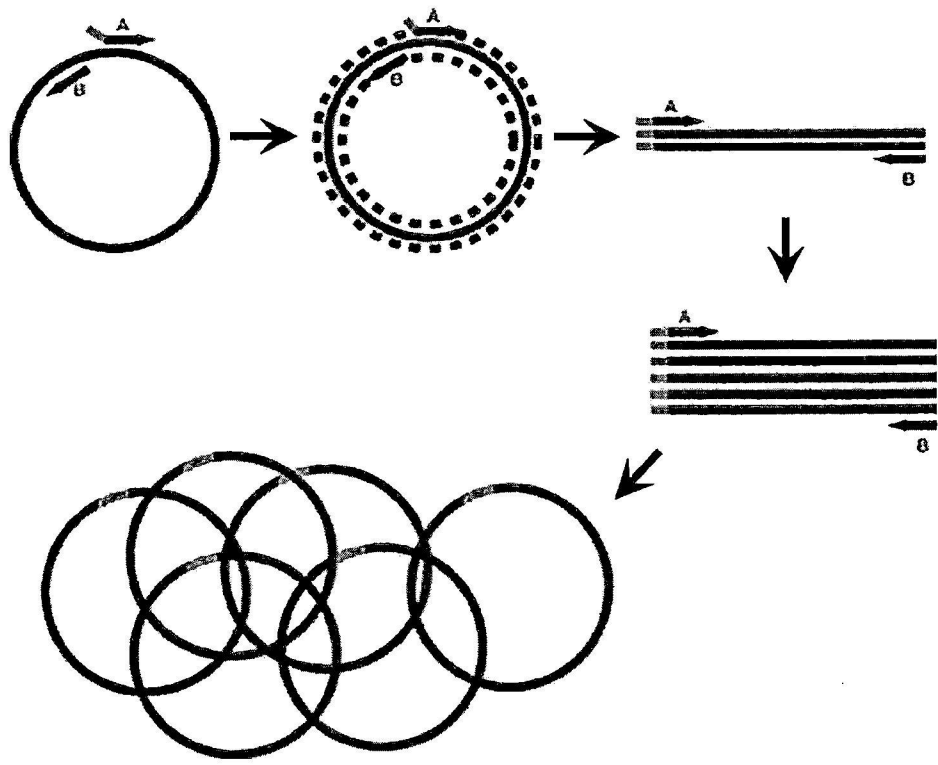


圖 10

