



(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 I632159 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：103104172

(51)Int. Cl. : **C07K16/24 (2006.01)**  
**A61P19/02 (2006.01)**  
**A61P37/00 (2006.01)**

(30)優先權：2013/02/08 美國 61/762,406

(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)  
 瑞士

(72)發明人：迪 帕多娃 法蘭科 E DI PADOVA, FRANCO E. (IT) ; 哈柏 湯瑪士 HUBER, THOMAS (CH) ; 羅狄恩 珍 米歇 瑞恩 RONDEAU, JEAN-MICHEL RENE (FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2011053763A2

WO 2012093254A1

審查人員：林桂滿

申請專利範圍項數：29 項 圖式數：25 共 240 頁

(54)名稱

抗 - I L - 1 7 A 抗體及其於治療自體免疫及發炎病症之用途

ANTI-IL-17A ANTIBODIES AND THEIR USE IN TREATING AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY DISORDERS

(57)摘要

本發明係關於特異性結合於促炎性細胞激素 IL-17A 之抗體及包含其抗原結合部分的蛋白質。更特定言之，本發明係關於作為 IL-17A 拮抗劑(抑制 IL-17A 及 IL-17AF 的活性)且能夠在活體外分析中抑制 IL-17A 誘發之細胞激素產生且在抗原誘發之關節炎之活體內模型中具有抑制作用的特異性抗體及蛋白質。本發明進一步關於使用該等抗體及蛋白質治療可藉由抑制 IL-17A 或 IL17AF 介導之活性而得到治療之病理性病症的組合物及方法，該等病理性病症為諸如類風濕性關節炎、牛皮癬、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、慢性阻塞性肺病、哮喘或囊腫性纖維化或其他自體免疫及發炎病症。

The present disclosure relates to antibodies and proteins comprising an antigen-binding portion thereof that specifically bind to the pro-inflammatory cytokine IL-17A. The disclosure more specifically relates to specific antibodies and proteins that are IL-17A antagonists (inhibit the activities of IL-17A and IL-17AF) and are capable of inhibiting IL-17A induced cytokine production in in vitro assays, and having an inhibitory effect in an antigen-induced arthritis model in vivo. The disclosure further relates to compositions and methods of use for said antibodies and proteins to treat pathological disorders that can be treated by inhibiting IL-17A or IL17AF mediated activity, such as rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythematosus (SLE), lupus nephritis, chronic obstructive pulmonary disease, asthma or cystic fibrosis or other autoimmune and inflammatory disorders.

指定代表圖：

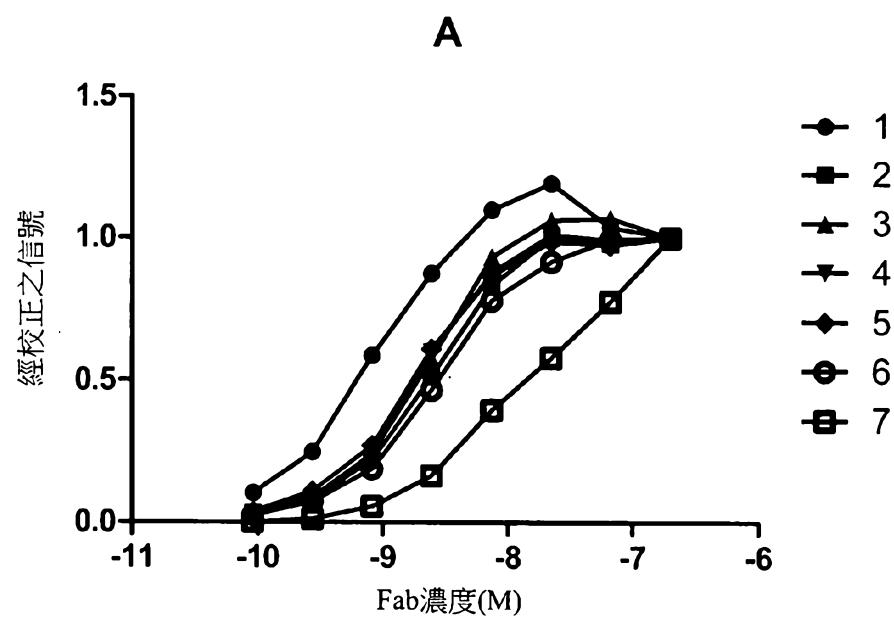


圖3A

I632159

## 發明摘要

※ 申請案號：103104172

※ 申請日： 103/02/07

※IPC 分類：C07K; A61K

### 【發明名稱】

抗-IL-17A抗體及其於治療自體免疫及發炎病症之用途

ANTI-IL-17A ANTIBODIES AND THEIR USE IN TREATING  
AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY DISORDERS

### 【中文】

本發明係關於特異性結合於促炎性細胞激素IL-17A之抗體及包含其抗原結合部分的蛋白質。更特定言之，本發明係關於作為IL-17A拮抗劑(抑制IL-17A及IL-17AF的活性)且能夠在活體外分析中抑制IL-17A誘發之細胞激素產生且在抗原誘發之關節炎之活體內模型中具有抑制作用的特異性抗體及蛋白質。本發明進一步關於使用該等抗體及蛋白質治療可藉由抑制IL-17A或IL17AF介導之活性而得到治療之病理性病症的組合物及方法，該等病理性病症為諸如類風濕性關節炎、牛皮癬、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、慢性阻塞性肺病、哮喘或囊腫性纖維化或其他自體免疫及發炎病症。

## 【英文】

The present disclosure relates to antibodies and proteins comprising an antigen-binding portion thereof that specifically bind to the pro-inflammatory cytokine IL-17A. The disclosure more specifically relates to specific antibodies and proteins that are IL-17A antagonists (inhibit the activities of IL-17A and IL-17AF) and are capable of inhibiting IL-17A induced cytokine production in *in vitro* assays, and having an inhibitory effect in an antigen-induced arthritis model *in vivo*. The disclosure further relates to compositions and methods of use for said antibodies and proteins to treat pathological disorders that can be treated by inhibiting IL-17A or IL17AF mediated activity, such as rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic lupus erythematosus (SLE), lupus nephritis, chronic obstructive pulmonary disease, asthma or cystic fibrosis or other autoimmune and inflammatory disorders.

**【代表圖】**

【本案指定代表圖】：第（3A）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

抗-IL-17A抗體及其於治療自體免疫及發炎病症之用途

ANTI-IL-17A ANTIBODIES AND THEIR USE IN TREATING  
AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY DISORDERS

## 相關申請案

本發明主張2013年2月8日申請之US 61/762406之優先權，US 61/762406以全文引用的方式併入本文中。

## 【技術領域】

本發明係關於特異性結合於IL-17A之抗體及包含其抗原結合部分的蛋白質。更特定言之，本發明係關於抑制IL-17A之效應且能夠抑制IL-17A誘發之活性的抗體及蛋白質，以及使用該等抗體及蛋白質例如治療可藉由抑制IL-17A信號傳導治療之病理性病症的組合物及方法，該等病理性病症為例如自體免疫及發炎病症，諸如類風濕性關節炎、牛皮癬、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、多發性硬化症或慢性阻塞性肺病、哮喘或囊腫性纖維化。

## 【先前技術】

介白素-17A(IL-17A，亦有時稱為IL-17)為由新定義的發炎T細胞子集(Th17細胞)所產生的中樞淋巴介質。在若干動物模型中，此等細胞為多種自體免疫及發炎過程的關鍵。IL-17A含量增加已與葡萄膜炎(Ambadi-Obi等人，2007, *Nature Med*; 13:711-718)、類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬、呼吸道發炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、發炎性腸病(克羅恩氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎)、同種異體移植排斥、癌症、腹膜內膿腫及黏連、及多發性硬化症(Weaver等人，2007, *Annu*

Rev Immunol; 25:821-852 ; Witowski等人 2004, Cell Mol Life Sci; 61:567-579)相關聯。Th17細胞可迅速引發由嗜中性白血球支配的發炎反應(Miossec等人, 2009, NEJM; 361:888-98)。

IL-17A最初確定為噬齒動物T細胞融合瘤的轉錄物。其為一組稱為IL-17家族的細胞激素的創建成員。IL-17A在噬齒動物中稱為CTLA8，相對於由嗜T淋巴細胞細長病毒屬猴痘病毒(herpesvirus saimiri)的開放閱讀框架所編碼的病毒IL-17A展示高同源性(Rouvier E等人, 1993, J. Immunol. 150: 5445-56)。

IL-17A為在延遲型反應中充當有效介體的細胞激素，藉由在多種組織中增加趨化因子產生以便募集單核細胞及嗜中性白血球至發炎部位，與干擾素 $\gamma$ 類似。IL-17家族發揮促發炎細胞激素對由胞外病原體侵襲免疫系統起反應的作用且誘發病原體細胞基質破壞。IL-17A與腫瘤壞死因子及介白素-1協同起作用(Miossec P等人, 2009, N. Engl. J. Med. 361:888-98)。

為引發其功能，IL-17A結合於稱為IL-17R之I型細胞表面受體，該受體存在至少兩種變化形式IL-17RA及IL-17RC(Pappu R等人, 2012, Trends Immunol.; 33:343-9)。IL-17RA結合IL-17A、IL-17AF及IL-17F且表現於多個組織中：血管內皮細胞、外周T細胞、B細胞系、纖維母細胞、肺、骨髓單核細胞及骨髓基質細胞(Kolls JK, Lindén A 2004, Immunity 21:467-76 ; Kawaguchi M等人, 2004, J. Allergy Clin. Immunol. 114:1265-73 ; Moseley TA等人, 2003, Cytokine Growth Factor Rev. 14:155-74)。

除IL-17A之外，IL-17家族的成員包括IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(亦稱為IL-25)及IL-17F。IL-17家族的所有成員具有類似蛋白結構，具有對其3維形狀關鍵的四個高度保守的半胱氨酸殘基。系譜分析揭示，在IL-17家族成員中，IL-17F同功異型物1及2(ML-1)

相對於IL-17A(分別與IL-17A共有55%及40%胺基酸一致性)具有最高同源性，接著為IL-17B(29%)、IL-17D(25%)、IL-17C(23%)及與IL-17A關係最遠的IL-17E(17%)。此等細胞激素在哺乳動物中均非常保守，在人類與小鼠同源物之間多達62-88%的胺基酸保守(Kolls JK, Lindén A 2004, *Immunity* 21:467-76)。

IL-17A為155個胺基酸的蛋白質，其為分子質量為35 kDa的二硫化物連結的均二聚體分泌醣蛋白(Kolls JK, Lindén A 2004, *Immunity* 21:467-76)。IL-17A之結構由信號肽繼之以表示IL-17家族特徵的胺基酸區組成。在標準SDS-PAGE分析中揭示兩條帶(一條處於15 kDa且另一條處於20 kDa)的蛋白質純化後，首先確定蛋白質上的N連結糖基化位點。IL-17家族不同成員的比較揭示形成兩個二硫鍵的四個保守半胱胺酸(Yao Z等人, 1995, *J. Immunol.* 155:5483-6)。IL-17因為其與其他已知介白素不相似而為獨特的。此外，IL-17與任何其他已知蛋白質或結構域不相似(Kolls JK, Lindén A 2004, *Immunity* 21:467-76)。一般，IL-17家族的其他成員(諸如IL-17F)形成均二聚體(如IL-17A)。

在某種情況下，亦已知IL-17A與IL-17F形成雜二聚體。雜二聚體IL-17AF亦在受IL-23刺激後由Th17細胞產生。

咸信IL-17AF經由如IL-17A及IL-17F之IL-17RA及IL-17RC受體信號傳導。IL-17AF之生物功能與IL-17A及IL-17F類似。除適當環境中之氣管嗜中性白血球增多之外，由IL-17AF刺激靶細胞誘發多種趨化因子產生。IL-17AF被視為在此等活性方面未比均二聚體IL-17A有效，但比均二聚體IL-17F有效。舉例而言，若IL-17A的效能為1，則IL-17AF之相對效能為約IL-17A的1/10且IL-17F的相對效能為約IL-17A的1/100。人類及小鼠IL-17AF均對小鼠細胞展示活性。IL-17AF由總共271個胺基酸組成且具有約30.7kDa的分子量(資料來自Shenandoah Biotechnology之人類IL-17AF雜二聚體的產品說明)。

已公開許多相關晶體結構。此等晶體結構包括均二聚體IL-17F的晶體結構(Hymowitz等人 2001, EMBO J, 19:5332-5341)。

亦已公開IL-17F與受體IL-17RA複合的晶體結構(Ely等人, 2009 Nature Immunology 10:1245-1251)。此外，已公開IL-17A與抗體之Fab片段複合的至少一個晶體結構(Gerhardt等人, 2009 Journal of Molecular Biology, 5:905-921)。

若干發炎疾病及自體免疫疾病(包括牛皮癬)與惡化的Th1及/或Th17反應相關。許多此等疾病目前用一般免疫抑制劑或並非在所有患者中有效的極具選擇性起效的生物製劑(諸如抗-TNF- $\alpha$ 抗體)治療。在重複治療後發現此等製劑增大感染風險且變得無效。因此，對具有增強的安全型態且同時具有誘發疾病長期緩解或治癒之能力的治療之醫學需要仍未滿足。

已報導細胞激素IL-17家族的許多免疫調節功能，假設歸因於其誘發許多免疫信號傳導分子。IL-17A最值得注意的作用為其涉及誘發及介導促發炎反應。IL-17A亦與過敏反應相關。IL-17誘發許多細胞類型(纖維母細胞、內皮細胞、上皮細胞、角質細胞及巨噬細胞)產生許多其他細胞激素(諸如IL-6、G-CSF、GM-CSF、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )、趨化因子(包括IL-8、GRO- $\alpha$ 及MCP-1)及前列腺素(例如PGE2)。細胞激素的釋放產生許多功能，諸如氣管重塑，亦即IL-17A反應的特徵。趨化因子的表現增加吸引其他細胞，包括嗜中性白血球而非嗜伊紅血球。IL-17功能亦對稱為T輔助細胞17(Th17)細胞的CD4+T細胞子集為必要的。由於此等作用，IL-17家族已與許多免疫/自體免疫相關疾病相連，包括類風濕性關節炎、哮喘、狼瘡、同種異體移植排斥及抗腫瘤免疫(Aggarwal S, Gurney AL 2002, J. Leukoc. Biol. 71:1-8)。另外，已與其他病狀相連，諸如骨關節炎、敗血症、敗血性或內毒素性休克、過敏性反應、骨質流失、牛皮癬、局部缺血、全身

性硬化症、纖維化及中風。

因此，需要拮抗IL-17A之效應且能夠抑制IL-17A誘發之活性的特異性抗體，且尤其使用該等抗體治療可藉由抑制IL-17A信號傳導治療之病理性病症的組合物及方法。

### 【發明內容】

因此，在一個態樣中，本發明提供一種經分離之抗體或包含抗體之抗原結合部分的蛋白質，包含與由SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3所編碼者具有至少95%一致性的CDR胺基酸序列，及與由SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 11所編碼者具有至少64%一致性的CDR胺基酸序列，且其中該抗體或分子特異性結合於均二聚體IL-17A及雜二聚體IL-17AF，但不特異性結合於均二聚體IL-17F。

在一個實施例中，IL-17A、IL-17AF或IL-17F係選自食蟹獼猴(cynomolgus monkey)、恆河獼猴(rhesus macaque monkey)、狨猴(marmoset monkey)、大鼠、小鼠或人類中之一或多者，諸如兩者或三者或三者以上。在一個特定實施例中，IL-17A、IL-17AF或IL-17F來自人類。在一個特定實施例中，IL-17A、IL-17AF或IL-17F來自人類及小鼠。在一個特定實施例中，IL-17A、IL-17AF或IL-17F來自食蟹獼猴、恆河獼猴、狨猴、大鼠、小鼠及人類。

在一個特定實施例中，本發明之經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，包含與SEQ ID NO: 12具有至少95%一致性之胺基酸序列及與SEQ ID NO: 43具有至少90%一致性之胺基酸序列。在一個實施例中，經分離之抗體或包含與SEQ ID NO: 14具有至少95%一致性之胺基酸序列，及與SEQ ID NO: 44具有至少95%一致性之胺基酸序列。

在一個實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白

質包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之CDR1、CDR2及CDR3域：a) SEQ ID NO: 73之輕鏈CDR1域，其中第一可變胺基酸係選自由Gly (G)及Val (V)組成之群；第二可變胺基酸係選自由Tyr (Y)、Asn (N)及Ile (I)組成之群；第三可變胺基酸係選自由Trp (W)及Ser (S)組成之群；且第四可變胺基酸係選自由Glu (E)及Ala (A)組成之群；b) SEQ ID NO: 74之輕鏈CDR2域，其中可變胺基酸係選自由Asn (N)及Gln (Q)組成之群；及c) SEQ ID NO: 75之輕鏈CDR3域，其中可變胺基酸係選自由Asn (N)及Asp (D)組成之群。

在一個實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含重鏈CDR，依次包含a) SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3；及輕鏈CDR，依次包含b) SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 11，c) SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，d) SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 11，e) SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 24，或f) SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含重鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3；及輕鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 11。

在另一特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含重鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3；及輕鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11。

在另一特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含重鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3；及輕鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 23及SEQ

ID NO: 11。

在另一特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含重鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3；及輕鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 24。

在另一特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含重鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 3；及輕鏈CDR，依次為SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11。

在一個實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含免疫球蛋白重鏈，包含a) SEQ ID NO: 12；及免疫球蛋白輕鏈，包含b) SEQ ID NO: 43、c) SEQ ID NO: 53、d) SEQ ID NO: 35、e) SEQ ID NO: 25或f) SEQ ID NO: 13。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 12之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 43之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 12之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 53之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 12之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 35之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 12之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 25之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之

蛋白質包含SEQ ID NO: 12之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 13之免疫球蛋白輕鏈。

在一個實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含免疫球蛋白重鏈，包含a) SEQ ID NO: 14；及免疫球蛋白輕鏈，包含b) SEQ ID NO: 44、c) SEQ ID NO: 54、d) SEQ ID NO: 36、e) SEQ ID NO: 26或f) SEQ ID NO: 15。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 14之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 44之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 14之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 54之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 14之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 36之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 14之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 26之免疫球蛋白輕鏈。

在一個特定實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含SEQ ID NO: 14之免疫球蛋白重鏈及SEQ ID NO: 15之免疫球蛋白輕鏈。

在本發明之一個態樣中，提供經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，其結合於與本發明特定實施例之經分離之抗體或分子相同的抗原決定基。

在一個實施例中，經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質結合於IL-17A抗原決定基(諸如人類IL-17A抗原決定基)，該抗原決

定基包含Arg78、Glu80及Trp90。

IL-17A抗原決定基可另外包含Tyr85或Arg124。

在一個實施例中，IL-17A抗原決定基(諸如人類IL-17A抗原決定基)另外包含Pro82、Ser87或Val88中之一或者者。

在本發明之一個態樣中，提供經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，其包含具有與特定實施例之抗體或分子等效的抗原決定基識別特徵的抗原識別表面。

在本發明之一個態樣中，提供經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，其與IL-17A(諸如人類IL-17A)或IL-17AF(諸如人類IL-17AF)之結合受到特定實施例之至少一種抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質交叉阻斷。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質不特異性結合於a)人類IL-17F均二聚體、IL-17B均二聚體、IL-17C均二聚體、IL-17D均二聚體、IL-17E均二聚體中之任一或者者，及/或b)食蟹獮猴IL-17F均二聚體、小鼠IL-17F均二聚體中之任一或者者，及/或c)選自由IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、gIFN、TNF  $\alpha$ 、EGF、GMCSF、TGF  $\beta$ 2組成之群之其他人類細胞激素中之任一或者者，及/或d)選自由IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL18、IL23、IFN或TNF組成之群之其他小鼠細胞激素中之任一或者者。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質結合於IL-17A(諸如人類IL-17A)，使得抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質抑制或阻斷IL-17A與其受體之間的結合，且降低或中和IL-17A活性。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質對人類IL-17A之結合親和力為100 nM或100 nM以下、10 nM或10 nM以下、1 nM或1 nM以下、100 pM或100 pM以下、或10 pM或10 pM以下，如由Biacore<sup>TM</sup>所量測。在一個特定實施例中，抗體或包含其抗原結合部

分之蛋白質對人類IL-17A之結合親和力低於200 pM或低於100 pM，如由Biacore<sup>TM</sup>所量測。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質能夠在活體外(較佳使用培養的軟骨細胞或纖維母細胞)評估時抑制IL-6分泌物或GRO- $\alpha$ 分泌物。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質能夠在抗原誘發之關節炎之活體內實驗模型(諸如大鼠AIA模型)中抑制膝蓋腫脹。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質與另一活性部分結合。

抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質可為單株抗體或其抗原結合部分，較佳為嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體或其部分。

在本發明之一個態樣中，提供醫藥組合物，包含本發明實施例之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑組合。

在一個實施例中，醫藥組合物包含一或多種額外活性成分。

在一個特定實施例中，該醫藥組合物為凍乾劑。在另一特定實施例中，醫藥組合物為包含治療可接受之量的本發明抗體或分子的液體調配物，其較佳製備為預填充注射器形式。

本發明進一步關於本發明之該抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質(詳言之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗體)之用途，其適用作藥劑，更佳用於治療藉由IL-17A所介導之病理性病症或可藉由抑制IL-17A信號傳導或IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌物治療之病理性病症。

在一個特定實施例中，本發明之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質可用於治療自體免疫及發炎病症，諸如關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬、慢性阻塞性肺病、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎

炎、哮喘、多發性硬化症或囊腫性纖維化。

在本發明之一個態樣中，提供本發明之該抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質(詳言之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗體)之用途，用於製造適用於治療藉由IL-17A所介導之病理性病症或可藉由抑制IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌物治療之病理性病症的藥劑。

在一個特定實施例中，藉由IL-17A所介導之病理性病症或可藉由抑制IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌物治療之病理性病症為發炎病症或病狀，諸如關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬、慢性阻塞性肺病、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、哮喘、多發性硬化症或囊腫性纖維化。

在本發明之一個態樣中，提供治療藉由IL-17A所介導之病理性病症或可藉由抑制IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌物治療之病理性病症的方法，該方法包含投與有效量本發明之經分離之抗體或分子(詳言之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗體)，使得病狀得以緩解。

在一個實施例中，病狀為發炎病症或病狀，諸如關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬、慢性阻塞性肺病、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、哮喘、多發性硬化症或囊腫性纖維化。

本發明亦關於用於產生本發明之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質的工具。該等工具包括至少編碼本發明之抗體或蛋白質之重鏈可變區及/或輕鏈可變區之經分離之核酸分子或包含該等核酸之選殖表現載體，尤其用於在宿主細胞中重組產生本發明之抗體或蛋白質，例如XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5。在一個特定實施例中，該選殖或表現載體包含至少一個選自由以下組成之群之核酸序列：SEQ ID NO: 18、31、51、19、28、32、38、40、46、48、52、56及58。在另一實施例中，其包含可操作地連接於合適啟動子序列之可變重鏈及輕鏈序列之以下編碼序列中之至少一者，選自由SEQ ID NO: 16、29、49、17、27、30、37、39、45、47、50、55及57組成之群，

其為熟習此項技術者所熟知的。

在一個實施例中，核酸分子為信使RNA (mRNA)。

本發明進一步關於包含一或多個如上所述之選殖或表現載體的宿主細胞，且關於產生本發明之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質(詳言之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5)的方法，該方法包含培養宿主細胞，純化及回收該抗體或蛋白質。

### 定義

為使本發明可更容易理解，首先定義某些術語。貫穿整個實施方式列出另外定義。

術語「免疫反應」係指例如淋巴細胞、抗原呈現細胞、吞噬細胞、粒細胞及由以上細胞或肝臟產生之可溶性巨分子(包括抗體、細胞激素及補體)對侵襲性病原體、受病原體感染之細胞或組織、癌細胞或(在自體免疫或病理性炎症的情況下)正常人類細胞或組織產生選擇性損害、破壞或使其自人體消除的行為。

「信號轉導路徑」或「信號傳導活性」係指一般由蛋白質-蛋白質相互作用(諸如生長因子與受體結合)引發，使信號自細胞之一部分傳輸至細胞之另一部分的生物化學因果關係。一般而言，傳輸涉及在引起信號轉導之反應系列中使一或多種蛋白質上之一或多個酪胺酸、絲胺酸或蘇胺酸殘基特異性磷酸化。次末過程(penultimate process)通常包括導致基因表現產生變化之核事件。

天然存在之「抗體」為包含經二硫鍵相互連接之至少兩條重(H)鏈及至少兩條輕(L)鏈的醣蛋白。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為V<sub>H</sub>)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為V<sub>L</sub>)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域，C<sub>L</sub>。V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>區可進一步再分為與較為保守之區(稱為構架區(FR))交替之高變區(稱為互補決定區(CDR))。各V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>由自胺基端

至羧基端按以下順序排列之3個CDR及4個FR組成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用的結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組份(C1q))的結合。

如本文中所用之術語「互補決定區」及「CDR」係指抗體可變區內賦予抗原特異性及結合親和力之胺基酸序列。一般，各重鏈可變區中存在三個CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)且各輕鏈可變區中存在三個CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

給定CDR之精確胺基酸序列邊界可使用許多熟知方案中之任一者來確定，包括由Kabat等人(1991)，「Sequences of Proteins of Immunological Interest,」第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(「Kabat」編號方案)；Al-Lazikani等人，(1997)JMB 273,927-948(「Chothia」編號方案)所述之方案。舉例而言，關於經典樣式，在Kabat下，重鏈可變區(VH)中之CDR胺基酸殘基編號為31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)及95-102(HCDR3)；且輕鏈可變區(VL)中之CDR胺基酸殘基編號為24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)及89-97(LCDR3)。在Chothia下，VH中之CDR胺基酸編號為26-32(HCDR1')、52-56(HCDR2')及95-102(HCDR3')；且VL中之胺基酸殘基編號為26-32(LCDR1')、50-52(LCDR2')及91-96(LCDR3')。藉由組合Kabat及Chothia之CDR定義，CDR由人類VH中之胺基酸殘基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)及95-102(HCDR3)以及人類VL中之24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)及89-97(LCDR3)組成。

如本文中所用術語抗體之「抗原結合部分」(或簡稱「抗原部分」)係指保留特異性結合於抗原(例如IL-17A之一部分)之能力之全長抗體或一或多個片段之抗體(諸如蛋白質)。已展示抗體之抗原結合功

能可由全長抗體之片段來執行。涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內之結合片段的實例包括Fab片段，其為由V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>及CH1域組成之單價片段；F(ab)<sub>2</sub>片段，其為在鉸鏈區包含兩個由二硫橋鍵連結之Fab片段的二價片段；由V<sub>H</sub>及CH1域組成之Fd片段；由抗體單臂之V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>域組成之Fv片段；由V<sub>H</sub>域組成之dAb片段(Ward等人1989, Nature 341:544-546)；及經分離之互補決定區(CDR)，或包含該抗原結合部分之任何融合蛋白。

因此，術語「抗原結合部分」亦可指可包含在如下所述諸如駱駝科抗體或『非抗體』分子之替代性構架或骨架內之對應於本發明抗體之部分。

此外，儘管Fv片段之兩個域(V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>)由獨立基因編碼，但可使用重組方法藉由合成連接子將其接合，使得能夠製備為V<sub>L</sub>區與V<sub>H</sub>區配對形成單價分子之單鏈蛋白質(稱為單鏈Fv (scFv)；例如參看Bird等人 1988, Science 242:423-426；及Huston等人 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。此等抗體片段使用熟習此項技術者已知的習知技術來獲得，且以與完整抗體相同之方式來就效用對該等片段進行篩檢。

如本文中所用，「經分離之抗體」係指實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體(例如特異性結合於IL-17A(諸如人類IL-17A)之經分離之抗體實質上不含特異性結合於除IL-17A以外之其他抗原的抗體)。然而，特異性結合於IL-17A之經分離之抗體可對其他抗原(諸如其他物種之IL-17A分子或IL-17A雜二聚體，諸如IL-17AF)具有交叉反應性。此外，經分離之抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學物質。

如本文中所用，術語「單株抗體」或「單株抗體組分」係指單分子組成之抗體分子的製劑。單株抗體組分顯示對於特定抗原決定基

之單一結合特異性及親和力。

除非另外描述，否則術語IL-17A係指如SEQ ID NO: 76或SEQ ID NO: 78中所定義之人類IL-17A。除非另外描述，否則術語IL-17F係指如SEQ ID NO: 77中所定義之人類IL-17F。如熟習此項技術者應瞭解，IL-17AF為IL-17A次單位及IL-17F次單位之雜二聚體。來自不同物種的用前綴「r」命名的重組蛋白質用於如下所述的分析中。舉例而言，重組人類IL-17A命名為rhuIL-17。熟習此項技術者知道如何使用此項技術中已知的起始物質及標準方案表現該等蛋白質。然而，為了幫助熟習此項技術者，除非另作說明，否則可使用以下胺基酸序列：食蟹獼猴(cyno)IL-17A，SEQ ID NO: 79；cynoIL-17F，SEQ ID NO: 80；恆河猴(rhesus)IL-17A，SEQ ID NO: 81；狨猴(marmoset)IL-17A，SEQ ID NO: 82；小鼠(m)IL-17A，SEQ ID NO: 83；mIL-17F，SEQ ID NO: 84，大鼠IL-17A，SEQ ID NO: 85；人類IL-17受體A(huIL-17RA)，SEQ ID NO: 86。如熟習此項技術者已知，上述序列可略微變化，亦即歸因於來源於不同群體。在實例中，工具抗體亦用於例如篩檢目的。該等抗體為標準抗體且可易於由熟習此項技術者獲得。

術語「抗原決定基」意謂能夠特異性結合於抗體之蛋白質決定子。抗原決定基通常由分子之化學活性表面分組(諸如胺基酸或糖側鏈)組成且通常具有特定三維結構特徵以及荷質比特徵。構形抗原決定基及非構形抗原決定基之區別在於在變性溶劑存在下與前者(而非後者)之結合消失。

術語「同型」係指由重鏈恆定區基因所提供之抗體種類(例如IgM、IgE、IgG，諸如IgG1或IgG4)。同型亦包括此等種類中之一者的修改版本，其中已進行修改以改變Fc功能，例如增強或降低效應功能或與Fc受體之結合。

如本文中所用，術語「人類抗體」意欲包括具有構架區與CDR區均源於人類來源之序列之可變區的抗體。此外，若抗體含有恆定區，恆定區亦源於該等人類序列(例如人類生殖系序列或人類生殖系序列之突變體版本)或含有源於人類構架序列分析之共同構架序列的抗體，例如，如Knappik等人, 2000, J Mol Biol 296:57-86)中所述。

「人類化」抗體為保留非人類抗體之反應性同時具有降低之人類免疫原性的抗體。其可例如藉由保留非人類CDR區且用其人類對應部分(亦即恆定區以及可變區之構架部分)替換抗體之剩餘部分來獲得。參見例如Morrison等人 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855；Morrison及Oi, 1988, Adv. Immunol., 44:65-92；Verhoeven等人 1988, Science, 239:1534-1536；Padlan 1991, Molec. Immun., 28:489-498；及Padlan 1994, Molec. Immun., 31:169-217。人類工程學技術之其他實例包括(但不限於)於US 5,766,886中所揭示之Xoma技術。

本發明之人類抗體可包括不由人類序列編碼之胺基酸殘基(例如，活體外藉由隨機或定點突變誘發或活體內藉由體細胞突變而引入之突變)。然而，如本文中所用之術語「人類抗體」不意欲包括源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系之CDR序列已移植於人類構架序列上之抗體。

術語「人類單株抗體」係指顯示單一結合特異性之抗體，其具有構架區與CDR區源於人類序列之可變區。

如本文中所用，術語「重組人類抗體」包括所有由重組方式製備、表現、產生或分離之人類抗體，諸如自人類免疫球蛋白基因之轉殖基因或轉染色體動物(例如小鼠)或由其製備之融合瘤分離之抗體，由經轉型以表現人類抗體之宿主細胞(例如由轉染瘤)分離之抗體，由重組組合型人類抗體庫分離之抗體，及由涉及所有或一部分人類免疫球蛋白基因序列與其他DNA序列拼接之任何其他方式製備、表現、產

生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有構架區與CDR區源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，該等重組人類抗體可經受活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時，則為活體內體細胞突變誘發)且因此重組抗體之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>區之胺基酸序列為如下序列，當源於人類生殖系V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列且與人類生殖系V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列相關時，其可能不活體內天然存在於人類抗體生殖系譜系內。

如本文中所用，「同型」係指由重鏈恆定區基因所提供之抗體種類(例如IgM、IgE、IgG，諸如IgG1或IgG4)。

片語「識別抗原之抗體」及「對抗原具特異性之抗體」在本文中可與術語「特異性結合於抗原之抗體」互換使用。

如本文中所用，「特異性結合於IL-17A多肽」之抗體或蛋白質意欲指以100 nM或100 nM以下、10 nM或10 nM以下、1 nM或1 nM以下、100 pM或100 pM以下、或10 pM或10 pM以下之K<sub>D</sub>結合於人類IL-17A多肽的抗體或蛋白質。「與除IL-17A以外之抗原交叉反應」之抗體意欲指以10 nM或10 nM以下、1 nM或1 nM以下、或100 pM或100 pM以下之K<sub>D</sub>結合抗原的抗體。「不與特定抗原交叉反應」之抗體意欲指以100 nM或100 nM以上之K<sub>D</sub>、或1 μM或1 μM以上之K<sub>D</sub>、或10 μM或10 μM以上之K<sub>D</sub>結合於抗原的抗體。在某些實施例中，該等不與抗原交叉反應之抗體在標準結合分析中展示基本上不可偵測之與此等蛋白質的結合。

如本文所用之術語「K<sub>assoc</sub>」或「K<sub>a</sub>」意欲指特定抗體-抗原相互作用之締合速率，而如本文所用之術語「K<sub>dis</sub>」或「K<sub>d</sub>」意欲指特定抗體-抗原相互作用之解離速率。

如本文所用之術語「K<sub>D</sub>」意欲指解離常數，由K<sub>d</sub>與K<sub>a</sub>之比率(亦即K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub>)獲得且以莫耳濃度(M)表示。抗體之K<sub>D</sub>值可使用此項技術中

明確的方法來測定。測定抗體 $K_D$ 之方法為藉由使用表面電漿子共振或使用生物感測器系統(諸如Biacore<sup>TM</sup>系統)，其為熟習此項技術者所熟知且如實例中所述操作。

可便利地在多種分析中測試IL-17與其受體結合之抑制，包括下文所述之該等分析。術語「至相同程度」意謂參考分子及等效分子在本文提及之一項分析中展現在統計學基礎上基本上相同的IL-17抑制活性(參見實例)。舉例而言，本發明之IL-17結合分子通常具有最大半抑制濃度( $IC_{50}$ )，關於人類IL-17對於人類表皮纖維母細胞中由人類IL-17誘發之IL-6產生的抑制，最大半抑制濃度在如實例中所述分析時各別參考分子之 $IC_{50}$ 值的 $+/-10^5$ 內，亦即該各別參考分子之 $IC_{50}$ 值的10 nM、更佳9、8、7、6、5、4、3或2 nM以下，較佳實質上與該各別參考分子之 $IC_{50}$ 值相同。或者，所用分析可為由可溶性IL-17受體及本發明之IL-17結合分子競爭性抑制IL-17結合之分析。

如本文中所用，術語「親和力」係指單一抗原位點處抗體與抗原之間相互作用之強度。在各抗原位點內，抗體「臂」之可變區經由弱非共價力在眾多位點處與抗原相互作用；相互作用愈大，親和力愈強。如本文中所用，術語IgG抗體或其片段(例如Fab片段)之「高親和力」係指抗體對目標抗原具有 $10^{-8}$  M或 $10^{-8}$  M以下、 $10^{-9}$  M或 $10^{-9}$  M以下、或 $10^{-10}$  M、或 $10^{-11}$  M或 $10^{-11}$  M以下、或 $10^{-12}$  M或 $10^{-12}$  M以下、或 $10^{-13}$  M或 $10^{-13}$  M以下之 $K_D$ 。然而，其他抗體同型之高親和力結合可10倍不同。舉例而言，IgM同型之高親和力結合係指抗體具有 $10^{-7}$  M或 $10^{-7}$  M以下、或 $10^{-8}$  M或 $10^{-8}$  M以下之 $K_D$ 。

如本文中所用，術語「親合力」係指抗體-抗原複合物之總穩定性或強度之資訊性量度。其受三個主要因素控制：抗體抗原決定基親和力；抗原與抗體二者之價數；及相互作用部分之結構排列。最終此等因素定義抗體之特異性，亦即特定抗體與正確抗原之抗原決定基結

合之可能性。

如本文中所用，抑制IL-17A結合於IL-17R之抗體或蛋白質意欲指在10 nM或10 nM以下之IC<sub>50</sub>值下，較佳在1 nM或1 nM以下之IC<sub>50</sub>值下，更佳在100 pM或100 pM以下之IC<sub>50</sub>值下抑制IL-17A結合於IL-17R之抗體或蛋白質，如活體外競爭性結合分析中所量測。該分析更詳細地描述於以下實例中。

如本文中所用，術語「IL-17A拮抗劑」或「IL-17A阻斷分子」意欲指經由IL-17R抑制IL-17A誘導之信號傳導活性且從而降低或中和IL-17A活性之抗體或蛋白質。其可展示於人類細胞分析中，諸如人類細胞中之IL-17A依賴型IL-6或GRO- $\alpha$ 產生分析。該分析更詳細地描述於以下實例中。在一些實施例中，本發明之抗體或蛋白質如活體外人類細胞分析中所量測，在10 nM或10 nM以下、1 nM或1 nM以下、或100 pM或100 pM以下之IC<sub>50</sub>值下抑制IL-17A依賴型IL-6或GRO- $\alpha$ 產生。該分析更詳細地描述於以下實例中。在一些實施例中，本發明之抗體或蛋白質在小鼠及大鼠之活體內分析中抑制抗原誘發之關節炎。該等分析更詳細地描述於以下實例中。

如本文中所用，術語「ADCC」或「抗體依賴型細胞毒性」活性係指細胞去除活性。ADCC活性可藉由熟習此項技術者所熟知的標準ADCC分析來量測。

如本文中所用，術語本發明抗體或蛋白質之「選擇性」係指抗體或蛋白質結合於某一目標多肽，而非緊密相關的多肽。短語「識別抗原之抗體」及「對抗原具有特異性之抗體」在本文中可與術語「特異性結合於抗原之抗體」互換使用。

術語「核酸」或「聚核苷酸」係指單股或雙股形式之脫氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特定限制，否則該術語涵蓋含有天然核苷酸之已知類似物的核酸，該等已知類似物具有與

參考核酸相似之結合特性且以與天然存在之核苷酸相似之方式代謝。(參見Kariko等人之美國專利第8,278,036號，其揭示尿苷經假尿苷置換之mRNA分子，其合成方法及活體內遞送治療性蛋白質之方法。)可使用封裝mRNA之方法，例如Kariko等人之美國專利第8,278,036號；及Moderna之專利申請案WO2013/090186A1中所揭示之方法。除非另有指示，否則特定核酸序列亦暗含其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)、對偶基因、直系同源物、SNP及互補序列以及明確地指示之序列。特定言之，簡併密碼子取代可藉由生成一或多個所選(或所有)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或脫氧肌苷殘基取代之序列來實現(Batzer等人，Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)；Ohtsuka等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)；及Rossolini等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

如本文中所用，術語「個體」包括任何人類動物或非人類動物。術語「非人類動物」包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類、綿羊、犬、貓、馬、牛、雞、兩棲動物、爬行動物等。如本文中所用，術語「cyno」或「食蟹獼猴」係指食蟹獼猴(*Macaca fascicularis*)。如本文中所用，術語「rhesus」或「恆河獼猴」係指恆河獼猴(*Macaca mulatta*)。如本文中所用，術語「狨猴」係指狨猴。

如本文中所用，術語「治療」任何疾病或病症(亦即類風濕性關節炎)在一個實施例中係指緩解疾病或病症(亦即減緩或阻止或減慢疾病之進展或其至少一種臨床症狀)。在另一實施例中，「治療」係指減輕或改善至少一項身體參數，包括患者可能無法辨別之身體參數。在另一實施例中，「治療」係指在身體上(例如穩定可辨別之症狀)、生理上(例如穩定身體參數)或兩方面調節疾病或病症。除非本文特定描述，否則用於評估疾病之治療及/或預防的方法一般為此項技術中已

知。

如本文中所用，關於患者之「選擇」用以意指特定患者特異性選自較大患者群，因特定患者具有預定準則。類似地，「選擇性治療患者」係指向因特定患者具有預定準則而特異性選自較大患者群的患者提供治療。類似地，「選擇性投與」係指向因特定患者具有預定準則而特異性選自較大患者群的患者投與藥物。

如本文所用，術語「最佳化」意謂核苷酸序列已經改變以使用在產生細胞或生物體，一般為真核細胞(例如畢赤酵母(*Pichia*)細胞、木黴(*Trichoderma*)細胞、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)或人類細胞)中為較佳之密碼子編碼胺基酸序列。最佳化核苷酸序列經工程改造以完全或儘可能多地保留最初由起始核苷酸序列編碼之胺基酸序列，其亦稱為「親本」序列。本文中之最佳化序列已經工程改造以具有在CHO哺乳動物細胞中為較佳的密碼子，然而在本文中亦設想此等序列在其他真核細胞中之最佳化表現。由最佳化核苷酸序列編碼之胺基酸序列亦稱為最佳化。

如本文中所用，兩個序列之間的一致性百分比為該等序列所共用之相同位置數之函數(亦即一致性% = 相同位置數 / 位置總數 × 100)，考慮為達成兩個序列之最佳比對所需要引入之空隙數及各空隙之長度。兩個序列之間的序列比較及一致性百分比之測定可使用數學算法達成，如下文所述。

兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用已併入ALIGN程式(2.0版)中之E. Meyers及W. Miller 1988, *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17之算法，使用PAM120權重殘基表(weight residue table)，12之空隙長度處罰及4之空隙處罰來測定。或者，兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用已併入GCG套裝軟體(可在<http://www.gcg.com>得到)中之GAP程式中的Needleman及Wunsch 1970, *J. Mol. Biol.* 48:444-453算

法，使用Blossom 62矩陣或PAM250矩陣及16、14、12、10、8、6或4之空隙權重及1、2、3、4、5或6之長度權重來測定。

亦可使用例如用於核酸序列之算法，諸如BLASTN程式確定兩個核苷酸胺基酸序列之間的一致性百分比，該程式使用字長(W)11、預期值(E)10、M = 5、N = 4及兩股之比較作為預設值。

術語「交叉阻斷」意謂在標準競爭性結合分析中抗體或其他結合劑干擾其他抗體或結合劑結合IL-17A之能力。

抗體或其他結合劑(諸如包含抗體之抗原結合部分之蛋白質)能夠干擾另一抗體或結合分子結合於IL-17A的能力或程度，且因此其是否可被認為本發明之交叉阻斷可使用標準競爭性結合分析測定。一個合適分析包括使用Biacore<sup>TM</sup>技術(例如藉由使用Biacore<sup>TM</sup> 3000儀器(Biacore<sup>TM</sup>, Uppsala, Sweden))，其可使用表面電漿子共振技術量測相互作用之程度。量測交叉阻斷之另一分析使用基於ELISA之方法。此等方法之更多詳情在實例中給出。

舉例而言，本文中例示之抗體(亦即XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5)及包含其抗原結合部分之蛋白質皆彼此「交叉阻斷」。此等抗體皆靶向IL-17A上之相同抗原決定基。預期其他交叉阻斷抗體結合於相同或相關抗原決定基。

根據本發明，本發明之交叉阻斷抗體或其他結合劑(諸如包含抗體之抗原結合部分之蛋白質)在所述Biacore<sup>TM</sup>交叉阻斷分析中結合於IL-17A，使得所記錄的抗體或結合劑之組合(混合物)的結合在兩種抗體或結合劑組合之最大理論結合(如上文所定義)的80%與0.1%之間(例如80%至4%)，特定言之在最大理論結合的75%與0.1%之間(例如75%至4%)，且更特定言之在70%與0.1%之間(例如70%至4%)，且更特定言之在最大理論結合的65%與0.1%之間(例如65%至4%)。

抗體在如實例中所述之ELISA分析中定義為交叉阻斷，若溶液相

抗-IL-17A抗體能夠導致IL-17A偵測信號(亦即由塗佈抗體結合之IL-17A的量)與不存在溶液相抗-IL-17A抗體(亦即陽性對照孔)所獲得之IL-17A偵測信號相比減少60%至100%，特定言之70%至100%，且更特定言之80%至100%。

### 【圖式簡單說明】

圖1提供XAB1 Fab之三維結構。圖1A為空間填充表示。圖1B為草圖表示。

圖2提供XAB1 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖2A展示空間填充表示之兩個XAB1 Fv片段且圖2B展示草圖表示之兩個XAB1 Fv片段。

圖3展示實例之ELISA結果的圖形。圖形編號對應於如下候選物名稱：1為MB440；2為MB464；3為MB468；4為MB444；5為MB435；6為MB463；7為XAB1。圖3A為展示經校正之信號與Fab濃度(M)之圖形。圖3B為展示經校正之剩餘信號與洗滌培育時間(小時)之圖形。圖3C為展示經校正之信號與Fab競爭者濃度(M)之圖形。

圖4提供XAB2 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖4A展示空間填充表示之兩個XAB2 Fv片段且圖4B展示草圖表示之兩個XAB2 Fv片段。

圖5提供XAB2 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構作為近視圖。

圖6提供XAB5 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖6A展示空間填充表示之兩個XAB5 Fv片段且圖6B展示草圖表示之兩個XAB5 Fv片段。

圖7提供XAB5 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構，作為抗體L-CDR1之近視圖。

圖8提供XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖8A展示

空間填充表示之兩個XAB4 Fv片段，圖8B展示草圖表示之兩個XAB4 Fv片段。

圖9提供XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構，作為抗體L-CDR1之近視圖。

圖10提供XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構，作為抗體L-CDR2之近視圖。

圖11為展示XAB4在實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)模型中之治療性計分的圖形。

圖12為展示EAE模型中動物之治療性重量變化(%)的圖形。

圖13為展示EAE模型中累積治療性計分之圖形。

圖14、15A及15B為EAE模型中治療前及治療後治療性計分之比較的圖形。

圖16為展示EAE模型中XAB4之預防性計分的圖形。

圖17為展示EAE模型中動物之預防性重量變化(%)的圖形。

圖18為展示EAE模型中累積預防性計分之圖形。

圖19為展示EAE模型中最大預防性計分之圖形。

圖20為展示EAE模型中EAE發作之圖形。

圖21A及21B為展示人類星形膠質細胞模型中XAB4對於IL-6釋放之拮抗效應的圖形。

圖22A及22B為展示人類星形膠質細胞模型中XAB4對於CXCL1釋放之拮抗效應的圖形。

圖23A及23B為展示人類星形膠質細胞模型中XAB4對於IL-8釋放之拮抗效應的圖形。

圖24A及24B為展示人類星形膠質細胞模型中XAB4對於GM-CSF釋放之拮抗效應的圖形。

圖25A及25B為展示人類星形膠質細胞模型中XAB4對於CCL2釋放之拮抗

效應的圖形。

### 【實施方式】

本發明部分基於特異性結合於均二聚體IL-17A及雜二聚體IL-17AF之抗體分子不特異性結合於均二聚體IL-17F的發現。本發明係關於兩種完整IgG樣式抗體以及包含其抗原結合部分之蛋白質，其將進一步描述於下文。

因此，本發明提供若干物種(諸如選自食蟹獼猴、恆河獼猴、狨猴、大鼠、小鼠或人類中之一或多者)之結合能力驚人相似的抗體以及包含其抗原結合部分之蛋白質，以及醫藥組合物、生產方法、及該等抗體及組合物之使用方法。

### 重組抗體

本發明之抗體包括人類重組抗體XAB1及抗體衍生物XAB2、XAB3、XAB4及XAB5，其由如下表1中所述之全長重鏈及輕鏈胺基酸序列衍生、分離及結構表徵。

**表1. XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之全長重鏈及輕鏈胺基酸序列。**

抗體	全長重鏈胺基酸序列	全長輕鏈胺基酸序列
XAB1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
XAB2	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 26
XAB3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 36
XAB4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 44
XAB5	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 54
序列一致性	100%	97%

本發明之該等經分離之抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5的對應可變區、V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>胺基酸序列展示於下表2中。

**表2. XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之可變重鏈及輕鏈胺基酸序列。**

抗體	可變重鏈胺基酸序列	可變輕鏈胺基酸序列
XAB1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
XAB2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
XAB3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 35

XAB4	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 43
XAB5	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 53
序列一致性	100%	94%

本發明之其他抗體包括具有已藉由胺基酸缺失、插入或取代突變之胺基酸，然而仍與如上所述之抗體(尤其在如上所述之序列中所描繪的CDR區中)具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、98%、99%或100%一致性的抗體。在一些實施例中，本發明之抗體為XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5中之任一者的突變體，其中該突變型變異抗體包括其中在與如上所述之序列中所描繪的CDR區相比時CDR區中至多1、2、3、4或5個胺基酸已藉由胺基酸缺失、插入或取代突變的突變胺基酸序列。

XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之全長輕鏈及重鏈核苷酸編碼序列展示於下表3中。

**表3.全長重鏈及輕鏈DNA編碼序列。**

抗體	全長重鏈DNA編碼序列	全長輕鏈DNA編碼序列
XAB1	SEQ ID NO: 18 , SEQ ID NO: 31 , SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 19
XAB2	SEQ ID NO: 18 , SEQ ID NO: 31 , SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 28 , SEQ ID NO: 32
XAB3	SEQ ID NO: 18 , SEQ ID NO: 31 , SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 38 , SEQ ID NO: 40
XAB4	SEQ ID NO: 18 , SEQ ID NO: 31 , SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 46 , SEQ ID NO: 48 , SEQ ID NO: 52
XAB5	SEQ ID NO: 18 , SEQ ID NO: 31 , SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 56 , SEQ ID NO: 58

XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之可變輕鏈及重鏈核苷酸編碼序列展示於下表4中。

**表4.可變重鏈及輕鏈胺基酸序列DNA編碼序列。**

抗體	可變重鏈DNA編碼序列	可變輕鏈DNA編碼序列
XAB1	SEQ ID NO: 16 ,	SEQ ID NO: 17

	SEQ ID NO: 29 , SEQ ID NO: 49	
XAB2	SEQ ID NO: 16 , SEQ ID NO: 29 , SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 27 , SEQ ID NO: 30
XAB3	SEQ ID NO: 16 , SEQ ID NO: 29 , SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 37 , SEQ ID NO: 39
XAB4	SEQ ID NO: 16 , SEQ ID NO: 29 , SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 45 , SEQ ID NO: 47 , SEQ ID NO: 50
XAB5	SEQ ID NO: 16 , SEQ ID NO: 29 , SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 55 , SEQ ID NO: 57

本發明之其他編碼抗體之核酸包括已藉由核苷酸缺失、插入或取代突變，然而仍與上述序列中或以下表5及表6中所描繪的CDR對應編碼區具有至少60、70、80、90、95或100百分比一致性的核酸。

在一些實施例中，其包括其中CDR編碼區中之至多1、2、3、4或5個核苷酸已藉由核苷酸缺失、插入或取代改變之變異體核酸及上述序列中或以下表5及表6中所描繪的CDR編碼區。

對於結合於相同抗原決定基之抗體， $V_H$ 、 $V_L$ 、全長輕鏈及全長重鏈序列(核苷酸序列及胺基酸序列)可「經混合且匹配」以創造本發明之其他抗-IL-17A結合分子。可使用上述結合分析或其他習知結合分析(例如ELISA)測試該等「經混合且匹配」抗體之IL-17A結合。當此等鏈經混合且匹配時，特定 $V_H/V_L$ 對之 $V_H$ 序列應以結構類似之 $V_H$ 序列置換。同樣，特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長重鏈序列應以結構類似之全長重鏈序列置換。同樣，特定 $V_H/V_L$ 對之 $V_L$ 序列應以結構類似之 $V_L$ 序列置換。同樣，特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長輕鏈序列應以結構類似之全長輕鏈序列置換。因此，在一個態樣中，本發明提供經分離之重組抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，其具有：包含選自由SEQ ID NO: 12組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區及包含選自由SEQ ID NO: 13、25、35、43及53組成之群之胺基酸序列的輕鏈

可變區；其中該等重鏈區及輕鏈區經選擇以使得該抗體特異性結合於 IL-17A。

本發明之些抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質的  $V_H$  CDR1(亦稱為HCDR1或HCDR1'，視所用CDR定義而定)、 $V_H$  CDR2(亦稱為HCDR2或HCDR2'，視所用CDR定義而定)、 $V_H$  CDR3(亦稱為HCDR1或HCDR1'，視所用CDR定義而定)、 $V_L$  CDR1(亦稱為LCDR1或LCDR1'，視所用CDR定義而定)、 $V_L$  CDR2(亦稱為LCDR2或LCDR2'，視所用CDR定義而定)、 $V_L$  CDR3(亦稱為HCDR3或HCDR3'，視所用CDR定義而定)的胺基酸序列實例展示於表5及表6中。

在表5中，使用Kabat系統描繪本發明一些抗體之CDR區(Kabat, E. A.等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版物第91-3242號，亦參見Zhao&Lu 2009, Molecular Immunology 47:694-700)

為方便讀取，當根據Kabat定義描繪CDR區時，該等CDR區在下文中分別稱為HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3。

**表5.根據Kabat定義之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5的CDR區**

原始抗體	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
XAB1	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
XAB2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
XAB3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
共同序列	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
序列一致性	100%	100%	100%	64 %	86%	89%

共同序列SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74及SEQ ID NO: 75包含許多可變胺基酸，命名為X。基於XAB2至XAB5序列之序列比對，SEQ ID NO: 73中之四個可變胺基酸宜根據以下來選擇：第一可變胺基酸(X1)可選自由Gly (G)及Val (V)組成之群；第二可變胺基酸(X2)可選自由Tyr (Y)、Asn (N)及Ile (I)組成之群；第三可變胺基酸(X3)可選自由Trp (W)及Ser (S)組成之群；且第四可變胺基酸(X4)可選自由Glu (E)及Ala (A)組成之群。SEQ ID NO: 9具有與SEQ ID NO: 22相比91%之序列一致性及與SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 42相比73%之序列一致性。SEQ ID NO: 22具有與SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 42相比64%之序列一致性。SEQ ID NO: 34具有與SEQ ID NO: 42相比91%之序列一致性。

類似地，SEQ ID NO: 74中的一個可變胺基酸宜根據以下來選擇：X1可選自由Asn (N)及Gln (Q)組成之群。SEQ ID NO: 10具有與SEQ ID NO: 23相比86%之序列一致性。

SEQ ID NO: 75中的一個可變胺基酸宜根據以下來選擇：X1可選自由Asn (N)及Asp (D)組成之群。SEQ ID NO: 11具有與SEQ ID NO: 24相比89%之序列一致性。

在表6中，使用Chothia系統，Al-Lazikani等人 1997, J. Mol. Biol. 273:927-948描繪本發明一些抗體之CDR區。為便於讀取，當根據Chothia定義描繪CDR區時，該等CDR區在下文分別稱為HCDR1'、HCDR2'、HCDR3'、LCDR1'、LCDR2'、LCDR3'。

**表6.根據Chothia定義之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5的CDR區。**

原始抗體	HCDR1'	HCDR2'	HCDR3'	LCDR1'	LCDR2'	LCDR3'
XAB1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21

XAB3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
共同序列	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 72
序列一致性	100%	100%	100%	43%	100%	83%

共同序列SEQ ID NO: 71及SEQ ID NO: 72包含許多可變胺基酸，命名為X。基於XAB2至XAB5序列之序列比對，SEQ ID NO: 71中之四個可變胺基酸宜根據以下來選擇：第一可變胺基酸(X1)可選自由Gly (G)及Val (V)組成之群；第二可變胺基酸(X2)可選自由Tyr (Y)、Asn (N)及Ile (I)組成之群；第三可變胺基酸(X3)可選自由Trp (W)及Ser (S)組成之群；且第四可變胺基酸(X4)可選自由Glu (E)及Ala (A)組成之群。SEQ ID NO: 4具有與SEQ ID NO: 20相比86%之序列一致性及與SEQ ID NO: 33及SEQ ID NO: 41相比57%之序列一致性。SEQ ID NO: 20具有與SEQ ID NO: 33及SEQ ID NO: 41相比43%之序列一致性。SEQ ID NO: 33具有與SEQ ID NO: 41相比86%之序列一致性。

類似地，SEQ ID NO: 72中的一個可變胺基酸宜根據以下來選擇：X1可選自由Asn (N)及Asp (D)組成之群。SEQ ID NO: 6具有與SEQ ID NO: 21相比86%之序列一致性。

假定此等抗體之每一者可結合於IL-17A且抗原結合特異性主要由CDR1、2及3區提供，V<sub>H</sub> CDR1、2及3序列及V<sub>L</sub> CDR1、2及3序列可「經混合且匹配」(亦即不同抗體之CDR可經混合且匹配，含有V<sub>H</sub> CDR1、2及3及V<sub>L</sub> CDR1、2及3之每個抗體創造本發明之其他抗-IL-17A結合分子)。可使用上述及實例中之結合分析或其他習知結合分析(例如ELISA)測試該等「經混合且匹配」抗體之IL-17A結合。當V<sub>H</sub> CDR序列經混合且匹配時，特定V<sub>H</sub>序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應以結構類似之CDR序列置換。同樣，當V<sub>L</sub> CDR序列經混合且匹

配時，特定  $V_L$  序列之 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 序列應以結構類似之 CDR 序列置換。新穎  $V_H$  及  $V_L$  序列可藉由以本文中所示本發明單株抗體之 CDR 序列的結構類似序列取代一或多個  $V_H$  及/或  $V_L$  CDR 區序列來創造應對一般熟習此項技術者易於顯而易見。

在一個實施例中，經分離之重組抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質具有：SEQ ID NO: 7 之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO: 8 之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO: 3 之重鏈可變區 CDR3；輕鏈可變區 CDR1，包含選自由 SEQ ID NO: 9、22、34、42 及 73 組成之群，且較佳選自由 SEQ ID NO: 9、22、34、42 組成之群之胺基酸序列；輕鏈可變區 CDR2，包含選自由 SEQ ID NO: 10、23 及 74 組成之群，且較佳選自由 SEQ ID NO: 10 及 23 組成之群之胺基酸序列；及輕鏈可變區 CDR3，包含選自由 SEQ ID NO: 11、24 及 75 組成之群且較佳選自由 SEQ ID NO: 11 及 24 組成之群之胺基酸序列；其中該等 CDR 區經選擇以使得本發明之抗體或蛋白質特異性結合於 IL-17A。

在另一實施例中，經分離之重組抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質具有：SEQ ID NO: 1 之重鏈可變區 HCDR1'；SEQ ID NO: 2 之重鏈可變區 HCDR2'；SEQ ID NO: 3 之重鏈可變區 HCDR3'；輕鏈可變區 LCDR1'，包含選自由 SEQ ID NO: 4、20、33、41 及 71 組成之群，且較佳選自由 SEQ ID NO: 4、20、33、41 組成之群之胺基酸序列；SEQ ID NO: 5 之輕鏈可變區 LCDR2'；及輕鏈可變區 LCDR3'，包含選自由 SEQ ID NO: 6、21 及 72 組成之群，且較佳選自由 SEQ ID NO: 6 及 21 組成之群之胺基酸序列；其中該等 CDR 區經選擇以使得本發明之抗體或蛋白質特異性結合於 IL-17A。

在某些實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 及 SEQ ID NO: 3；SEQ ID NO: 12；或 c) SEQ ID NO: 14。

如本文中所用，若人類抗體之可變區或全長鏈獲自使用人類生殖系免疫球蛋白基因之系統，則該抗體包含作為特定生殖系序列之「產物」或「源於」特定生殖系序列的重鏈或輕鏈可變區或全長重鏈或輕鏈。該等系統包括以受關注的抗原來使攜帶人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠免疫，或以受關注的抗原來篩檢在噬菌體上呈現之人類免疫球蛋白基因庫。作為人類生殖系免疫球蛋白序列之「產物」或「源於」人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可藉由將該人類抗體之胺基酸序列與人類生殖系免疫球蛋白之胺基酸序列相比較，及選擇序列最接近(亦即最大一致性%)該人類抗體之序列的人類生殖系免疫球蛋白序列來鑑定。作為特定人類生殖系免疫球蛋白序列之「產物」或「源於」特定人類生殖系免疫球蛋白序列的人類抗體相較於該生殖系序列可能由於例如天然存在之體細胞突變或有意引入之定點突變而含有胺基酸差異。然而，所選人類抗體之胺基酸序列通常與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少90%一致，且含有當與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如，鼠類生殖系序列)相比較時鑑定該人類抗體為人類抗體的胺基酸殘基。在某些情況下，人類抗體之胺基酸序列可與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少60%、70%、80%、90%或至少95%，或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。通常，源於特定人類生殖系序列之人類抗體與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列將呈現不大於10個胺基酸差異。在某些情況下，人類抗體與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列相比可呈現不超過5個，或甚至不超過4個、3個、2個或1個胺基酸差異。

在本發明中，已鑑定IL-17A上之抗原決定基，該抗原決定基作為可能的治療性抗體結合的目標尤其較佳。此抗原決定基由XAB1及已藉由修飾XAB1序列開發之變異抗體XAB2、XAB3、XAB4及XAB5

結合。此抗原決定基經發現位於IL-17A序列上殘基Arg 78與Trp 90之間。

抗原決定基可視為包含IL-17A內之以下最佳胺基酸殘基：Arg 78、Glu 80、Trp 90。此外，以下胺基酸殘基亦為較佳：Tyr 85、Arg 124。其他重要的胺基酸殘基為Pro 82、Ser 87、Val 88。其他有貢獻的胺基酸殘基為Val 45\*、Leu 49、Asp 81、Glu 83、Pro 86、Pro 130、Phe 133、Lys 137\*，其中以(\*)標記之胺基酸表示由均二聚體IL-17A之第二IL-17A次單位貢獻的殘基。

已展示以IL-17A上之此抗原決定基為目標的抗體阻斷IL-17A結合於其受體以抑制活體外IL-17A介導之效應，且降低抗原誘發之關節炎之實驗活體內模型的嚴重程度。此外，已出乎意料地展示結合於此抗原決定基之抗體抑制由IL-17AF雜二聚體所介導之活體外效應，且亦保留對源於小鼠之IL-17A及IL-17AF及目標分子之其他物種變體之出乎意料的高親和力。

因此，此抗原決定基尤其較佳，因為其亦出乎意料地以可接近的樣式保留在IL-17AF雜二聚體之結構內。因此，本發明之較佳抗體亦結合於IL-17AF雜二聚體。在不受理論限制的情況下，預期IL-17AF雜二聚體之結構足夠類似於IL-17A，或與本發明抗體之相互作用使其足夠類似於IL-17A，結合仍可出現。

此為出乎意料的，因為基於可獲得的IL-17A、IL-17F之結構的結構分析及已藉由X-射線結晶學獲得的此等分子與抗體或受體之間的相互作用(公佈於此項技術中且藉由本發明之發明者進行)與電腦預測組合表明本發明之抗體與IL-17AF的結合或交叉反應性不一定會出現。更特定言之，雜二聚體之IL-17F單體次單位的N端區經預測空間上阻礙本發明之抗體結合於IL-17AF雜二聚體。因此，預期抗體與IL-17AF沒有顯著的交叉反應性。

然而，儘管存在此等預測，但吾等已確定發生由所揭示之抗體交叉結合於IL-17AF。此可事實上出於許多原因而為有利的。如以上所討論，IL-17AF亦暗指為促炎性細胞激素且可涉及於許多與如關於IL-17A所述或懷疑相同的病理狀況或不合需要的生物事件中。本發明之抗體可因此尤其具有治療價值，因為其可靶向或干擾IL-17A及IL-17AF兩者。

此外，本發明之發明者已證明，本發明之抗體與IL-17AF之間的此結合亦如活體外分析中所觀察到的與IL-17AF生物活性之抑制相關。因此，本發明之抗體不僅有效靶向且拮抗/中和IL-17A活性，而且亦靶向且拮抗/中和IL-17AF活性。

由本發明之發明者所進行的研究的另一出乎意料的結果如下。原始『親本』抗體XAB1的親和力成熟亦已產生一組保留對源於其他物種(諸如食蟹獼猴、恆河獼猴、狨猴、大鼠或小鼠)之IL-17A變異體的高親和力或經改良之親和力的抗體。

此為出乎意料的，因為在力求改良本發明之抗體對人類IL-17A的親和力時，未預期亦改良所得抗體對IL-17A物種變異體的親和力。事實上，按理可能預期為相對立的。通常預期嘗試改良抗體對目標抗原之特異性物種變異體(亦即人類)的親和力會降低對該抗原之其他物種變異體之親和力。物種變異體(或同源物/旁系同源物)的概念承認給定物種的共同祖先，但接受經進化史過程已發生分歧。因此，即使已在不同物種中鑑定之特定分子的變異體之間存在良好的序列保守程度，但仍不能假定對一種物種變異體親和力的改良會改良對另一物種變異體的親和力。事實上，不同物種序列之間的分歧一般產生以下預期：對一種變異體之親和力的改良較可能引起對另一物種變異體之結合親和力的降低(或甚至消除)。小鼠與人類IL-17A之間的序列一致性僅為62%(Moseley等人 2003, Cytokine & Growth Factor Reviews

14:155-174)。

然而，此在本發明之情況下未觀察到，且由本發明之發明者生成之抗體變異體保留對其他物種之IL-17A變異體的高親和力。此為有用的，因為在開發候選抗體分子作為有用治療性分子所必需的研究期間，可能需要在其他物種中或對包含其他物種(諸如食蟹獼猴、恆河獼猴、狨猴、大鼠或小鼠))之組分或源於該等物種之組分的細胞、分子或系統進行多種測試及分析。此使得本發明之抗體尤其適用於進一步開發。

因此，如本文中所揭示之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質可共有一系列合乎需要的特性，包括對IL-17A之高親和力、與其他物種(諸如小鼠、大鼠、食蟹獼猴及狨猴)之IL-17A的交叉反應性、不存在對其他IL-17同型(諸如IL-17F)之交叉反應性、不存在對其他細胞激素(諸如人類或小鼠細胞激素)之交叉反應性、與雜二聚體IL-17AF之交叉反應性、阻斷IL-17A與其受體(諸如IL-17RA)結合之能力、抑制或中和IL-17A誘發之生物效應(諸如刺激IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌)之能力、及/或抑制由IL-17A(及/或IL-17AF)所介導之活體內效應(諸如在抗原誘發之關節炎模型中所觀察到的腫脹)之能力。

亦已展示如本文中所揭示之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質提供抗體-IL17A複合物的緩慢消除、配體的緩慢更新及長持續時間的IL17A捕捉。此等抗體及蛋白質之其他有利特徵提供於詳細的實施例中。

### **同源抗體**

在另一實施例中，如本文中所揭示之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質具有全長重鏈及輕鏈胺基酸序列；全長重鏈及輕鏈核苷酸序列、可變區重鏈及輕鏈核苷酸序列、或可變區重鏈及輕鏈胺基酸序列、或與上述(尤其表1中)抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5

之胺基酸或核昔酸序列同源的所有6個CDR區胺基酸序列或核昔酸編碼序列，且其中本發明之抗體或蛋白質保留原始XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5抗體之所需功能特性。

原始XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5抗體之所需功能特性可選自由以下組成之群：

(i) 對IL-17A之結合親和力(特異性結合於IL-17A)，例如 $K_D$ 為1 nM或1 nM以下、100 pM或100 pM以下、或10 pM或10 pM以下，如例如實例中所述的Biacore<sup>TM</sup>分析中所量測；

(ii) IL-17R結合於IL-17A之競爭性抑制，例如 $IC_{50}$ 值為10 nM或10 nM以下、或1 nM或1 nM以下、或100 pM或100 pM以下，如例如實例中所述的活體外競爭性結合分析中所量測；

(iii) IL-17A依賴型活性(例如IL-6或GRO- $\alpha$ 之產生)之抑制，例如 $IC_{50}$ 值為10 nM或10 nM以下、或1 nM或1 nM以下、或100 pM或100 pM以下，如實例中所述的細胞分析中所量測；

(iv) 所觀察到之效應(例如膝蓋腫脹)之抑制，如實例中所述之抗原誘發之關節炎之活體內分析中所量測；

(v) 與食蟹獼猴、恆河獼猴、大鼠或小鼠IL-17A多肽之交叉反應性；

(vi) 與人類或小鼠IL-17AF多肽之交叉反應性；

(vii) 對IL-17AF之結合親和力(特異性結合於IL-17AF)，例如 $K_D$ 為1 nM或1 nM以下、100 pM或100 pM以下、或10 pM或10 pM以下，如例如實例中所述之Biacore<sup>TM</sup>分析中所量測；

(viii) 抑制IL-17AF，例如 $IC_{50}$ 值為200 nM或200 nM以下、150 nM或150 nM以下、或100 nM或100 nM以下，如實例中所述之活體外競爭性結合分析中所量測；

(ix) 適用於藥物開發之特性，詳言之，其在高濃度(亦即大於50

mg/ml)下於調配物中為穩定的且未聚集。

舉例而言，本發明係關於XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之同源抗體(或包含其抗原結合部分之蛋白質)，其包含可變重鏈(V<sub>H</sub>)及可變輕鏈(V<sub>L</sub>)序列，其中CDR序列(亦即6個CDR區；HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3或HCDR1'、HCDR2'、HCDR3'、LCDR1'、LCDR2'、LCDR3')與XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5中之至少一個抗體的對應CDR序列共有至少60、70、90、95或100%序列一致性，其中該同源抗體或其抗原結合片段(諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)特異性結合於IL-17A，且該抗體或蛋白質展現以下功能特性中之至少一者：其抑制IL-17A與其受體結合、其在細胞分析中抑制IL-17A依賴型IL-6或GRO- $\alpha$ 產生、或抑制在抗原誘發之關節炎之活體內分析中所觀察到之效應。在相關特定實施例中，同源抗體或蛋白質以1 nM或1 nM以下之K<sub>D</sub>結合於IL-17A，且如活體外競爭性結合分析中所量測以1 nM或1 nM以下之IC<sub>50</sub>值抑制IL-17A與其受體結合。XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之CDR定義於上表5及表6中。

本發明進一步關於XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之同源抗體(或其抗原結合片段，諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)，其包含與抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的對應重鏈及輕鏈可變區至少80%、90%或至少95%或100%一致的重鏈可變區及輕鏈可變區，該同源抗體或蛋白質特異性結合於IL-17A，且其展現以下功能特性中之至少一者：其抑制IL-17A與其受體結合、其在細胞分析中抑制IL-17A依賴型IL-6或GRO- $\alpha$ 產生、或抑制在抗原誘發之關節炎之活體內分析中所觀察到之效應。在相關特定實施例中，同源抗體或其抗原結合片段(諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)以1 nM或1 nM以下之K<sub>D</sub>結合於IL-17A，且如活體外競爭性結合分析中所量測以1

nM或1 nM以下之IC<sub>50</sub>值抑制IL-17A與其受體結合。XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>胺基酸序列定義於上表2中。

在另一實例中，本發明係關於XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之同源抗體(或其抗原結合片段，諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)，其包含全長重鏈及全長輕鏈，其中：可變重鏈係由與XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之可變重鏈及輕鏈之對應編碼核苷酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%一致的核苷酸序列編碼，該同源抗體或其抗原結合片段(諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)特異性結合於IL-17A，且其展現以下功能特性中之至少一者：其抑制IL-17A與其受體結合、其在細胞分析中抑制IL-17A依賴型IL-6或GRO- $\alpha$ 產生、或抑制在抗原誘發之關節炎之活體內分析中所觀察到之效應。在相關特定實施例中，同源抗體或其抗原結合片段(諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)以1 nM或1 nM以下之K<sub>D</sub>結合於IL-17A，且如活體外競爭性結合分析中所量測以1 nM或1 nM以下之IC<sub>50</sub>值抑制結合於IL-17A。XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之可變區的編碼核苷酸序列可源於展示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之全長編碼核苷酸序列的表3及展示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之可變區之胺基酸序列的表2。

在各種實施例中，抗體或其抗原結合片段(諸如包含抗體之抗原結合部分之蛋白質)可展現上文論述之所需功能特性中之一或多者、兩者或兩者以上、三者或三者以上、或四者或四者以上。本發明之抗體或蛋白質可為例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。在一個實施例中，抗體或蛋白質為完全人類沉默抗體，諸如完全人類沉默IgG1抗體。

沉默效應功能可由抗體Fc恆定部分中之突變而獲得且已描述於Art: Strohl 2009 (LALA & N297A)；Baudino 2008, D265A (Baudino等

人 2008, J. Immunol. 181:6664-69, Strohl, CO 2009, Biotechnology 20:685-91)中。沉默IgG1抗體之實例包含在IgG1 Fc胺基酸序列中包含L234A及L235A突變之所謂LALA突變體。沉默IgG1抗體之另一實例包含D265A突變。D265A突變亦可較佳與P329A突變(DAPA)組合。另一沉默IgG1抗體包含N297A突變，其產生去糖基化抗體或非糖基化抗體。

具有突變胺基酸序列之抗體可藉由編碼核酸分子之突變誘發(例如定點突變誘發或PCR介導之突變誘發)，接著使用本文所述之功能分析測試所編碼之改變抗體之保留功能(亦即上文提出之功能)來獲得。

### 具有保守性修飾之抗體

在某些實施例中，本發明之抗體(或包含其抗原結合部分之蛋白質)具有包含HCDR1、HCDR2及HCDR3序列(或HCDR1'、HCDR2'及HCDR3')之重鏈可變區及包含LCDR1、LCDR2及LCDR3序列(或LCDR1'、LCDR2'及LCDR3')之輕鏈可變區，其中此等CDR序列中之一或者具有基於本文所述之抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之指定胺基酸序列或其保守性修飾，且其中該抗體或蛋白質保留本發明之抗-IL-17A抗體之所需功能特性。

如本文中所用，術語「保守性序列修飾」意欲指胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之胺基酸取代。具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族已在此項技術中進行定義。此等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天冬胺酸、穀胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、穀醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有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)、具有 $\beta$ -分支鏈側鏈之胺基酸

(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，本發明之抗體之CDR區內之一或多個胺基酸殘基可經來自同一側鏈家族之其他胺基酸殘基置換，且經改變之抗體可使用本文中所述之功能分析來測定其所保留之功能。

修飾可藉由此項技術中已知的標準技術(諸如定點突變誘發及PCR介導之突變誘發)引入如本文中所揭示之抗體中。

### 經工程改造及修飾之抗體

其他抗體及抗原結合片段(諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)可使用具有上文所示之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之一或多個V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>序列的抗體作為起始物質工程改造經修飾之抗體來製備，該經修飾之抗體可具有由起始抗體改變的特性。抗體可藉由修飾一或兩個可變區(亦即，V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>)中，例如一或多個CDR區中及/或一或多個構架區中之一或多個殘基而經工程改造。另外或替代地，抗體可藉由修飾在恆定區內之殘基例如以改變該抗體之效應功能來工程改造。

可進行之一種類型之可變區工程改造為CDR移植。抗體主要經由位於六個重鏈及輕鏈互補決定區(CDR)內之胺基酸殘基與目標抗原相互作用。出於此原因，在個別抗體之間，CDR內之胺基酸序列比CDR外之序列差異更大。因為CDR序列負責大部分抗體-抗原相互作用，所以可藉由構建包括移植於具有不同特性之不同抗體之構架序列上之特定天然存在之抗體之CDR序列的表現載體表現模擬特定天然存在之抗體之特性的重組抗體(參見例如Riechmann, L.等人 1998, Nature 332:323-327；Jones, P.等人 1986, Nature 321:522-525；Queen, C.等人 1989, Proc. Natl. Acad. 參見U.S.A. 86:10029-10033；Winter之美國專利第5,225,539號，及Queen等人之美國專利第5,530,101號；第

5,585,089號；第5,693,762號及第6,180,370號)

因此，本發明之另一實施例係關於經分離之重組CDR移植抗-IL-17A抗體，其包含如表5或表6中所定義之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的6個CDR區，然而仍含有原始抗體之不同構架序列。

可自包括生殖系抗體基因序列之公開DNA資料庫或已出版文獻獲得該等構架序列。舉例而言，人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列可見於「VBase」人類生殖系序列資料庫(可在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase網際網路上獲得)以及Kabat, E. A.等人，1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版物第91-3242號；Tomlinson, I. M.等人，1992, J. Mol. Biol. 227:776-798；及Cox, J. P. L.等人 1994, Eur. J Immunol. 24:827-836。

構架序列之實例為在結構上與XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者所用的構架序列類似的構架序列。 $V_H$  CDR1、2及3序列及 $V_L$  CDR1、2及3序列可移植於與產生構架序列之生殖系免疫球蛋白基因中所見的序列具有一致序列之構架區上，或者CDR序列可移植於與生殖系序列相比含有一或多個突變之構架區上。舉例而言，已發現在某些情況下，使構架區內之殘基突變以保持或增強抗體之抗原結合能力為有益的(參見例如Queen等人之美國專利第5,530,101號；第5,585,089號；第5,693,762號及第6,180,370號)。

另一類可變區修飾為使 $V_H$ 及/或 $V_L$  CDR1、CDR2及/或CDR3區內之胺基酸殘基突變以由此改良受關注抗體之一或多個結合特性(例如親和力)，稱為「親和力成熟」。可進行定點突變誘發或PCR介導之突變誘發以引入突變，且對抗體結合或其他受關注功能特性之影響可以如本文中所述及實例中所提供之活體外或活體內分析來評估。因此，

在一個實施例中，本發明係關於源於XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗體中之一者之親和力成熟抗體。可引入保守性修飾(如上文所論述)。該等突變可為胺基酸取代、添加或缺失。此外，通常CDR區內不大於1個、2個、3個、4個或5個殘基得以改變。舉例而言，本發明之抗體為包含XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之一者之6個CDR的親和力成熟抗體，且其中CDR區內不大於1個、2個、3個、4個或5個殘基得以改變。

因此，在另一實施例中，本發明提供經分離之經工程改造之抗-IL-17A抗體，其包含除了該等經工程改造之抗體之重鏈及/或輕鏈胺基酸序列與原始序列相比含有1個、2個、3個、4個或5個胺基酸取代、缺失或添加之外，與XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗體中之至少一者之對應重鏈及輕鏈可變區一致的重鏈可變區及輕鏈可變區。

### 將抗原結合域移植於替代構架或骨架中

可使用多種抗體/免疫球蛋白構架或骨架，只要所得多肽包括XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之至少一個特異性結合於IL-17A之結合區。該等構架或骨架包括5種主要個體基因型之人類免疫球蛋白，或其片段(諸如本文中別處所揭示者)，且包括較佳具有人類化態樣之其他動物物種之免疫球蛋白。諸如在駱駝科中得以鑑定之單一重鏈抗體在此方面尤其受關注。熟習此項技術者繼續發現及開發新穎的構架、骨架及片段。

在一個態樣中，本發明係關於使用上面可移植本發明之CDR的非免疫球蛋白骨架生成基於非免疫球蛋白之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質。可使用已知或將來的非免疫球蛋白構架及骨架，只要其包含對SEQ ID NO: 76之目標蛋白質具有特異性之結合區。該等化合物在本文中稱為「包含目標特異性結合區之多肽」。非免疫球蛋白構架

之實例進一步描述於以下部分中(駱駝科抗體及非抗體骨架)。

### 駱駝科抗體

自駱駝及單峰駝(雙峰駝(*Camelus bactrianus*)及單峰駝(*Calelus dromaderius*))家族成員(包括新世界成員，諸如美洲駝物種(羊駝(*Lama pacos*)、大羊駝(*Lama glama*)及瘦駝(*Lama vicugna*)))獲得之抗體蛋白已關於大小、結構複雜性及對人類個體之抗原性加以表徵。如自然界中所發現，來自此哺乳動物家族之某些IgG抗體缺乏輕鏈，且因此在結構上不同於來自其他動物之抗體具有兩條重鏈及兩條輕鏈之典型四鏈四級結構。參見PCT公開案第WO 94/04678號。

駱駝科抗體中鑑定為V<sub>HH</sub>之區(小型單一可變域)可藉由遺傳工程改造獲得，以產生對目標具有高親和力之小型蛋白質，從而得到源於抗體之低分子量蛋白質，稱作「駱駝科奈米抗體」。參見1998年6月2日頒佈之美國專利第5,759,808號；亦參見Stijlemans, B.等人 2004, J Biol Chem 279: 1256-1261；Dumoulin, M.等人 2003, Nature 424: 783-788；Pleschberger, M.等人 2003, Bioconjugate Chem 14: 440-448；Cortez-Retamozo, V.等人 2002, Int J Cancer 89: 456-62；及Lauwereys, M.等人 1998, EMBO J 17: 3512-3520。駱駝科抗體及抗體片段之經工程改造之庫可例如自Ablynx, Ghent, Belgium購得。如同其他非人類來源之抗體，駱駝科抗體之氨基酸序列可重組改變以獲得更密切類似於人類序列之序列，亦即，該奈米抗體可經「人類化」。因此，可進一步減小駱駝科抗體對人類之天然低抗原性。

駱駝科奈米抗體具有約為人類IgG分子之十分之一的分子量，且該蛋白質具有僅為幾奈米之物理直徑。小大小所引起之一結果為駱駝科奈米抗體結合功能上不可為較大抗體蛋白所見之抗原位點之能力，亦即駱駝科奈米抗體適用作偵測使用經典免疫技術另外隱藏之抗原之試劑且適用作可能之治療劑。因此，小大小所引起之另一結果為駱駝

科奈米抗體可由於與目標蛋白之凹槽或較窄間隙中之特異性位點結合而具有抑制作用，且因此可以與經典抗體之功能相比更接近經典低分子量藥物之功能的能力發揮作用。

低分子量及緊湊之大小進一步使駱駝科奈米抗體極其熱穩定，對極端pH值及蛋白水解消化穩定，且具有極弱抗原性。另一結果為駱駝科奈米抗體易於自循環系統移至組織中，且甚至跨過血腦屏障且可治療影響神經組織之病症。此外，奈米抗體可有利於藥物跨過血腦屏障輸送。參見2004年8月19日公開之美國專利公開案第20040161738號。此等特徵合併對人類之低抗原性指示巨大治療潛能。此外，此等分子可在原核細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*))中完全表現且在噬菌體中表現為融合蛋白且具有功能性。

經工程改造之奈米抗體可進一步藉由遺傳工程改造定製以使在接受個體中具有45分鐘至2週之半衰期。在一個特定實施例中，駱駝科抗體或奈米抗體係藉由將本發明人類抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之一者之重鏈或輕鏈的CDR序列移植於奈米抗體或單域抗體構架序列中來獲得，如例如PCT公開案第WO 94/04678號中所描述。

### 非抗體骨架

已知之非免疫球蛋白構架或骨架包括(但不限於)Adnectins(纖維結合蛋白)(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、錨蛋白(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、域抗體(Domantis, Ltd(Cambridge, MA)及Ablynx nv(Zwijnaarde, Belgium))、脂質運載蛋白(Anticalin)(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小分子免疫藥物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、麥克西抗體(maxybodies)(Avidia, Inc.(Mountain View, CA))、蛋白質A(Affibody AG, Sweden)及affilin( $\gamma$ -晶狀體蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle,

Germany)、蛋白質抗原決定基模擬劑 (Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland)。

**(a) 纖維結合蛋白骨架**

纖維結合蛋白骨架較佳基於III型纖維結合蛋白域(例如，III型纖維結合蛋白之第十個模組(10 Fn3域))。III型纖維結合蛋白域具有7條或8條分佈於兩個 $\beta$ 片之間的 $\beta$ 股，其本身彼此相抵靠緊以形成該蛋白質的核，且進一步含有將該等 $\beta$ 股彼此連接且經溶劑暴露之環(與CDR類似)。在 $\beta$ 片夾層之各邊緣處存在至少三個此類環，其中邊緣為該蛋白質垂直於 $\beta$ 股之方向的邊界(美國專利第6,818,418號)。

此等基於纖維結合蛋白之骨架不為免疫球蛋白，儘管總摺疊與包含駱駝(camel)及駱馬(llama)IgG中之完整抗原識別單元之最小功能抗體片段(重鏈之可變區)的總摺疊密切相關。由於此結構，非免疫球蛋白抗體模擬在本質及親和力上與抗體之抗原結合特性類似之抗原結合特性。此等骨架可用於與活體內抗體之親和力成熟的過程類似之活體外環隨機化及改組策略中。此等基於纖維結合蛋白之分子可用作骨架，其中該分子之環區可使用標準選殖技術經XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之一者的CDR置換。

**(b) 鑄蛋白-Molecular Partners**

該技術係基於使用具有源於鑄蛋白之重複模組的蛋白質作為用於承載可變區之骨架，該等可變區可用於與不同目標結合。鑄蛋白重複模組為由兩個反向平行 $\alpha$ 螺旋及一個 $\beta$ 轉角組成之33個胺基酸的多肽。可變區之結合主要藉由使用核糖體呈現來最佳化。

**(c) 麥克西抗體/高親和性多聚體(Avimer)-Avidia**

高親和性多聚體係源於含天然A域之蛋白質，諸如LRP-1。此等域本性上用於蛋白質-蛋白質相互作用且人類有250餘種蛋白質在結構上基於A域。高親和性多聚體由大量經由胺基酸連接子連接之不同

「A域」單體(2-10個)組成。可使用例如美國專利公開案第20040175756號、第20050053973號、第20050048512號及第20060008844號中所述之方法創造可結合於目標抗原的高親和性多聚體。

**(d) 蛋白質A-Affibody**

Affibody®親和力配體為由基於蛋白質A之一個IgG結合域的骨架之3螺旋束組成的小型單純蛋白質。蛋白質A為細菌金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之表面蛋白。此骨架域由58個胺基酸組成，隨機選擇其中13個胺基酸以產生具有大量配體變異體之Affibody®庫(參見例如美國專利第5,831,012號)。Affibody®分子模擬抗體；其具有6 kDa之分子量，與抗體之150 kDa之分子量形成對比。與Affibody®分子之大小無關，其結合位點仍與抗體之結合位點類似。

**(e) Anticalins-Pieris**

Anticalins®為由Pieris ProteoLab AG公司開發之產品。其係源於脂質運載蛋白，一大群小型且穩固之蛋白質，其通常與化學敏感性或不溶性化合物之生理輸送或儲存有關。若干種天然脂質運載蛋白存在於人類組織或體液中。

該蛋白質架構與免疫球蛋白類似，其中高變環位於剛性構架之頂部。然而，與抗體或其重組片段相反，脂質運載蛋白包含具有160至180個胺基酸殘基之單一多肽鏈，其僅略大於單一免疫球蛋白域。

構成結合袋之四個環之組展示顯著結構可塑性且帶有多個側鏈。該結合位點因此可在專有過程中再成形從而以高親和力及高特異性識別具有不同形狀之指定目標分子。

脂質運載蛋白家族之一種蛋白質大菜粉蛾(*Pieris Brassicae*)之後膽色素結合蛋白(BBP)已用以藉由誘變四個環之組來開發抗運載蛋白。描述「抗運載蛋白」之專利申請案之一個實例為PCT公開案WO

199916873。

**(f) Affilin-Scil Proteins**

Affilin<sup>TM</sup>分子為小型非免疫球蛋白蛋白質，其經設計以對蛋白質及小分子具有特異性親和力。新Affilin<sup>TM</sup>分子可極快速選自兩個庫，每一庫係基於不同的源於人類之骨架蛋白。

Affilin<sup>TM</sup>分子並不展示與免疫球蛋白蛋白質的任何結構同源性。Scil Proteins使用兩種Affilin<sup>TM</sup>骨架，其中之一者為 $\gamma$ 結晶，人類結構眼晶體蛋白，且另一者為「泛素」超家族蛋白。兩種人類骨架均極小，展示高溫穩定性且幾乎抗pH值變化及變性劑。此高穩定性主要歸因於該等蛋白質的 $\beta$ 片結構擴大。 $\gamma$ 結晶衍生之蛋白質的實例描述於WO200104144中且「泛素樣」蛋白質的實例描述於WO2004106368中。

**(g) 蛋白質抗原決定基模擬劑(PEM)**

PEM為中等大小環狀肽樣分子(MW 1-2 kDa)，其模擬蛋白質之 $\beta$ 髮夾二級結構，亦即蛋白質-蛋白質相互作用所涉及之主要二級結構。

**構架或Fc工程改造**

本發明之經工程改造之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質包括已對V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>內之構架殘基進行修飾以例如改良抗體特性之經工程改造之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質。通常進行該等構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「逆突變(backmutate)」成相應生殖系序列。更特定言之，已經受體細胞突變之抗體可含有與該抗體所源於之生殖系序列不同的構架殘基。該等殘基可藉由將該等抗體構架序列與該抗體所源於之生殖系序列相比較來鑑定。為使該等構架區序列回復至其生殖系組態，可藉由例如定點突變誘發或PCR介導之突變誘發來使體細胞突變「逆突變」

成生殖系序列。該等「經逆突變之」抗體亦意欲由本發明涵蓋。

另一種類型之構架修飾包含使構架區內，或甚至在一或多個CDR區內之一或多個殘基突變以去除T細胞抗原決定基以由此降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為「去免疫」，且進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第20030153043號中。

除構架區或CDR區內所作之修飾以外，或取而代之，本發明之抗體可經工程改造以包括Fc區內之修飾通常以改變該抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合及/或抗原依賴型細胞毒性。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如，可將一或多個化學部分附著於抗體上)或經修飾以改變其糖基化，再改變該抗體之一或多種功能特性。以下進一步詳細描述此等實施例中之每一者。

如本文中所用，術語「Fc區」用於定義免疫球蛋白重鏈之C端區，包括原生序列Fc區及變異Fc區。人類IgG重鏈Fc區一般定義為包含IgG抗體自位置C226或P230至羧基端的胺基酸殘基。Fc區中之殘基編號為Kabat之EU索引之編號。Fc區之C端離胺酸(殘基K447)可例如在抗體之產生或純化期間移除。因此，本發明抗體之組合物可包含所有K447殘基皆經移除之抗體群體、K447殘基未經移除之抗體群體及具有存在及不存在K447殘基之抗體之混合物的抗體群體。

在一個實施例中，CH1之鉸鏈區經修飾以使得該鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數得以改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1之鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數經改變以例如有利於輕鏈及重鏈之組裝或增強或降低抗體之穩定性。

在另一實施例中，抗體之Fc鉸鏈區經突變以減少抗體之生物半衰期。更特定言之，將一或多個胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區以使得抗體所具有的葡萄球菌蛋白質A(SpA)結合相對於

原生Fc鉸鏈域SpA結合削弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在另一實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質經修飾以增加其生物半衰期。多種方法可行。舉例而言，可引入以下突變中之一或更多者：如Ward之美國專利第6,277,375號中所述之T252L、T254S、T256F。或者，為增加生物半衰期，抗體可在CH1或CL區內經改變以含有自IgG之Fc區CH2域的兩個環獲取的救助受體結合抗原決定基，如Presta等人之美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

在其他實施例中，Fc區係藉由以不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基而經改變以改變抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質的效應功能。舉例而言，一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換以使得抗體所具有的對效應配體之親和力改變但保留親本抗體之抗原結合能力。對其之親和力改變之效應配體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法進一步詳細描述於Winter等人之美國專利第5,624,821號及第5,648,260號中。

在另一實施例中，可以不同胺基酸殘基置換選自胺基酸殘基之一或多個胺基酸以使得抗體具有改變之Clq結合及/或減弱或消除之補體依賴型細胞毒性(CDC)。此方法進一步詳細描述於Idusogie等人之美國專利第6,194,551號中。

在另一實施例中，一或多個胺基酸殘基經改變以由此改變抗體結合補體之能力。此方法進一步描述於Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351中。

在另一實施例中，Fc區係藉由修飾一或多個胺基酸而經修飾以增加抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質介導抗體依賴型細胞毒性(ADCC)之能力，及/或增加抗體對Fc $\gamma$ 受體之親和力。此方法進一步

描述於Presta之PCT公開案WO 00/42072中。此外，已繪製人類IgG1上Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII及FcRn之結合位點且已描述具有經改良之結合之變異體(參見Shields, R.L.等人 2001, J. Biol. Chem 276:6591-6604)。

在某些實施例中，使用IgG1同型之Fc域。在一些特定實施例中，使用IgG1 Fc片段之突變型變異體，例如減弱或消除融合多肽介導抗體依賴型細胞毒性(ADCC)及/或與Fc $\gamma$ 受體結合之能力的沉默IgG1 Fc。IgG1同型沉默突變體之實例為在胺基酸位置234及235處白胺酸經丙胺酸置換之IgG1，如Hezareh等人 2001, J. Virol 75:12161-8所述。IgG1同型沉默突變體之另一實例為具有D265A突變(在位置265處之天冬胺酸經丙胺酸取代)之IgG1。在某些實施例中，Fc域為防止該Fc域之位置297處發生糖基化之沉默Fc突變體。舉例而言，Fc域在位置297處含有天冬醯胺之胺基酸取代。該胺基酸取代之實例為由甘胺酸或丙胺酸置換N297。

在另一實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質的糖基化經修飾。舉例而言，可製備去糖基化抗體(亦即，缺乏糖基化之抗體)。可改變糖基化以例如增加抗體對抗原之親和力。可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點實現該等碳水化合物修飾。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，其消除一或多個可變區構架糖基化位點以由此消除彼位點處之糖基化。該去糖基化可增加抗體對抗原之親和力。該方法進一步詳細描述於Co等人之美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中。

另外或替代地，可製備具有經改變之糖基化類型的抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，諸如具有減少量岩藻糖基殘基之低岩藻糖基化抗體或具有增加平分型GlcNac結構之抗體。已證明該等經改變之糖基化型態將增加抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由例

如於糖基化機構改變之宿主細胞中表現抗體來實現。糖基化機構改變之細胞已在此項技術中得以描述且可用作表現本發明之重組抗體從而產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，Hang等人之EP 1 176 195描述具有經功能性破壞之FUT8基因的細胞株，該基因編碼岩藻糖基轉移酶以使得在該細胞株中得以表現之抗體展示低岩藻糖基化。因此，在一個實施例中，本發明抗體係藉由在展現低岩藻糖基化型態之細胞株，例如編碼岩藻糖基轉移酶之FUT8基因表現缺乏的哺乳動物細胞株中重組表現而產生。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述變異CHO細胞株Lecl3細胞，其使岩藻糖附著於Asn(297)-連接之碳水化合物的能力降低，亦導致表現於該宿主細胞中之抗體低岩藻糖基化(亦參見Shields, R.L.等人 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述經工程改造以表現醣蛋白修飾糖基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N乙醯葡萄糖胺轉移酶III (GnTIII))之細胞株，使得在該等經工程改造之細胞株中表現之抗體展現平分型GlcNac結構增加，引起抗體之ADCC活性增加(亦參見Umana等人 1999, Nat. Biotech. 17:176-180)。或者，本發明之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質可在經工程改造成哺乳動物樣糖基化型態且能夠產生缺乏岩藻糖作為糖基化型態之抗體的酵母或絲狀真菌中產生(參見例如EP 1 297 172)。

本發明所涵蓋之如本文中所揭示之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質的另一修飾為聚乙二醇化。此等分子可經聚乙二醇化以例如增加其生物(例如血清)半衰期。舉例而言，為使抗體聚乙二醇化，通常使該抗體或其片段與聚乙二醇(PEG)，諸如PEG之反應性酯或醛衍生物在一或多個PEG基團附著於該抗體或抗體片段上之條件下反應。聚乙二醇化可經由與反應性PEG分子(或類似反應性水可溶聚合物)之醯化反應或烷基化反應來進行。如本文中所用，術語「聚乙二醇」意

欲涵蓋已用以使其他蛋白質衍生化之任何形式之PEG，諸如單(C1-C10)烷氧基聚乙二醇或單(C1-C10)芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-馬來醯亞胺。在某些實施例中，待聚乙二醇化之抗體為去糖基化之抗體。用於使蛋白質聚乙二醇化之方法在此項技術中已知且可應用於本發明之抗體。參見例如Nishimura等人之EP 0 154 316及Ishikawa等人之EP 0 401 384。

本發明所涵蓋之抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質的另一修飾為本發明抗體之至少抗原結合區與血清蛋白(諸如人類血清白蛋白或其片段)之結合物或蛋白質融合體，以增加所得分子之半衰期。該方法例如描述於Ballance等人之EP 0 322 094中。

另一可能性為本發明抗體的至少抗原結合區與能夠結合血清蛋白(諸如人類血清白蛋白)之蛋白質之融合體以增加所得分子之半衰期。該方法例如描述於Nygren等人之EP 0 486 525中。

### 工程改造經改變之抗體的方法

如上文所論述，具有本文中所示之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列或全長重鏈及輕鏈序列之抗-IL-17A抗體可藉由修飾全長重鏈及/或輕鏈序列、V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>序列、或與其連接之恆定區來用於創造新的抗-IL-17A抗體。因此，在本發明之另一態樣中，本發明之抗-IL-17A抗體的結構特徵用以創造在結構上相關的抗-IL-17A抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，其保留本文中所揭示之抗體的至少一個功能特性，諸如結合於人類IL-17A以及抑制IL-17A之一或多個功能特性(例如抑制IL-17A或IL-17AF與其受體結合、抑制IL-17A或IL-17AF誘發之IL-6、GRO- $\alpha$ 之產生等)在活體內分析中之抑制活性。

保留實質上相同的對IL-17A的結合特性的其他抗體包括XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的嵌合抗體或CDR移植抗體，其保留XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的相同

VH及VL區或CDR區及不同恆定區或構架區(例如選自不同同型(例如IgG4或IgG2)的不同Fc區)。

舉例而言，XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者之一或多個CDR區或其突變可以重組方式與已知構架區及/或其他CDR組合以創造本發明之額外經重組工程改造的抗-IL-17A抗體，如上文所論述。其他類型之修飾包括先前部分中所述之修飾。工程改造方法之起始物質為上表提供之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>序列中之一或多者、或其一或多個CDR區。為創造經工程改造之抗體，不一定實際上製備(亦即表現為蛋白質)具有XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>序列中之一或多者、或其一或多個CDR區之抗體。相反地，該等序列中所含有之資訊用作起始物質以創造源於原始序列之「第二代」序列，且隨後「第二代」序列得以製備且表現為蛋白質。

第二代序列例如藉由以下步驟而得到：在XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的重鏈可變區抗體序列及/或輕鏈可變區抗體序列內改變至少一個胺基酸殘基的DNA編碼序列，以創造至少一個經改變之抗體序列；及將該經改變之抗體序列表現為蛋白質。

因此，在另一實施例中，本發明提供一種製備為在哺乳動物細胞中表現而經最佳化之抗-IL-17A抗體之方法，該方法由以下組成：XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的全長重鏈抗體序列、全長輕鏈抗體序列；改變核苷酸編碼序列中之至少一個密碼子，該密碼子編碼該全長重鏈抗體序列及/或該全長輕鏈抗體序列內之胺基酸殘基，以創造至少一個經改變之抗體序列；及將該經改變之抗體序列表現為蛋白質。

經改變之抗體序列亦可藉由篩檢分別具有XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者之唯一重鏈及輕鏈CDR3序列、或如

美國專利公開案第20050255552號中所述之必不可少的最小結合決定子及CDR1及CDR2序列之替代序列的抗體庫來製備。篩檢可根據適合於自抗體庫篩檢抗體之任何篩檢技術(諸如噬菌體呈現技術)執行。

標準分子生物學技術可用以製備及表現經改變之抗體序列。由經改變之抗體序列編碼之抗體為保留本文所述之抗-IL-17A抗體之一個、一些或全部所需功能特性之抗體，該等功能特性包括(但不限於)特異性結合於人類IL-17A；及/或其抑制IL-17A與其受體結合；及/或其抑制IL-17A誘發之例如IL-6或GRO- $\alpha$ 等產生。

經改變之抗體可展現上文所論述之功能特性中之一或更多者，兩者或兩者以上，或三者或三者以上。

在工程改造本發明抗體之方法之某些實施例中，可沿所有或部分抗-IL-17A抗體編碼序列隨機或選擇性地引入突變且可篩檢所得經修飾之抗-IL-17A抗體之結合活性及/或其他如本文所述之功能特性。突變方法於此項技術中已加以描述。舉例而言，Short之PCT公開案WO 02/092780描述使用飽和突變誘發、合成接合組裝或其組合創造及篩檢抗體突變之方法。或者，Lazar等人之PCT公開案WO 03/074679描述使用計算篩檢方法來使抗體之生理化學特性最佳化的方法。

### 本發明之編碼抗體之核酸分子

本發明之另一態樣係關於編碼本發明之抗體或蛋白質的核酸分子。可變輕鏈核苷酸序列之實例為編碼XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5中之任一者之可變輕鏈胺基酸序列的可變輕鏈核苷酸序列，後面的序列來源於表3(展示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之重鏈及輕鏈之全部核苷酸編碼序列)及表2(展示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之可變區之胺基酸序列)。

本發明亦關於已為在哺乳動物細胞(例如CHO細胞株)中蛋白質表

現而最佳化之源於該等後面的序列的核酸分子。

核酸可存在於完整細胞中，存在於細胞溶解產物中，或可為呈部分純化或實質上純之形式的核酸。當核酸藉由標準技術(包括鹼/SDS處理、CsCl結合、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳及此項技術中熟知之其他技術)自其他細胞組分或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)純化時，其為「經分離」或「變成實質上純的」。參見F. Ausubel等人編, 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本發明之核酸可為例如DNA或RNA，且可能含有或可能不含有內含子序列。在一個實施例中，核酸為cDNA分子。核酸可存在於諸如噬菌體呈現載體之載體中，或存在於重組質體載體中。

本發明之核酸可使用標準分子生物學技術獲得。一旦獲得編碼例如V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>區段之DNA片段，此等DNA片段即可進一步藉由標準重組DNA技術操作例如以將可變區基因轉化為全長抗體鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。在此等操作中，將編碼V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>之DNA片段可操作地連接於另一DNA分子或連接於編碼另一蛋白之片段(諸如抗體恆定區或可撓性連接子)。如此情形中所用之術語「可操作地連接」意欲意謂兩個DNA片段以功能方式接合，例如使得由該兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持同框，或使得該蛋白質在所需啟動子的控制下得以表現。

可藉由將編碼V<sub>H</sub>之DNA可操作地連接於另一編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之DNA分子而將編碼V<sub>H</sub>區之經分離之DNA轉化為全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列在此項技術中為已知的(參見例如Kabat, E.A.等人, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版物第91-3242號)且涵蓋此等區之DNA片段可藉由標

準PCR擴增來獲得。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。在一些實施例中，重鏈恆定區係選自IgG1同型。對於Fab片段重鏈基因而言，可將編碼V<sub>H</sub>之DNA操作性連接至另一僅編碼重鏈CH1恆定區之DNA分子。

可藉由使編碼V<sub>L</sub>之DNA與編碼輕鏈恆定區(CL)之另一DNA分子可操作地連接將編碼V<sub>L</sub>區之經分離DNA轉化成全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列在此項技術中為已知的(參見例如Kabat, E.A.，等人 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版物第91-3242號)且包含此等區域之DNA片段可藉由標準PCR擴增來獲得。輕鏈恆定區可為κ或λ恆定區。

為創造scFv基因，編碼V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>之DNA片段可操作地連接於編碼可撓性連接子，例如編碼胺基酸序列(Gly4-Ser)<sub>3</sub>之另一片段，使得V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列可表現為連續單鏈蛋白質，其中V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>區由可撓性連接子接合(參見例如Bird等人 1988, Science 242:423-426；Huston等人 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；McCafferty等人 1990, Nature 348:552-554)。

### 本發明之重組抗體之分離

篩檢抗體及包含其抗原結合部分之蛋白質之多種方法已描述於此項技術中。該等方法可分成活體內系統，諸如能夠在抗原免疫後產生完全人類抗體之轉殖基因小鼠；及活體外系統，由以下組成：生成抗體DNA編碼庫，在用於抗體產生之適當系統中表現該DNA庫，選擇表現在親和力選擇準則下結合於目標之抗體候選物的純系，及回收所選純系之相應編碼序列。此等活體外技術稱為呈現技術且包括(但不限於)噬菌體呈現、RNA或DNA呈現、核糖體呈現、酵母或哺乳動物細胞呈現。其已在此項技術中得以充分描述(關於回顧，參見例如

Nelson等人 2010, *Nature Reviews Drug discovery*, 「Development trends for human monoclonal antibody therapeutics」 (Advance Online Publication) 及 Hoogenboom等人 2001, *Method in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien等人編, Human Press, Totowa, N.J.)。在一個特定實施例中，使用篩檢人類重組抗體庫(諸如HuCAL®庫)之噬菌體呈現方法分離本發明之人類重組抗體。

$V_H$ 及 $V_L$ 基因或相關CDR區之譜系可分別藉由聚合酶鏈反應(PCR)選殖或藉由DNA合成儀合成，且在噬菌體庫中隨機重組，隨後可篩檢抗原結合純系。該等用於分離人類抗體之噬菌體呈現方法在此項技術中已確立或描述於以下實例中。參見例如：Ladner等人之美國專利第5,223,409號；第5,403,484號；及第5,571,698號；Dower等人之美國專利第5,427,908號及第5,580,717號；McCafferty等人之美國專利第5,969,108號及第6,172,197號；及Griffiths等人之美國專利第5,885,793號；第6,521,404號；第6,544,731號；第6,555,313號；第6,582,915號及第6,593,081號。

在某一實施例中，可使用攜帶部分人類免疫系統(而非小鼠系統)之轉殖基因或轉染色體小鼠鑑定針對IL-17A之人類抗體。此等轉殖基因及轉染色體小鼠包括在本文中分別稱為HuMAb小鼠及KM小鼠，且在本文中統稱為「人類Ig小鼠」之小鼠。

HuMAb mouse® (Medarex, Inc.)含有編碼未重排人類重鏈( $\mu$ 及 $\gamma$ )及 $\kappa$ 輕鏈免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因小基因座以及使內源性 $\mu$ 及 $\kappa$ 鏈基因座失活之目標突變(參見例如Lonberg等人, 1994, *Nature* 368:856-859)。因此，小鼠展現小鼠IgM或 $\kappa$ 表現減小，且響應於免疫，所引入之人類重鏈及輕鏈轉殖基因進行類別轉換及體細胞突變以生成高親和力人類IgG $\kappa$ 單株(Lonberg, N.等人 1994, 前文；回顧Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-

101；Lonberg, N.及Huszar, D. 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93；及Harding, F.及Lonberg, N. 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAb小鼠之製備及使用及由該等小鼠攜帶之染色體組修飾進一步描述於Taylor, L.等人 1992, Nucleic Acids Research 20:6287-6295；Chen, J.等人 1993, International Immunology 5:647-656；Tuailion等人 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724；Choi等人 1993, Nature Genetics 4:117-123；Chen, J.等人 1993, EMBO J. 12: 821-830；Tuailion等人 1994, J. Immunol. 152:2912-2920；Taylor, L.等人 1994, International Immunology 5:79-591；及Fishwild, D.等人 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851中。另外參見美國專利第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,789,650號；第5,877,397號；第5,661,016號；第5,814,318號；第5,874,299號；及第5,770,429號；皆屬於Lonberg及Kay；Surani等人之美國專利第5,545,807號；PCT公開案第WO 92103918號、第WO 93/12227號、第WO 94/25585號、第WO 97113852號、第WO 98/24884號及第WO 99/45962號，皆屬於Lonberg及Kay；及Korman等人之PCT公開案第WO 01/14424號。

在另一實施例中，本發明之人類抗體可使用在轉殖基因及轉染色體上攜帶人類免疫球蛋白序列之小鼠，諸如攜帶人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉染色體之小鼠來培育。該等小鼠(在本文中稱為「KM小鼠」)詳細描述於Ishida等人之PCT公開案WO 02/43478中。

另外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉殖基因動物系統為此項技術中可用的，且可用於培育本發明之抗-IL-17A抗體。舉例而言，可使用來自Abgenix, Inc.稱為Xenomouse之替代性轉殖基因系統。該等小鼠描述於例如Kucherlapati等人之美國專利第5,939,598號；第6,075,181號；第6,114,598號；第6,150,584號及第6,162,963號

中。如熟習此項技術者應瞭解，可使用若干其他小鼠模型，諸如 Trianni, Inc. 之 Trianni<sup>TM</sup> 小鼠、Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 之 VelocImmune<sup>TM</sup> 小鼠、或 Kymab Limited 之 Kymouse<sup>TM</sup> 小鼠。

此外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉染色體動物系統為此項技術中可用的，且可用於培育本發明之抗-IL-17A 抗體。舉例而言，可使用攜帶人類重鏈轉染色體及人類輕鏈轉染色體兩者之小鼠，稱為「TC 小鼠」；該等小鼠描述於 Tomizuka 等人 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 中。

本發明之人類單株抗體亦可使用人類免疫細胞已重新組構其中以使得可在免疫後產生人類抗體反應之 SCID 小鼠來製備。該等小鼠描述於例如 Wilson 等人之美國專利第 5,476,996 號及第 5,698,767 號。

### 由鼠類系統生成本發明之單株抗體

單株抗體(mAb)可藉由多種技術產生，包括習知單株抗體方法，例如 Kohler 及 Milstein 1975, Nature 256:495 之標準體細胞雜交技術。可使用許多用於產生單株抗體之技術，例如 B 淋巴細胞之病毒或致癌轉形。

用於製備融合瘤之動物系統為鼠類系統。在小鼠體內產生融合瘤為經充分確定之程序。分離經免疫脾細胞以供融合之免疫方案及技術在此項技術中已知。亦已知融合搭配物(例如鼠類骨髓瘤細胞)及融合程序。

本發明之嵌合抗體或人類化抗體可基於如上所述製備之鼠類單株抗體的序列來製備。編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之 DNA 可使用標準分子生物學技術由所關注之鼠類融合瘤獲得且可經工程改造以含有非鼠類(例如人類)免疫球蛋白序列。舉例而言，為創造嵌合抗體，可使用此項技術中已知的方法來使鼠類可變區與人類恆定區連接(參見例如 Cabilly 等人之美國專利第 4,816,567 號)。為創造人類化抗體，可使

用此項技術中已知之方法將鼠類CDR區插入人類構架中。參見例如 Winter 之美國專利第 5,225,539 號，及 Queen 等人之美國專利第 5,530,101 號；第 5,585,089 號；第 5,693,762 號及第 6,180,370 號。

### **產生人類單株抗體之融合瘤的生成**

為生成產生本發明之人類單株抗體之融合瘤，可分離經免疫小鼠之脾細胞及/或淋巴結細胞且融合於適當永生化之細胞株，諸如小鼠骨髓瘤細胞株。可篩檢所得融合瘤以便產生抗原特異性抗體或抗原決定基特異性抗體。舉例而言，可用 50% PEG 將經免疫小鼠之脾淋巴細胞之單細胞懸浮液與六分之一數目之 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤細胞(ATCC，CRL 1580)融合。將約  $2 \times 145$  個細胞接種於平底微量滴定板中，接著在含有 20% 胎純系血清、18% 「653」條件培養基、5% origin (IGEN)、4 mM L-麴胺醯胺、1 mM丙酮酸鈉、5 mM HEPES、0:055 mM 2-氨基乙醇、50 單位/毫升青黴素、50 mg/ml 鏈黴素、50 mg/ml 健大黴素(gentamycin)及 1X HAT(Sigma；在融合後 24 小時添加 HAT)之選擇性培養基中培育兩週。約兩週之後，可將細胞在以 HT 替代 HAT 之培養基中培養。隨後可藉由 ELISA 對個別孔就人類單株 IgM 及 IgG 抗體進行篩檢。出現廣泛融合瘤生長之後，通常可在 10-14 天後觀察培養基。可重新接種分泌抗體之融合瘤，再次篩檢，且若相對於人類 IgG 仍為陽性，可藉由限制稀釋法次選殖單株抗體一或兩次。隨後可在活體外培養穩定次純系以在組織培養基內產生少量抗體以供表徵。

為純化人類單株抗體，可使所選融合瘤在 2 公升旋轉瓶中生長以進行單株抗體純化。可將上清液過濾且濃縮，隨後以蛋白質 A-瓊脂糖 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) 進行親和層析。經溶離之 IgG 可由凝膠電泳及高效液相層析查核以確保純度。可將緩衝溶液替換為 PBS，且可使用 1.43 消光係數藉由 OD<sub>280</sub> 測定濃度。可將單株抗體等分且儲存於

-80°C下。

### 產生單株抗體之轉染瘤的生成

本發明之抗體可使用例如此項技術中所熟知的重組DNA技術與基因轉染方法之組合在宿主細胞轉染瘤中產生(例如Morrison, S. 1985, Science 229:1202)。

舉例而言，為表現該等抗體或其抗體片段，編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA可藉由標準分子生物學或生物化學技術(例如DNA化學合成、PCR擴增或使用表現所關注抗體之融合瘤的cDNA選殖)獲得，且該等DNA可插入表現載體中以使得該等基因可操作地連接於轉錄及轉譯控制序列。在此情形下，術語「可操作地連接」意欲意謂抗體基因接合至載體中以使得該載體內之轉錄及轉譯控制序列發揮其調節抗體基因之轉錄及轉譯的預期功能。表現載體及表現控制序列經選擇以與所用表現宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入獨立載體中，或更通常地，將兩種基因插入同一表現載體中。藉由標準方法(例如，抗體基因片段及載體上互補限制性位點之接合，或若不存在限制性位點則為鈍端接合)將抗體基因插入表現載體中。可使用本文所述之抗體之輕鏈及重鏈可變區創造任何抗體同型之全長抗體基因，此係藉由將該等可變區插入已編碼所需同型之重鏈恆定區及輕鏈恆定區之表現載體中，以使得V<sub>H</sub>區段可操作地連接於載體內之C<sub>H</sub>區段且V<sub>L</sub>區段可操作地連接於載體內之C<sub>L</sub>區段。另外或替代地，重組表現載體可編碼促進自宿主細胞分泌抗體鏈之信號肽，亦稱為前導序列。該抗體鏈基因可選殖至該載體中以使得該信號肽與該抗體鏈基因之胺基端同框連接。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即，來自非免疫球蛋白蛋白質之信號肽)。該等信號肽之實例見於表7，且編碼信號肽之聚核苷酸序列之實例見於表8。

圖7.重肽鏈及輕肽鏈之信號肽

信號肽	序列ID號	用於重肽鏈或輕肽鏈
1	SEQ ID NO: 59	重鏈
2	SEQ ID NO: 60	輕鏈
3	SEQ ID NO: 63	重鏈
4	SEQ ID NO: 64	輕鏈
5	SEQ ID NO: 67	重鏈
6	SEQ ID NO: 68	輕鏈

表8.編碼信號肽之聚核苷酸序列。

所編碼之信號肽編號	序列ID號	重鏈或輕鏈之編碼信號肽序列
1	SEQ ID NO: 61	重鏈
2	SEQ ID NO: 62	輕鏈
3	SEQ ID NO: 65	重鏈
4	SEQ ID NO: 66	輕鏈
5	SEQ ID NO: 69	重鏈
6	SEQ ID NO: 70	輕鏈

除抗體鏈基因外，本發明之重組表現載體亦攜帶控制抗體鏈基因在宿主細胞中之表現的調節序列。術語「調節序列」意欲包括啟動子、強化子及控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯之其他表現控制元件(例如，聚腺苷酸化信號)。該等調節序列描述於例如Goeddel 1990, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA)中。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計，包括調節序列之選擇，可視諸如待轉形宿主細胞之選擇、所需蛋白質表現量等因素而定。哺乳動物宿主細胞表現之調節序列包括引導哺乳動物細胞內高蛋白質表現量的病毒元件，諸如來源於細胞巨大病毒(CMV)、猿猴病毒40(Simian Virus 40, SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多形瘤之啟動子及/或增強子。或者，可使用非病毒性調節序列，諸如泛素啟動子或P-血球蛋白啟動子。另外，調節元件由不同來源之序列組成，諸如SRa啟動子系統，其含有SV40早期啟動子之序列及1型人類T細胞白血病病毒之長末端重複序列(Takebe, Y.等人 1988, Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

除抗體鏈基因及調節序列以外，本發明之重組表現載體可攜帶額外序列，諸如調節載體在宿主細胞中複製之序列(例如，複製起點)及可選擇性標記基因。可選擇性標記基因有助於選擇已引入有載體之宿主細胞(參見例如美國專利第4,399,216號、第4,634,665號及第5,179,017號，皆屬於Axel等人)。舉例而言，通常可選擇性標記基因賦予已引入有載體之宿主細胞以對藥物(諸如G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤)之抗性。可選擇性標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於經甲胺喋呤選擇/擴增之dhfr-宿主細胞中)及neo基因(用於G418選擇)。

為表現輕鏈及重鏈，應用標準技術以便用編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染宿主細胞。術語「轉染」之各種形式意欲涵蓋常用於將外源DNA引入原核或真核宿主細胞中之多種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。使本發明之抗體在原核或真核宿主細胞中表現理論上為可能的。論述抗體在真核細胞，例如哺乳動物宿主細胞、酵母或絲狀真菌中之表現，因為該等真核細胞且尤其哺乳動物細胞比原核細胞更可能裝配及分泌經適當摺疊且具有免疫活性之抗體。

在一個特定實施例中，本發明之選殖或表現載體包含可操作地連接於合適啟動子序列之表3之至少一個編碼序列。在另一特定實施例中，本發明之選殖或表現載體包含可操作地連接於合適啟動子序列之表4之至少一個編碼序列。

用於表現本發明之重組抗體之哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括dhfr- CHO細胞，描述於Urlaub及Chasin 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中，與例如如R.J. Kaufman及P.A. Sharp 1982, Mol. Biol. 159:601-621中所述之DH FR可選擇性標記一起使用)、CHOK1 dhfr+細胞株、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2

細胞。詳言之，與NSO骨髓瘤細胞一起使用的另一表現系統為PCT公開案WO 87/04462、WO 89/01036及EP 0 338 841中所示之GS基因表現系統。在一個實施例中，用於表現本發明之重組抗體的哺乳動物宿主細胞包括FUT8基因表現缺陷型哺乳動物細胞株，例如如美國專利第6,946,292號中所述。

當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，該等抗體係藉由將該等宿主細胞培養一段足以允許該抗體在宿主細胞中表現或該抗體分泌至該等宿主細胞生長之培養基中的時間來產生。可使用標準蛋白質純化方法自培養基中回收抗體(參見例如Abhinav等人 2007, *Journal of Chromatography* 848:28-37)。

在一個特定實施例中，本發明之宿主細胞為轉染有表現載體之宿主細胞，該表現載體具有可操作地連接於合適啟動子序列的分別適用於表現XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的編碼序列，選自由SEQ ID NO: 18、31、51、19、28、32、38、40、46、48、52、56及58組成之群。

後面的宿主細胞可隨後在合適條件下進一步培養，以便表現及產生分別選自由XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5組成之群之本發明之抗體。

### 免疫結合物

在另一態樣中，本發明係關於與活性或治療性部分(諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素)結合之本發明之抗-IL-17A抗體或其片段。該等結合物在本文中稱為「免疫結合物」。若IL-17A在Th17細胞表面上表現，此可尤其較佳(Brucklacher-Waldert等人 2009, *J Immunol.* 183:5494-501)。

包括一或多種細胞毒素之免疫結合物稱為「免疫毒素」。細胞毒素或細胞毒性劑包括任何對細胞有害(例如殺害細胞)之藥劑。實例包

括毒素、細胞遲緩素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊昔(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、硫代秋水仙鹼(t. colchicin)、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-去氫睪酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素(glucocorticoid)、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)、及嘌黴素(puromycin)及其類似物或同系物。治療劑亦包括例如抗代謝物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞昔(cytarabine)、5-氟尿嘧啶氮烯唑胺(5-fluorouracil dacarbazine))、消除劑(例如氮芥(mechlorethamine)、噻替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、左旋苯丙酸氮芥(meiphalan)、卡氮芥(carmustine)(BSNU)及環已亞硝脲(lomustine)(CCNU)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、硫酸布他卡因(busulfan)、二溴甘露糖醇(dibromomannitol)、鏈脲菌素(streptozotocin)、絲裂黴素C及順二氯乙二胺鉑(II)(cis-dichlorodiamine platinum(II))(DDP)順氯氨鉑(cisplatin))、蒽環黴素(anthracycline)(例如道諾黴素(daunorubicin，之前為daunomycin)及阿黴素(doxorubicin))、抗生素(例如放線菌素(dactinomycin，之前為actinomycin)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素(mithramycin)及氨茴黴素(anthramycin)(AMC))及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

可與本發明抗體結合之治療細胞毒素之其他實例包括多卡米素(duocarmycin)、卡奇黴素(calicheamicin)、美登素(maytansine)及阿立他汀(auristatin)及其衍生物。卡奇黴素抗體結合物之實例為市售的

(Mylotarg<sup>TM</sup>; Wyeth-Ayerst)。

細胞毒素可使用此項技術中可用之連接子技術與本發明之抗體結合。已用於使細胞毒素與抗體結合之連接子類型的實例包括(但不限於)腙、硫醚、酯、二硫化物及含肽連接子。可選擇例如易於在低pH值下在溶菌體代謝區內裂解或易於經諸如在腫瘤組織中優先表現之蛋白酶(諸如組織蛋白酶(例如組織蛋白酶B、C、D))之蛋白酶裂解的連接子。

關於細胞毒素類型、連接子及使治療劑與抗體結合之進一步論述，亦參見Saito, G.等人 2003, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215； Trail, P.A.等人 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337； Payne, G. 2003, *Cancer Cell* 3:207-212； Allen, T.M. 2002, *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763； Pastan, I. 及 Kreitman, R. J. 2002, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091； Senter, P.D.及 Springer, C.J. 2001, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

本發明之抗體亦可與放射活性同位素結合以生成細胞毒性放射性藥物，亦稱為放射性免疫結合物。可與抗體結合以便在診斷或治療上使用之放射性同位素的實例包括(但不限於)碘<sup>131</sup>、銦<sup>111</sup>、鈇<sup>90</sup>及鎇<sup>177</sup>。製備放射性免疫結合物之方法在此項技術中已確立。放射性免疫結合物之實例為市售的，包括Zevalin<sup>TM</sup>(DEC Pharmaceuticals)及Bexxar<sup>TM</sup>(Corixa Pharmaceuticals)，且類似方法可用於使用本發明抗體製備放射性免疫結合物。

本發明之抗體結合物可用以使給定生物反應改質，且藥物部分不應視為限於經典化學治療劑。舉例而言，藥物部分可為具有所需生物活性之蛋白質或多肽。該等蛋白質可包括例如酶促活性毒素或其活性片段，諸如相思子鹼(abrin)、蓖麻毒素A(ricin A)、綠膿桿菌外毒素(pseudomonas exotoxin)或白喉毒素(diphtheria toxin)；蛋白質，諸如

腫瘤壞死因子或干擾素- $\gamma$ ；或生物反應調節劑，諸如例如淋巴介質、介白素-1(「IL1」)、介白素-2(「IL2」)、介白素-6(「IL6」)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(「GM-CSF」)、顆粒球細胞群落刺激因子(「G-CSF」)或其他生長因子。

使該治療性部分與抗體結合之技術為熟知的，參見例如Amon等人1985, 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld等人(編), 第243-56頁；Hellstrom等人 1987, 「Antibodies For Drug Delivery」, in *Controlled Drug Delivery* (第2版), Robinson等人(編), 第623-53頁；Thorpe 1985, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera等人(編), 第475-506頁；Thorpe等人 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58。

### 雙特異性分子

在另一態樣中，本發明係關於包含本發明之抗-IL-17A/AF抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質的雙特異性或多特異性分子。本發明之抗體或蛋白質可衍生或連接至另一功能分子，例如另一肽或蛋白質(例如另一抗體或受體之配體)以生成結合至少兩個不同結合位點或目標分子之雙特異性分子。事實上，本發明之抗體可衍生或連接至一個以上其他功能分子以生成結合兩個以上不同結合位點及/或目標分子之多特異性分子；如本文所用之術語「雙特異性分子」亦意欲涵蓋該等多特異性分子。為創造本發明之雙特異性分子，本發明之抗體或蛋白質可功能性連接(例如藉由化學偶合、遺傳融合、非共價締合或以其他方式)至一或多個其他結合分子(諸如另一抗體、抗體片段、肽或結合模擬物)，使得雙特異性分子產生。

因此，本發明包括雙特異性分子，其包含至少一個對於IL-17A

之第一結合特異性(例如XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的一個抗原結合部分)及對於第二目標抗原決定基之第二結合特異性。舉例而言，第二目標抗原決定基為不同於第一目標抗原決定基之IL-17A的另一抗原決定基。另一實例為包含至少一個對於IL-17A之第一結合特異性(例如XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的一個抗原結合部分)及對於在IL-17A內或另一目標抗原內其他地方之抗原決定基之第二結合特異性的雙特異性分子。

此外，對於雙特異性分子具有多特異性之本發明而言，除第一及第二目標抗原決定基之外，該分子可另外包括第三結合特異性。

在一個實施例中，本發明之雙特異性分子包含作為結合特異物之至少一個抗體或其抗體片段，包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv。如Ladner等人之美國專利第4,946,778號中所述，抗體亦可為輕鏈或重鏈二聚體或其任何最小片段，諸如Fv或單鏈構築體。

可用於本發明之雙特異性分子中之其他抗體為鼠類單株抗體、嵌合單株抗體及人類化單株抗體。

本發明之雙特異性分子可藉由使用此項技術中已知之方法將組成結合特異物結合來製備。舉例而言，雙特異性分子之各結合特異性可獨立地生成且隨後彼此結合。當結合特異物為蛋白質或肽時，多種偶合劑或交聯劑可用於共價結合。交聯劑之實例包括蛋白質A、碳化二亞胺、N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、鄰伸苯基順丁烯二醯亞胺(oPDM)、N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)及礦基琥珀醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸酯(礦基-SMCC)(參見例如Karpovsky等人 1984, J. Exp. Med. 160:1686；Liu, MA等人 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括Paulus 1985, Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132；Brennan等人 1985, Science

229:81-83)及Glennie等人 1987, J. Immunol. 139: 2367-2375)中所述之方法。結合劑為SATA及礦基-SMCC，其均可自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)獲得。

當結合特異物為抗體時，其可經由兩條重鏈之C端鉸鏈區之硫氫基鍵結合。在一個特定實施例中，在結合之前，鉸鏈區經修飾以含有奇數個硫氫基殘基，例如一個硫氫基殘基。

或者，兩種結合特異物可在同一載體中編碼且在同一宿主細胞中表現及組裝。當雙特異性分子為mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')<sub>2</sub>或配體×Fab融合蛋白時，此方法尤其適用。本發明之雙特異性分子可為包含一個單鏈抗體及一個結合決定子的單鏈分子，或包含兩個結合決定子的單鏈雙特異性分子。雙特異性分子可包含至少兩個單鏈分子。例如，在美國專利第5,260,203號、美國專利第5,455,030號、美國專利第4,881,175號、美國專利第5,132,405號、美國專利第5,091,513號、美國專利第5,476,786號、美國專利第5,013,653號、美國專利第5,258,498號及美國專利第5,482,858號中描述用於製備雙特異性分子之方法。

雙特異性分子與其特異性目標之結合可藉由例如酶聯免疫吸附劑分析(ELISA)、放射免疫分析(REA)、FACS分析、生物分析(例如生長抑制)或西方墨點分析來證實。此等分析中之每一者一般藉由使用對受關注之複合物具有特異性的經標記之試劑(例如抗體)來偵測尤其受關注之蛋白質-抗體複合物的存在。

### **多價抗體**

在另一態樣中，本發明提供包含本發明抗體結合於IL-17A之至少兩個相同或不同的抗原結合部分的多價抗體，該等抗原結合部分選自XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5中之任一者的抗原結合部分。在一個實施例中，多價抗體提供抗體之至少兩個、三個或四個抗

原結合部分。抗原結合部分可經由蛋白質融合或共價或非共價鍵聯連接在一起。或者，已描述雙特異性分子之鍵聯方法。四價化合物可例如藉由使本發明之抗體與結合於本發明抗體之恆定區(例如Fc或鉸鏈區)的抗體交聯而獲得。

### 醫藥組合物

在另一態樣中，本發明提供一種組合物(例如醫藥組合物)，其含有與醫藥學上可接受之載劑調配在一起的一種或一組本發明之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，例如一種選自由XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5組成之群之抗體。該等組合物可包括本發明之一種或一組(例如，兩種或兩種以上不同)抗體或免疫結合物或雙特異性分子。舉例而言，本發明之醫藥組合物可包含結合於目標抗原上之不同抗原決定基或具有互補活性的抗體或蛋白質的組合。

本發明之醫藥組合物亦可以組合療法，亦即與其他藥劑組合投與。舉例而言，組合療法可包括本發明之抗-IL-17A抗體或蛋白質，例如一種選自由XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5組成之群之抗體，與至少一種其他消炎劑或另一化學治療劑(例如免疫抑制劑)之組合。可用於組合療法之治療劑的實例更加詳細地描述於以下關於本發明之抗體或蛋白質之用途的部分中。

如本文中所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括生理學可相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑以及其類似載劑。該載劑應適於靜脈內投與、肌肉內投與、皮下投與、非經腸投與、脊椎投與或表皮投與(例如藉由注射或輸注)。在一個實施例中，載劑應適於皮下途徑。視投藥途徑而定，活性化合物(亦即抗體、免疫結合物或雙特異性分子)可包覆於材料中以保護該化合物免受可使該化合物失活之酸及其他自然條件的作用。

本發明之醫藥組合物可包括一或多種醫藥學上可接受之鹽。「醫

藥學上可接受之鹽」係指保留母體化合物之所需生物活性且不賦予任何不希望有的毒理學效應的鹽(參見例如Berge, S.M.等人, 1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19)。該等鹽之實例包括酸加成鹽及鹼加成鹽。酸加成鹽包括由以下各酸衍生之鹽：無毒性無機酸，諸如鹽酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸及其類似物；以及無毒性有機酸，諸如脂族單羧酸及二羧酸、經苯基取代之烷酸、羥基烷酸、芳族酸、脂族礦酸及芳族礦酸，及其類似物。鹼加成鹽包括由以下各鹼衍生之鹽：鹼土金屬，諸如鈉、鉀、鎂、鈣及其類似物；以及無毒性有機胺，諸如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普魯卡因、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、普魯卡因及其類似物。

本發明之醫藥組合物亦可包括醫藥學上可接受之抗氧化劑。醫藥學上可接受之抗氧化劑之實例包括：水可溶抗氧化劑，諸如抗壞血酸、半胱氨酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、偏亞硫酸鈉、亞硫酸鈉及其類似物；油可溶抗氧化劑，諸如棕櫚酸抗壞血酯、丁基化羥基大茴香醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚及其類似物；及金屬螯合劑，諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸及其類似物。

可用於本發明之醫藥組合物中之適合水性及非水性載劑的實例包括水、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及其類似物)及其適合混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯(諸如油酸乙酯)。可例如藉由使用塗層物質(諸如卵磷脂)、在分散液之情況中藉由維持所需粒徑及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。

此等組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由滅菌程序及藉由包括多種抗細菌劑及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸及其類似物)來確保防止微生物存在。亦可需要在組合物中包括等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似

物。此外，可注射藥物形式之吸收延長可藉由包括延遲吸收之藥劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來達成。

醫藥學上可接受之載劑包括無菌水性溶液或分散液，及用於即時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。醫藥學活性物質之該等介質及藥劑之用途在此項技術中已知。除非任何習知介質或藥劑與活性化合物不相容，否則涵蓋其在本發明之醫藥組合物中使用。亦可在組合物中併入輔助性活性化合物。

治療組合物通常必須在製造及儲存條件下無菌且穩定。該等組合物可調配為溶液、微乳液、脂質體或其他適於高藥物濃度之有序結構。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇及其類似物)之溶劑或分散介質及其合適混合物。可例如藉由使用諸如卵磷脂之塗層，在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。在多種情況下，組合物中可包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露醇、山梨糖醇)或氯化鈉。可注射組合物之吸收延長可藉由在該組合物中包括延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來達成。

關於穩定蛋白質(例如抗體)調配物開發之回顧可見於Cleland等人 1993, Crit. Reviews. Ther. Drug Carrier Systems 10(4):307-377及Wei Wang 1999, Int. J. Pharmaceutcs 185:129-88。抗體之額外調配物論述可見於例如Daugherty及Mrsny 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58: 686-706；美國專利第6,171,586號、第4,618,486號、美國公開案第20060286103號、PCT公開案 WO 06/044908、WO 07/095337、WO 04/016286、Colandene等人 2007, J. Pharm. Sci 96: 1598-1608；Schulman 2001, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:S6-S11及其他已知參考文獻。

用於皮內或皮下施用之溶液或懸浮液通常包括一或多種以下組

分：無菌稀釋劑，諸如注射用水、生理食鹽水溶液、不揮發性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶液；抗細菌劑，諸如苄醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；緩衝劑，諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；及調整張力之藥劑，諸如氯化鈉或右旋糖。可用諸如鹽酸或氫氧化鈉之酸或鹼來調整pH值。該等製劑可封入由玻璃或塑膠製成之安瓿、拋棄式注射器或多次劑量小瓶中。

無菌可注射溶液可藉由併入所需量之在適當溶劑中之活性化合物以及一種或一組上文所列舉之成分，若需要隨後進行滅菌微過濾來製備。一般藉由將本發明之抗體或蛋白質併入含有鹼性分散介質及選自上文所列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況下，製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥(凍乾)，其得到活性成分加上來自其先前經無菌過濾之溶液之任何額外所需成分的粉末。

在一個特定實施例中，抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5以小瓶中之液體調配物形式投與。每一小瓶藥物的量為150 mg。該液體含有150 mg/mL抗體、4.8 mM L-組胺酸、15.2 mM L-組胺酸-HCl、220 mM蔗糖及0.04%聚山梨醇酯20，在pH 6.0±0.5下。添加20%過量填充以允許完全移出指定劑量。

可與載劑物質組合以產生單一劑型之活性成分的量應視所治療之個體及特定投藥模式而定。可與載劑物質組合以產生單一劑型之活性成分的量將一般為產生治療效應之組合物的量。一般，以100%計，此量將在約0.01%至約99%活性成分，約0.1%至約70%，或約1%至約30%之與醫藥學上可接受之載劑組合的活性成分之範圍內。

給藥方案經調整以提供最佳所需反應(例如治療反應)。舉例而言，可投與單一大丸劑；可隨時間推移投與若干分次劑量；或可按治

療情況之緊急需要指示按比例減小或增加劑量。出於投藥簡便性及劑量均一性考慮，將非經腸組合物調配成單位劑型尤其有利。如本文中所用之單位劑型係指適合作為單一劑量用於待治療之個體的實體上離散之單位；每一單位含有經計算以產生所需治療效應之預定量的與所需醫藥載劑締合之活性化合物。本發明之單位劑型之規格由活性化合物之獨特特徵及待達成之特定治療效應，及在混配該活性化合物用於治療個體之敏感性的技術中之固有限制來規定且直接視其而定。

關於抗體或蛋白質之投與，劑量範圍介於每公斤宿主體重約0.0001毫克至150毫克，諸如每公斤宿主體重5毫克、15毫克及50毫克皮下投與，且更通常每公斤宿主體重0.01毫克至5毫克。舉例而言，劑量可為每公斤體重0.3毫克、每公斤體重1毫克、每公斤體重3毫克、每公斤體重5毫克或每公斤體重10毫克，或在每公斤1-10毫克範圍內。例示性治療方案需要每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每月一次、每3個月一次或每3至6個月一次投藥。本發明之抗-IL-17A抗體或蛋白質之給藥方案包括藉由靜脈內投與每公斤體重1毫克、每公斤體重3毫克、每公斤5毫克、每公斤10毫克、每公斤20毫克或每公斤30毫克，其中抗體使用以下給藥時程中之一者給予：每四週六次劑量，接著每三個月；每三週；每公斤體重3毫克一次，接著每三週每公斤體重1毫克。

在一些方法中，同時投與兩種或兩種以上具有不同結合特異性之抗體，在該種情況下，所投與之每一抗體之劑量處於指定範圍內。本發明之抗體或蛋白質一般在多個時機投與。單一劑量之間的時間間隔可為例如一週、一個月、三個月或一年。如藉由量測患者體內目標抗原之抗體的血液含量所指示，時間間隔亦可為不規則的。在一些方法中，調整劑量以使血漿抗體濃度達到約1-1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，且在一些方法中達到約25-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

或者，抗體或蛋白質可以持續釋放型調配物形式投與，在該情況下不需頻繁投藥。劑量及頻率視抗體在患者體內之半衰期而變化。一般而言，人類抗體展示最長半衰期，隨後為人類化抗體、嵌合抗體及非人類抗體。投藥之劑量及頻率可視治療為預防性抑或治療性而變化。在預防性應用中，歷經長時期以相對不頻繁之時間間隔投與相對低之劑量。一些患者在其餘生中持續接受治療。在治療性應用中，往往需要在相對短之時間間隔下相對高之劑量直至疾病進程得以減緩或終止為止或直至患者展示疾病症狀部分或完全改善為止。其後，可向患者投與預防性方案。

本發明之醫藥組合物中活性成分之實際劑量含量可變化以獲得有效達成對特定患者、組合物及投藥模式之所需治療反應，而對患者不具有毒性的活性成分之量。所選劑量含量應視多種藥物動力學因素而定，該等藥物動力學因素包括所用之本發明之特定組合物或其酯、鹽或醯胺的活性；投藥途徑；投藥時間；所用特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所用特定組合物組合使用的其他藥物、化合物及/或物質；所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前醫療病史；及醫學技術中所熟知的類似因素。

本發明之抗-IL-17A抗體或蛋白質之「治療有效劑量」可引起疾病症狀之嚴重程度降低、無疾病症狀時期的頻率及持續時間增加、或防止因疾病折磨之損傷或殘疾。

本發明之組合物可藉由一或多種投藥途徑使用此項技術中已知之多種方法中之一或多者投與。如熟習此項技術者所瞭解，投藥途徑及/或投藥模式將視所需結果而變化。本發明之抗體之投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、脊椎或其他非經腸投藥途徑(例如藉由注射或輸注)。如本文中所用之短語「非經腸投藥」意謂除經腸投藥及局部投藥以外，通常藉由注射之投藥模式，且包括(但不

限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眼眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及腦幹內注射及輸注。

或者，本發明之抗體或蛋白質可藉由諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑之經腸途徑，例如鼻內、經口、經陰道、經直腸、舌下或局部投與。

本發明之抗體或蛋白質可與保護抗體免於快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊封傳遞系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法均已取得專利權或一般為熟習技術者所知。參見例如 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson 編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

治療組合物可以此項技術中已知的醫療裝置投與。舉例而言，在一個實施例中，本發明之治療組合物可使用無針皮下注射裝置投與，諸如美國專利第5,399,163號；第5,383,851號；第5,312,335號；第5,064,413號；第4,941,880號；第4,790,824號或第4,596,556號中所示之裝置。適用於本發明之熟知植入物及模組的實例包括：美國專利第4,487,603號，其展示在控制速率下分配藥物之可植入微輸注泵；美國專利第4,486,194號，其展示經由皮膚投與藥物之治療裝置；美國專利第4,447,233號，其展示在精確輸注速率下傳遞藥物之藥物輸注泵；美國專利第4,447,224號，其展示用於連續藥物傳遞之變速流可植入輸注儀器；美國專利第4,439,196號，其展示具有多腔室之滲透藥物傳遞系統；及美國專利第4,475,196號，其展示滲透藥物傳遞系統。多種其他該等植入物、傳遞系統及模組為熟習此項技術者已知。

在某些實施例中，本發明之抗體或蛋白質可經調配以確保活體

內正常分佈。舉例而言，血腦屏障(BBB)排除了許多高度親水化合物。為確保本發明之治療化合物與BBB交叉(若需要)，可例如在脂質體中調配該等化合物。對於製造脂質體之方法，參見例如美國專利4,522,811；5,374,548；及5,399,331。脂質體可包含一或多個部分，該等部分經選擇性輸送至特定細胞或器官中，由此增強靶向藥物傳遞(參見例如V.V. Ranade 1989, J. Cline Pharmacol. 29:685)。例示性靶向部分包括葉酸鹽或生物素(參見例如Low等人之美國專利5,416,016)；甘露糖昔(Umezawa等人 1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗體(P.G. Bloeman等人 1995, FEBS Lett. 357:140；M. Owais等人 1995, Antimicrob. Agents Chernother. 39:180)；界面活性劑蛋白質A受體(Briscoe等人 1995, Am. J. Physiol. 268:C134)；p120(Schreier等人 1994, J. Biol. Chem. 269:9090)；亦參見Keinanen及Laukkonen 1994, FEBS Lett. 346:123；Killion及Fidler 1994, Immunomethods 4:273。

### 本發明之用途及方法

本發明之抗體或蛋白質具有活體外及活體內診斷及治療效用。舉例而言，此等分子可投與至培養物中(例如活體外或活體內)，或個體體內(例如活體內)之細胞中以治療、預防或診斷多種病症。

該等方法尤其適用於治療、預防或診斷IL-17A相關病症及/或自體免疫及發炎病症，例如類風濕性關節炎或牛皮癬。

特定言之，本發明提供一種治療IL-17A相關病症及/或自體免疫及發炎病症之方法。在某些實施例中，該方法包含向有需要之個體投與本發明之經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質。

本發明亦提供藉由使細胞與包含治療有效劑量之本發明抗體之組合物接觸降低或抑制目標細胞或組織中IL-17A或IL-17AF誘發之信號傳導反應的方法。

本發明亦提供用於降低細胞中IL6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及/或CCL2之含量的方法，包含使細胞與本發明之抗體或抗原結合片段(諸如包含其抗原結合部分之蛋白質)接觸的步驟。

在本說明書中，短語「IL-17A/AF介導之疾病」或「IL-17A/AF相關病症」涵蓋IL-17A或IL-17AF在疾病或醫學病狀中直接或間接發揮作用(包括疾病或病狀之起因、發展、進展、持久性或病變)的所有疾病及醫學病狀。因此，此等術語包括與異常IL-17A/AF含量相關或藉由異常IL-17A/AF含量表徵之病狀，及/或可藉由降低或抑制目標細胞或組織中IL-17A/AF誘發之活性(例如IL-6或GRO- $\alpha$ 產生)治療之疾病或病狀。此等疾病或病狀包括發炎病狀及自體免疫疾病，諸如關節炎、類風濕性關節炎或牛皮癬。此等疾病或病狀進一步包括過敏症及過敏性病狀、過敏性反應、慢性阻塞性肺病、囊腫性纖維化及器官或組織移植排斥。

舉例而言，本發明之抗體或蛋白質可用於治療心臟移植、肺移植、心肺聯合移植、肝臟移植、腎臟移植、胰臟移植、皮膚移植或角膜移植之接受者，包括同種異體移植排斥或異種移植排斥，及用於預防移植植物抗宿主疾病，諸如在骨髓移植及器官移植後相關的動脈硬化。

本發明之抗體或蛋白質適用於(但不限於)治療、預防或改善自體免疫疾病及發炎病狀，尤其具有包括自體免疫組分之病因的發炎病狀，諸如關節炎(例如類風濕性關節炎、慢性漸進性關節炎及變形性關節炎)及風濕性疾病，包括涉及骨質流失之發炎病狀及風濕性疾病、發炎性疼痛、脊椎關節病(包括僵直性脊椎炎)、賴特症候群(Reiter syndrome)、反應性關節炎、牛皮癬性關節炎、幼年特發性關節炎及腸病性關節炎、起止點炎(enthesis)、過敏(包括氣管過敏及表皮過敏)及過敏症。可使用本發明抗體之特定自體免疫疾病包括自體

免疫血液病症(包括例如溶血性貧血、再生障礙性貧血、純紅細胞貧血及特發性血小板減少症)、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性肌肉疾病(皮肌炎)、牙周炎、多軟骨炎、硬皮病、韋格納肉芽腫病(Wegener granulomatosis)、皮肌炎、慢性活動性肝炎、重症肌無力、牛皮癬、史蒂芬-約翰遜症候群(Steven-Johnson syndrome)、特發性口炎性腹瀉、自體免疫發炎性腸病(包括例如潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)及腸激躁症候群)、內分泌眼病、葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)、類肉瘤病、多發性硬化症、全身性硬化症、纖維變性疾病、原發性膽汁性肝硬化、幼年型糖尿病(I型糖尿病)、葡萄膜炎、乾燥性角膜結膜炎及春季角膜結膜炎、肺間質纖維化、假體骨質溶解、絲球體腎炎(存在及不存在腎病症候群，例如包括特發性腎病症候群或微小腎病變)、多發性骨髓瘤、其他類型之腫瘤、皮膚及角膜之發炎疾病、肌炎、骨骼植入物鬆動、代謝障礙(諸如肥胖症、動脈粥樣硬化及其他心血管疾病，包括擴張型心肌病、心肌炎、II型糖尿病及血脂異常)、及自體免疫甲狀腺疾病(包括橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto thyroiditis))、小及中等血管原發性血管炎、大血管血管炎(包括巨細胞性動脈炎)、化膿性汗腺炎、視神經脊髓炎、修格蘭氏症候群(Sjögren's syndrome)、貝西氏病(Behcet's disease)、異位性及接觸性皮炎、細支氣管炎、發炎性肌肉疾病、自體免疫外周神經病、免疫腎臟、肝臟及甲狀腺疾病、發炎及動脈粥樣硬化血栓形成、自發炎發燒症候群、免疫血液病症及皮膚及黏膜之大皰疾病。在解剖學上，葡萄膜炎可為前葡萄膜炎、中間葡萄膜炎、後葡萄膜炎或全葡萄膜炎。其可為慢性或急性。葡萄膜炎之病因可為自體免疫或非感染性、感染性、與全身疾病相關、或白點症候群。

本發明之抗體或蛋白質亦可適用於治療、預防或改善哮喘、支氣管炎、細支氣管炎、特發性間質性肺炎、塵肺病、肺氣腫、及氣管

之其他阻塞性或發炎疾病。

本發明之抗體或蛋白質亦可適用於治療骨骼代謝疾病，包括骨關節炎、骨質疏鬆症及其他炎性關節炎及一般骨質流失(包括年齡相關之骨質流失)及尤其牙周病。

此外，本發明之抗體或蛋白質亦可適用於治療慢性念珠菌病及其他慢性真菌疾病，以及寄生蟲感染之併發症，及吸菸併發症(此視為有希望的治療途徑)以及病毒感染及病毒感染併發症。

抑制IL-17及其受體為用於治療慢性發炎疾病之最有希望的新作用方式(MOA)之一，而牛皮癬為目前為IL-17調節劑藥物開發所研究之若干疾病中最晚期的適應症(Miossec P及Kolls JK. 2012, Nat Rev Drug Discov.10:763-76)。若干研究已清楚地證明在患有中度至重度斑塊狀牛皮癬之患者中阻斷IL-17A在短期為安全的且誘發非常值得注意的改良(例如 Hueber W, Patel DD, Dryja T等人，2010, Sci Transl Med. ;2:52ra72)。此等研究結果超出預期且證實IL-17A為牛皮癬發病機制中之關鍵信號傳導分子的假設(Garber K. 2012, Nat Biotechnology 30:475-477)。

此外，在包括最常見多發性硬化症(MS)模型實驗性自體免疫性腦脊髓炎之若干動物模型中，IL-17為發炎過程中之關鍵(Bettelli E等人，2008, Nature; 453:1051-57, Wang HH等人，2011, J Clin Neurosci; 18(10):1313-7, Matsushita T等人，2013, PLoS One; 8(4):e64835)。IL-17效應主要促發炎，且與其他細胞激素協同作用。IL-17效應，諸如誘發由上皮細胞產生趨化因子、調升巨噬細胞中之介白素(IL)-1b、腫瘤壞死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )及基質金屬蛋白酶(MMP)-9、及誘發分泌IL 6、IL-8及前列腺素E2，非常符合MS病變之許多態樣。亦存在反對IL-17在神經炎症中之關鍵作用的資料，包括小鼠之轉殖基因過度表現模型(Haak S等人 2009, JCI; 119:61-69)。

哮喘為自發或響應於治療地由嚴重程度方面有變化的氣流阻塞症狀臨床表現的氣管異質性發炎疾病。雖然哮喘已視為由2型T輔助細胞(Th2)細胞及其產物驅動，但最新資料表明Th2高基因標記存在於僅約50%患有哮喘之個體的氣管中(Woodruff PG等人 2009, Am J Respir Crit Care Med 180:388-95)。嗜中性發炎在急性嚴重哮喘中占主導；一些患有哮喘之個體存在顯著痰中性白細胞增多及對吸入類固醇之不良臨床反應；且痰中性白細胞增多在服用大劑量吸入及/或經口類固醇之哮喘個體中為顯著的(Wenzel 2012, Nature Med 18:716-25)。

已報導與健康對照相比，患有哮喘之個體的循環及氣管中IL-17A含量增加與哮喘嚴重程度有關。過敏性肺部炎症小鼠模型中之臨床前研究已暗示嗜中性氣管發炎及抗類固醇的氣管高反應性中對IL-17A及其受體(IL-17RA)之要求。因此，IL-17A活體外特性、其在增加量哮喘中之存在、及疾病之臨床前模型證明IL-17A在對類固醇起不良反應之嗜中性及/或Th2低形式之疾病中的作用(Cosmi L等人 2009, Am J Respir Crit Care Med 180:388-95)。

因此，以下病狀列表包含用本發明之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質治療的尤其較佳的目標：多發性硬化症、牛皮癬、哮喘、全身性紅斑狼瘡症(SLE)及狼瘡腎炎。

本發明之抗體或蛋白質可作為唯一活性成分投與或與例如佐劑一起投與或與其他藥物(例如免疫抑制劑或免疫調節劑或其他消炎劑或其他細胞毒性劑或抗癌劑)組合投與，例如用於治療或預防上述疾病。舉例而言，本發明之抗體可與以下組合使用：DMARD，例如金鹽、柳氮磺吡啶(sulphasalazine)、抗瘧疾劑(antimalarias)、甲胺喋呤、D-青黴胺(D-penicillamine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、黴酚酸(mycophenolic acid)、他克莫司(tacrolimus)、西羅莫司(sirolimus)、米諾環素(minocycline)、來氟米特(leflunomide)、糖皮質激素；鈣調神

經磷酸酶抑制劑，例如環孢素A(cyclosporin A)或FK 506；淋巴細胞再循環調節劑，例如FTY720及FTY720類似物；mTOR抑制劑，例如雷帕黴素(rapamycin)、40-O-(2-羥乙基)-雷帕黴素、CCI1779、ABT578、AP23573或TAFA-93；具有免疫抑制特性之子囊黴素(ascomycin)，例如ABT-281、ASM981等；皮質類固醇；環磷醯胺；硫唑嘌呤；來氟米特；咪唑立賓(mizoribine)；黴酚酸酯(myco-phenoate mofetil)；15-去氧史帕胍琳(15-deoxyspergualine)或其免疫抑制同系物、類似物或衍生物；免疫抑制單株抗體，例如針對白血球受體之單株抗體，例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD58、CD80、CD86或其配體；其他免疫調節化合物，例如具有CTLA4或其突變體之至少一部分胞外域的重組結合分子，例如CTLA4或其突變體之至少胞外部分與非CTLA4蛋白質序列，例如CTLA4Ig(先前命名為ATCC 68629)或其突變體(例如LEA29Y)接合；黏著性分子抑制劑，例如LFA-1拮抗劑、ICAM-1或ICAM-3拮抗劑、VCAM-4拮抗劑或VLA-4拮抗劑；或化學治療劑，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)、吉西他濱(gemcitabine)、順鉑、阿黴素或5-氟尿嘧啶；抗TNF劑，例如針對TNF之單株抗體，例如英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、CDP870、或針對TNF-RI或TNF-RII之受體構築體，例如依那西普(Etanercept)、PEG-TNF-RI；前發炎性細胞激素之阻斷劑、IL1阻斷劑、例如阿那白滯素(Anakinra)或IL1捕獲劑、康納單抗(canakinumab)、IL13阻斷劑、IL4阻斷劑、IL6阻斷劑、其他IL17阻斷劑(諸如塞庫單抗(secukinumab)、博達單抗(broadalumab)、伊克單抗(ixekizumab))；趨化因子阻斷劑，例如蛋白酶(例如金屬蛋白酶)、抗-IL15抗體、抗-IL6抗體、抗-IL4抗體、抗-IL13抗體、抗-CD20抗體之抑制劑或活化劑；NSAID，諸如阿司匹林或抗感染劑(列表不限於所提及之藥劑)。

根據上文，在另一態樣中本發明提供：

如上文所定義之方法，包含例如相伴或依次共投與治療有效量之如本文中所揭示之抗-IL-17A抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，及至少一種第二原料藥，該第二原料藥為例如上文所指出之免疫抑制/免疫調節、消炎化療或抗感染藥物。

或，一種療法組合(例如套組)，包含治療有效量之a)如本文中所揭示之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，及b)至少一種第二物質，選自例如上文所指出之免疫抑制/免疫調節、消炎化療或抗感染藥物。該套組可包含其投與之說明。

當如本文中所揭示之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質與其他免疫抑制/免疫調節、消炎化療或抗感染療法一起投與時，共投與之組合化合物的劑量當然視所用輔助藥物之類型(例如其是否為DMARD、抗-TNF、IL1阻斷劑或其他)、所用特定藥物、所治療之病狀等而變化。

在一個實施例中，抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質可用於偵測IL-17A之含量或含有IL-17A之細胞的含量。此可例如藉由使樣品(諸如活體外樣品)及對照樣品與抗-IL-17A抗體(或蛋白質)在允許在抗體與IL-17A之間形成複合物的條件下接觸來達成。偵測樣品及對照中在抗體(或蛋白質)與IL-17A之間形成的任何複合物且比較。舉例而言，可使用本發明之組合物來進行此項技術中所熟知的標準偵測方法，諸如ELISA及流式細胞計數分析。

因此，在一個態樣中，本發明進一步提供偵測樣品中IL-17A(例如人類IL-17A抗原)之存在或量測IL-17A之量的方法，包含使樣品及對照樣品與特異性結合於IL-17A之本發明之抗體或蛋白質、或其抗原結合部分在允許在抗體或其部分與IL-17A之間形成複合物的條件下接觸。接著偵測複合物之形成，其中在樣品與對照樣品之間複合物形成

的差異指示樣品中存在IL-17A。

由本發明之組合物(例如抗體、蛋白質、人類抗體及雙特異性分子)及使用說明書組成之套組亦屬於本發明之範疇內。該套組可進一步含有至少一種額外試劑，或本發明之一或多種額外抗體或蛋白質(例如，具有與目標抗原上不同於第一抗體之抗原決定基結合之互補活性的抗體)。套組通常包括指示該套組之內容物之指定用途的標籤。術語標籤包括提供於該套組上或與其一起提供，或以另外方式伴隨該套組的任何文字或記錄材料。該套組可另外包含用於診斷患者是否屬於對如上文所定義之抗-IL-17A抗體治療起反應之群的工具。

已充分描述的本發明現由以下實例及申請專利範圍來進一步說明，該等實例及申請專利範圍為說明性的且不意欲進一步限制。

## 實例

XAB1為人類 IgG1/κ單株抗體。其為使用標準分子生物技術生成。簡言之，使用Medarex系統。小鼠經重組人類IL-17A免疫。小鼠藉由CO<sub>2</sub>吸入安樂死，收集脾細胞且使用PEG 4000與骨髓瘤細胞株融合。將融合細胞接種於具有腹壁細胞飼養層之孔中。自培養細胞獲取上清液且藉由ELISA分析IL-17A反應性mAb。選擇IL-17A mAb產生之陽性純系且析出。

鑑定負責分泌XAB1之融合瘤，以便基於初始有希望的抗體/抗原結合特徵進一步表徵，諸如IL-17A之結合親和力、阻斷IL-17A結合於其受體的能力、及在活體外分析中阻斷IL-17A介導之生物效應的能力。

XAB1之胺基酸序列為SEQ ID NO: 14(重鏈)及SEQ ID NO: 15(輕鏈)。選擇XAB1用於隨後的親和力成熟。

作為朝向結構引導之親和力成熟的第一步，如下所述測定自由態XAB1 Fab以及相應Fv與人類IL-17A之複合物的晶體結構。XAB1

Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構分析考慮到合理親和力成熟過程與更隨機化過程並排進行且作為更隨機化過程的替代。以下提供其他詳情。

此外，使用X射線結晶學表徵所生成的一些親和力成熟變異抗體。親和力成熟變異體之晶體資料分析允許更深入地瞭解變異抗體之結合行為，且如下文進一步所述發現一些出乎意料的特性。

### 實例1. 自由態XAB1 Fab之晶體結構

#### (i) 材料及方法

使用標準分子生物學方案獲得XAB1 Fab抗體片段。簡言之，選殖Fab且在大腸桿菌W3110中表現，使得重鏈上具有C端六組胺酸標誌。重組蛋白質藉由Ni-螯合層析純化，接著在SPX-75管柱上於10 mM TRIS pH 7.4、25 mM NaCl中之大小排阻層析純化。接著藉由超濾濃縮XAB1 Fab至10.4 mg/ml且結晶。

遵循標準結晶方案。簡言之，使用於沈滴中蒸氣擴散之方法，使晶體在19°C下生長於SD2 96孔板中。使蛋白質原料與含有40% PEG 300、0.1 M磷酸鈉-檸檬酸鹽pH 4.2之結晶緩衝液1:1混合。總液滴大小為0.4 μl。在X射線資料收集之前，將一種晶體安放於耐綸冰凍環中且直接急驟冷卻於液氮中。

使用標準方案進行X射線資料收集及加工。簡言之，在具有MAR225 CCD偵測器之Swiss Light Source, beamline X10SA下，使用1.0000 Å X射線輻射，收集達到2.1 Å解析度的X射線資料。在190 mm的晶體至偵測器距離下記錄各1.0°振盪的總計180幅圖像，且用HKL2000套裝軟體處理。晶體屬於晶格群C2，其中晶胞參數a = 51.63 Å, b = 132.09 Å, c = 77.25 Å, α = 90.00°, β = 98.88°, γ = 90.00°且一個XAB1 Fab分子處於不對稱單元中。達到2.1 Å解析度之R-對稱為10.4%且資料完成99.0%。

使用程式PHASER，藉由分子置換測定結構。由PDB條目1HEZ生成V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>及C<sub>H1</sub>/C<sub>L</sub>域之搜索模型。使用程式Coot(Crystallographic Object-Oriented Toolkit)及CNX(Crystallography & NMR eXplorer)2002版進行反覆模型建立及改進，直至無法對模型進行進一步顯著改良為止。所有資料之最終R-及R-自由分別為0.188及0.231。最終改進模型展示理想鍵長及鍵角分別為0.004Å及0.9°之均方根差(RMSD)。

(ii) 結果

XAB1 Fab之X射線改進結果提供於表9中且三維結構展示於圖1中。

**表9.使用程式CNX之XAB1 Fab的X射線改進。**

```

REMARK      3
REMARK      3 REFINEMENT.
REMARK      3   PROGRAM      : CNX 2002
REMARK      3   AUTHORS      : Brunger, Adams, Clore, Delano,
REMARK      3                      Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
REMARK      3                      Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
REMARK      3                      Rice, Simonson, Warren
REMARK      3                      and
REMARK      3                      Accelrys Inc.,
REMARK      3                      Yip, Dzakula).
REMARK      3
REMARK      3 DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK      3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 2.10
REMARK      3 RESOLUTION RANGE LOW  (ANGSTROMS) : 33.33
REMARK      3 DATA CUTOFF          (SIGMA(F)) : 0.0
REMARK      3 DATA CUTOFF HIGH    (ABS(F)) : 19645630.62
REMARK      3 DATA CUTOFF LOW     (ABS(F)) : 0.000000
REMARK      3 COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 98.2
REMARK      3 NUMBER OF REFLECTIONS      : 29298
REMARK      3
REMARK      3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK      3 CROSS-VALIDATION METHOD      : THROUGHOUT
REMARK      3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM
REMARK      3 R VALUE          (WORKING SET) : 0.188
REMARK      3 FREE R VALUE          : 0.231
REMARK      3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 4.9
REMARK      3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 1436
REMARK      3 ESTIMATED ERROR OF FREE R VALUE : 0.006
REMARK      3
REMARK      3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.
REMARK      3 TOTAL NUMBER OF BINS USED      : 6
REMARK      3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 2.10

```

REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (A) : 2.23  
 REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 94.7  
 REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 4478  
 REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.201  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.241  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 4.5  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 213  
 REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : 0.016  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT.  
 REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 3311  
 REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0  
 REMARK 3 HETEROGEN ATOMS : 5  
 REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 313  
 REMARK 3  
 REMARK 3 B VALUES.  
 REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A\*\*2) : 21.1  
 REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A\*\*2) : 27.4  
 REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE.  
 REMARK 3 B11 (A\*\*2) : -6.02  
 REMARK 3 B22 (A\*\*2) : 3.30  
 REMARK 3 B33 (A\*\*2) : 2.73  
 REMARK 3 B12 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B13 (A\*\*2) : 3.82  
 REMARK 3 B23 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 BULK SOLVENT MODELING.  
 REMARK 3 METHOD USED : FLAT MODEL  
 REMARK 3 KSOL : 0.399279  
 REMARK 3 BSOL : 54.4727 (A\*\*2)  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM LUZZATI PLOT (A) : 0.21  
 REMARK 3 ESD FROM SIGMAA (A) : 0.12  
 REMARK 3 LOW RESOLUTION CUTOFF (A) : 5.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 CROSS-VALIDATED ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM C-V LUZZATI PLOT (A) : 0.29  
 REMARK 3 ESD FROM C-V SIGMAA (A) : 0.14  
 REMARK 3  
 REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.  
 REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.004  
 REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 0.9  
 REMARK 3 DIHEDRAL ANGLES (DEGREES) : 21.4  
 REMARK 3 IMPROPER ANGLES (DEGREES) : 0.58  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL MODEL : RESTRAINED  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL FACTOR RESTRAINTS. RMS SIGMA  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.41 ; 1.50  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.21 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN BOND (A\*\*2) : 2.31 ; 2.00

```

REMARK 3 SIDE-CHAIN ANGLE (A**2): 3.44 ; 2.50
REMARK 3
REMARK 3 NCS MODEL : NONE
REMARK 3
REMARK 3 NCS RESTRAINTS. RMS SIGMA/WEIGHT
REMARK 3 GROUP 1 POSITIONAL (A) : NULL ; NULL
REMARK 3 GROUP 1 B-FACTOR (A**2) : NULL ; NULL
REMARK 3
REMARK 3 PARAMETER FILE 1 : protein_rep.param
REMARK 3 PARAMETER FILE 2 : water_rep.param
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 1 : protein_no_cter.top
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 2 : water.top
REMARK 3
REMARK 3 OTHER REFINEMENT REMARKS: NULL
SSBOND 1 CYS L 23 CYS L 88
SSBOND 2 CYS L 134 CYS L 194
SSBOND 3 CYS H 22 CYS H 96
SSBOND 4 CYS H 143 CYS H 199
CRYST1 51.627 132.089 77.247 90.00 98.88 90.00 C 1 2 1 8
ORIGX1 1.000000 0.000000 0.000000 0.00000
ORIGX2 0.000000 1.000000 0.000000 0.00000
ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.00000
SCALE1 0.019370 0.000000 0.003027 0.00000
SCALE2 0.000000 0.007571 0.000000 0.00000
SCALE3 0.000000 0.000000 0.013103 0.00000

```

圖1提供如實例1中所獲得之XAB1 Fab的三維結構。圖1A為空間填充表示。圖1B為草圖表示。XAB1 Fab之重鏈及輕鏈分別以深灰色及淺灰色顯現。

### 實例2. XAB1 Fv與人類IL-17A之複合物的晶體結構：用於結構引導之親和力成熟之互補位的分析

#### (i) 材料及方法

使用標準分子生物學方案獲得XAB1 Fv抗體片段。簡言之，選殖Fv且在大腸桿菌W3110中表現，使得重鏈上具有C端六組胺酸標誌且輕鏈上具有C端Strep標誌。藉由Ni-螯合層析純化重組蛋白質。

接著使用標準方法製備XAB1 Fv片段與人類IL-17A之複合物。簡言之，人類IL-17A(1.1 mg)與過量Fv(2.7 mg)混合，且使複合物在S100大小排阻層析上，於10 mM TRIS pH 7.4、25 mM NaCl中跑膠。接著藉由超濾濃縮蛋白質複合物至21.2 mg/ml且結晶。

遵循標準結晶方案。簡言之，使用於沈滴中蒸氣擴散之方法，使晶體在19°C下生長於SD2 96孔板中。使蛋白質原料與含有10% PEG 20,000、0.1 M Bicine pH 9.0、2.0%(v/v)二噁烷之結晶緩衝液1:1混合。總液滴大小為0.4  $\mu$ l。在X射線資料收集之前，將一種晶體簡單轉移至20% PEG 20,000、30%甘油1:1混合之結晶緩衝液中，且隨後急驟冷卻於液氮中。

使用標準方案進行X射線資料收集及加工。簡言之，在具有MAR225 CCD偵測器之Swiss Light Source, Beamline X10SA下，使用1.0000 $\text{\AA}$  X射線輻射，收集達到3.0 $\text{\AA}$ 解析度的X射線資料。在300 mm的晶體至偵測器距離下記錄各1.0°振盪的總計110幅圖像，且用HKL2000套裝軟體處理。晶體屬於晶格群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2，其中晶胞參數a = 184.31 $\text{\AA}$ ，b = 55.81 $\text{\AA}$ ，c = 70.99 $\text{\AA}$ ， $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ 。達到3.0 $\text{\AA}$ 解析度之R-對稱為11.2%且資料完成99.9%。

使用程式PHASER，藉由分子置換測定結構。由先前測定之XAB1 Fab的晶體結構(參見實例1)生成XAB1 Fv之搜索模型。由所公開之人類IL-17F晶體結構生成IL-17A之搜索模型(PDB條目1jpy)。使用 Coot(Crystallographic Object-Oriented Toolkit) 及 CNX(Crystallography & NMR eXplorer)2002版進行反覆模型建立及改進，直至無法對模型進行進一步顯著改良為止。所有資料之最終R-及R-自由分別為0.215及0.269。最終改進模型展示理想鍵長及鍵角分別為0.007 $\text{\AA}$ 及1.0°之均方根差(RMSD)。

### (ii) 結果

分子置換計算揭示包含一個IL-17A均二聚體與兩個XAB1 Fv片段結合之二聚複合物。XAB1 Fv與人類IL-17A之複合物之X射線改進的結果提供於表10中且此複合物之三維結構展示於圖2中。各XAB1 Fv接觸兩個IL-17A次單位，但大多數分子間接觸(約96%之隱匿面)僅由

一個IL-17A次單位促成。

表10.藉由程式CNX獲得之XAB1 Fv與IL-17A之複合物的X射線改進。

REMARK 3  
 REMARK 3 REFINEMENT.  
 REMARK 3 PROGRAM : CNX 2002  
 REMARK 3 AUTHORS : Brunger, Adams, Clore, Delano,  
 REMARK 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,  
 REMARK 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,  
 REMARK 3 Rice, Simonson, Warren  
 REMARK 3 and  
 REMARK 3 Accelrys Inc.,  
 REMARK 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,  
 REMARK 3 Yip, Dzakula).  
 REMARK 3  
 REMARK 3 DATA USED IN REFINEMENT.  
 REMARK 3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 3.01  
 REMARK 3 RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 47.74  
 REMARK 3 DATA CUTOFF (SIGMA(F)) : 0.0  
 REMARK 3 DATA CUTOFF HIGH (ABS(F)) : 15276175.80  
 REMARK 3 DATA CUTOFF LOW (ABS(F)) : 0.000000  
 REMARK 3 COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 99.5  
 REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 15190  
 REMARK 3  
 REMARK 3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.  
 REMARK 3 CROSS-VALIDATION METHOD : THROUGHOUT  
 REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM  
 REMARK 3 R VALUE (WORKING SET) : 0.215  
 REMARK 3 FREE R VALUE : 0.269  
 REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 4.9  
 REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 748  
 REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF FREE R VALUE : 0.010  
 REMARK 3  
 REMARK 3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.  
 REMARK 3 TOTAL NUMBER OF BINS USED : 6  
 REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 3.00  
 REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (A) : 3.19  
 REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 94.6  
 REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 2234  
 REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.301  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.350  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.3  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 124  
 REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : 0.031  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT.  
 REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 5007  
 REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0  
 REMARK 3 HETEROGEN ATOMS : 0  
 REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 33  
 REMARK 3

REMARK 3 B VALUES.  
 REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A\*\*2) : 54.9  
 REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A\*\*2) : 44.8  
 REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE.  
 REMARK 3 B11 (A\*\*2) : 5.66  
 REMARK 3 B22 (A\*\*2) : 0.97  
 REMARK 3 B33 (A\*\*2) : -6.63  
 REMARK 3 B12 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B13 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B23 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 BULK SOLVENT MODELING.  
 REMARK 3 METHOD USED : FLAT MODEL  
 REMARK 3 KSOL : 0.313124  
 REMARK 3 BSOL : 20.608 (A\*\*2)  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM LUZZATI PLOT (A) : 0.33  
 REMARK 3 ESD FROM SIGMAA (A) : 0.39  
 REMARK 3 LOW RESOLUTION CUTOFF (A) : 5.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 CROSS-VALIDATED ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM C-V LUZZATI PLOT (A) : 0.44  
 REMARK 3 ESD FROM C-V SIGMAA (A) : 0.51  
 REMARK 3  
 REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.  
 REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.007  
 REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 1.0  
 REMARK 3 DIHEDRAL ANGLES (DEGREES) : 22.1  
 REMARK 3 IMPROPER ANGLES (DEGREES) : 0.78  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL MODEL : RESTRAINED  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL FACTOR RESTRAINTS. RMS SIGMA  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.46 ; 1.50  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.62 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.63 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.62 ; 2.50  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NCS MODEL : NONE  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NCS RESTRAINTS. RMS SIGMA/WEIGHT  
 REMARK 3 GROUP 1 POSITIONAL (A) : NULL ; NULL  
 REMARK 3 GROUP 1 B-FACTOR (A\*\*2) : NULL ; NULL  
 REMARK 3  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 1 : protein\_rep.param  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 2 : water\_rep.param  
 REMARK 3 TOPOLOGY FILE 1 : protein\_no\_cter.top  
 REMARK 3 TOPOLOGY FILE 2 : water.top  
 REMARK 3  
 REMARK 3 OTHER REFINEMENT REMARKS: NULL  
 SSBOND 1 CYS L 23 CYS L 88

圖2提供如實例2中所獲得之XAB1 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖2A展示空間填充表示之兩個XAB1 Fv片段；IL-17A均二聚體以草圖表示展示。圖2B展示草圖表示之兩個XAB1 Fv片段；IL-17A均二聚體以空間填充表示展示。XAB1 Fv之重鏈及輕鏈分別以深灰色及淺灰色表示。IL-17A均二聚體之一條鏈以淺灰色表示，另一條鏈以深灰色表示。

進行複合物之詳細分析。使用程式Coot及Pymol對晶體結構進行仔細的目視檢查，且使用CCP4程式套之程式AREAIMOL計算隱匿在抗體-抗原界面下的蛋白質表面的量。使用抗體與抗原原子之間3.9Å的截止距離定義分子間接觸。結合之概要概述如下。XAB1之結合為對稱的；各Fv片段結合於IL17A均二聚體上之等效抗原決定基。

各Fv片段之結合隱匿在平均 $1732\text{\AA}^2$ 之組合表面上，且涉及30個抗體及25個IL-17A胺基酸殘基。XAB1輕鏈之隱匿面的貢獻(約 $560\text{\AA}^2$ )大於重鏈之隱匿面的貢獻(約 $275\text{\AA}^2$ )。此外，CDRH2不與IL-17A進行任何直接接觸且似乎離蛋白質抗原太遠而無法提供親和力成熟之機會。CDRH1貢獻似乎僅限於一個胺基酸側鏈(Tyr32)；此CDR亦離IL-17A太遠而無法經由胺基酸取代提供親和力成熟之機會。XAB1 CDRH3與IL-17A進行多個緊密接觸。然而，仔細檢查此區內之結構未能揭示任何藉由點突變進一步增強此等接觸之機會；因此，認為

CDRH3不適合作為親和力增強之目標區。相比之下，對輕鏈CDR的檢查展示多個親和力成熟之機會。在三個輕鏈CDR中，CDRL1被視為最有希望，且基於此觀測結果，本發明之發明者建議使輕鏈位置30至32隨機以求強化與IL-17A殘基Arg124、Phe133及Tyr85之接觸。

### 藉由合理設計之親和力成熟

基於以上結果，發現XAB1與均二聚體IL-17A之界面相對較小且特徵在於輕鏈之主導貢獻，無CDRH2參與，及CDRH1之主要間接貢獻(亦即經由CDRH3之穩定)。因此，XAB1之重鏈似乎不提供有希望的親和力成熟機會。

相比之下，XAB1輕鏈在胺基酸殘基30至32(視情況插入至多4個胺基酸殘基)(CDRL1)、胺基酸51至53及56(CDRL2)及胺基酸殘基92及93(視情況插入至多4個胺基酸殘基)提供一些機會。

所公開之均二聚體人類IL-17F之晶體結構及均二聚體IL-17F與人類受體IL-17RA之複合物的結構的可用性使得可基於所觀察到的結晶IL-17A及IL-17A與XAB1(及其變異體)之複合物的結構進行預測。

研究IL-17F與IL-17A之間所預測的結構相似性(基於序列一致性及同源性)。IL-17F及IL-17A具有結構相似處。本發明之發明者假定IL-17A以所公開之IL-17F/IL-17RA已展示相同之方式結合於其受體之N端域(Ely LK等人 2009, Nat Immunol. 10:1245-51)。

基於人類IL-17A及IL-17F所觀察到的結構及已知序列之比較，以及源於其他物種之IL-17A的序列，本發明之發明者進行許多額外的預測：

預期XAB1(及源於其且對由XAB1靶向之抗原決定基具有經改良之親和力的抗體變異體)對人類IL-17A具有高度特異性。假定該等抗體保留與其他物種之IL-17A的交叉反應性(基於物種間高度保守的序列一致性或同源性)。然而，基於可獲得的序列資料及結構預測，並

不清楚與IL-17A之物種變異體的何種程度交叉反應性可得以預期。考慮到與其他介白素不存在結構相似性，預期與該等分子(來自人類或其他物種)之交叉反應性極不可能。

此外，IL-17A及IL-17F(尤其N端區)序列之間的差異得出本發明之抗-IL-17A抗體不會結合於IL-17F的預測。舉例而言，兩種晶體結構之疊加指示位阻可能阻止此等抗體與IL-17F之間的結合。此外，對IL-17AF雜二聚體結構之推斷亦表明該阻礙(尤其在N端區)可能妨礙抗體結合於IL-17AF雜二聚體，且從而導致缺少與IL-17AF之結合，亦即缺少此等抗體對IL-17AF雜二聚體的交叉反應性。

### **實例3. 親和力成熟抗體變異體之生成**

出於上文所論述之原因，初始抗體XAB1之實際親和力成熟集中於輕鏈。研究分三步進行：(i)庫生成、(ii)庫篩檢、及(iii)候選物表徵。

為便於操作，以Fab片段樣式進行蛋白質工程改造研究(亦即親和力成熟)。候選物在工程改造後將樣式變回完整IgG。

#### **(i) 庫生成**

使編碼輕鏈可變域之DNA序列突變以創造基因變異體之庫。將兩種不同方法(A及B)用於庫生成，提供兩個獨立的庫。

##### **1) 方法A-藉由易錯PCR隨機突變：**

使用易錯PCR使編碼XAB1輕鏈可變域之DNA區隨機突變。更詳細地，使用聚合酶Mutazyme II擴增此區，在高頻下引入突變(關於更多詳情，參見為GeneMorph II隨機突變誘發套組所供應之指導，由Stratagene #200550供應)。然而，可使用任何合適隨機突變技術或策略。

PCR片段變異體之庫接著藉由切斷且黏合於XAB1之表現載體中來選殖。本質上，未突變的親本序列自表現載體切除且經在其位置黏

合的隨機誘變處理之序列置換。使用標準分子生物學技術達成此舉。

此產生包含多種經隨機誘變處理之可變域序列的表現載體變異體庫。

## 2) 方法B-藉由合理設計突變：

在此方法下，庫之生成由以親和力成熟之前驅物形式進行的結構分析指導。基於來源於上述晶體結構之抗原決定基及互補位資訊靶向特定胺基酸殘基(尤其XAB1輕鏈之CDR1中)。

使基於晶體結構資訊所選之三個胺基酸殘基充分隨機化。使用標準分子生物學方法進行構築。

首先，使用簡併寡核苷酸，藉由PCR擴增編碼適當CDR及輕鏈框架之第一部分的可變區片段。亦即，按一定方式合成編碼CDR之寡核苷酸，以便在所定義之位置處提供多種鹼基。寡核苷酸之設計使得能夠藉由NNK簡併密碼子(其中N代表全部4種鹼基A、T、C及G，且K代表G及T)使CDR中特異性靶向的胺基酸位置隨機化且在彼等位置允許全部20種天然胺基酸。

在此第一步後，亦藉由PCR擴增與該第一部分重疊且編碼輕鏈之剩餘部分的第二片段。接著藉由「組裝」PCR組裝兩種片段以生成完整的可變輕鏈，且以『切斷及黏合』之方式選殖回至表現載體中。從而，親本序列經一系列經合理突變之序列置換，由此在特定胺基酸位置處呈現全部20種天然胺基酸。

### (ii) 庫篩檢

在包含編碼XAB1變異體之序列的庫已生成後，必須將其篩檢以便選擇具有優於親本XAB1序列之特徵(例如對IL-17A之較高親和力)的庫。

使用兩種篩檢技術。首先，藉由「群落過濾篩檢」(CFS)進行高通量篩檢。此分析允許方便篩檢大量純系。其使得可在ELISA篩檢前

減少至陽性採樣數，尤其適用於隨機法「方法A」，因為庫大小與「方法B」之庫大小(僅8000)相比大得多( $>10^5$ )。ELISA篩檢對於 $10^4$ 個或 $10^4$ 個以下純系為方便的且給出更加定量的結果。

### 1) 群落過濾篩檢(CFS)：

CFS之方案係基於Skerra等人 1991, Anal Biochem 196:151-155。進行一些修改。

表現Fab變異體庫之大腸桿菌群落在含有LB瓊脂及葡萄糖之培養皿頂部上的濾紙上生長。並行地，用目標蛋白質(IL-17A)塗佈PVDF膜。將經塗佈之膜置放於瓊脂板上。將具有表現Fab片段之大腸桿菌群落的濾紙置放於該膜頂部。由該等細胞表現之Fab片段自群落擴散且結合目標IL-17A。接著使用與鹼性磷酸酶結合之二級抗體偵測由此捕獲於PVDF膜上之Fab片段用於西方染色。先前確立使用XAB1作為參考僅選擇具有經改良之結合特性之變異體的條件。

更特定言之，在大腸桿菌細胞經庫轉形後，將該等細胞展布於含有LB瓊脂 + 1%葡萄糖+所關注之抗生素的培養皿上所置放的Durapore<sup>TM</sup>膜濾器(0.22  $\mu$ m GV, Millipore<sup>®</sup>，目錄號GVWP09050)。板在30°C下培育隔夜。

PVDF膜(Immobilon-P, Millipore<sup>®</sup>，目錄號IPVH08100)在甲醇中預濕潤，在PBS中洗滌且用1  $\mu$ g/mL huIL-17A於PBS中之溶液塗佈。膜在室溫下培育隔夜。在塗佈後，膜於Tris緩衝生理食鹽水(TBS)+0.05% Tween(TBST)中洗滌2次，且在室溫下於5%乳狀TBST中阻斷兩小時。接著，膜於TBST中洗滌四次且於具有1 mM IPTG之2×YT培養基中浸泡。將此膜(稱為捕獲膜)置放於具有1 mM IPTG +所關注之抗生素的LB瓊脂板上，且用頂部具有群落之Durapore膜覆蓋。所得夾層在30°C下培育四小時。

在此培育後，捕獲膜用TBST洗滌4次且在室溫下於5%乳狀TBST

中阻斷1小時。接著，膜用TBST洗滌一次且在室溫下與二級抗體(抗-hu\_κ輕鏈抗體，鹼性磷酸酶(AP)結合，Sigma # A3813，於2%乳狀TBST中1:5000稀釋)一起培育1小時。之後，膜於TBST中洗滌4次，於TBS中洗滌一次且於受質溶液(SigmaFast BCIP/NBT錠劑，1錠劑於10 ml H<sub>2</sub>O中)中培育。當信號達到預期強度時，膜用水洗滌且使其乾燥。

在捕獲膜上出現信號後，挑取相比親本XAB1給出較強信號的群落且如下所述進行二次ELISA篩檢。

## 2) *ELISA篩檢：*

在CFS後，使用ELISA篩檢藉由CFS選擇之候選物。簡言之，對於由易錯PCR突變誘發鑑定之相對較低數目的變異體(亦即庫A)，在96孔樣式中手動進行ELISA。相比之下，對於藉由合理設計構築之庫(方法B)，需要在ELISA水平下篩檢較大數目的經改良之純系，以便能夠區分其對IL-17A之不同結合親和力且鑑定具有最高親和力之純系。在384孔板樣式中，將ELISA機器人用於該目的。然而，在各種情況下的ELISA方案相同，唯一差異在於試劑的體積。

### a) 細胞培養：

純系首先在30°C、900 rpm下，於2×YT培養基 + 1%葡萄糖 + 所關注之抗生素中生長隔夜。含有此培養物之板稱為母板。次日，將來自母板之培養物的等分試樣轉移至含有2×YT培養基 + 0.1%葡萄糖 + 所關注之抗生素的表現板中。此等板在30°C、900 rpm下培育約3小時。接著，添加異丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖昔(IPTG)溶液至0.5 mM之最終濃度。板在30°C、990 rpm下培育隔夜。

次日，添加溶解緩衝液(2×)硼酸鹽緩衝生理食鹽水(BBS)溶液(Teknova #B0205)+ 2.5 mg/ml溶酶體 + 10 u/ml核酸酶)至培養物中。板在室溫下培育1小時，接著添加12.5%乳狀TBST用於阻斷。在30分

鐘培育後，將細胞溶解物1:10稀釋於2%乳狀TBST中且轉移至ELISA板中。

**b) ELISA :**

在1小時期間，用1  $\mu$ g/ml huIL-17A溶液塗佈ELISA板(Nunc Maxisorp)。板用TBST洗滌一次且用5%乳狀TBST阻斷1小時。在阻斷後，板用TBST洗滌3次，且隨後將所稀釋之細胞溶解物裝載至板上並培育1小時。之後，板用TBST洗滌3次且與AP結合之二級抗體一起培育1小時。

板最後用TBST洗滌3次且隨後與受質溶液(AttoPhos substrate Set, Roche #11 681 982 001)一起培育。整個過程在室溫下進行。

除上述「經典」ELISA之外，為在對目標蛋白質具有極高親和力(在皮莫耳範圍中)之純系之間進行較佳鑑別，亦進行經修改之ELISA。為此，開發「解離速率」ELISA及「競爭」ELISA，如下文所詳述。

**c) 「解離速率」ELISA :**

對於此分析，與「經典」ELISA方案相比的修改關於結合步驟(在ELISA板中培育細胞溶解物)後之洗滌步驟。在「經典」方案中，板用TBST洗滌3次。分配洗滌液且即刻吸出，無任何培育時間。對於「解離速率」ELISA，板在至少3小時期間洗滌6次。此長時間洗滌增加分析之嚴格度，且使得可在緩慢解離速率下鑑定純系。

**d) 「競爭」ELISA :**

此經修改之ELISA方案在結合步驟後包括額外步驟。在細胞溶解物培育後，板用TBST洗滌3次且隨後，在室溫下培育親本XAB1之溶液(200 nM在2%乳狀TBST中)隔夜。此與過量親本Fab一起之長時間培育使得可如在「解離速率」ELISA情況下一般在緩慢解離速率下鑑定純系，在具有皮莫耳範圍內之親和力的純系之間產生較佳鑑別。該方

案之其餘部分與「經典」ELISA方案類似。用於此情況之二級抗體為AP結合之抗Flag標誌抗體，因為來自庫之Fab變異體而非用於競爭之親本XAB1 Fab在重鏈C端處具有Flag標誌。

*(iii) 候選物表徵*

在篩檢期間鑑定之採樣數為在較大規模下產生，用於在額外分析中進一步物理化學表徵及證實高親和力結合於IL-17A及/或其他有利特性。此等更詳細地描述如下。

*(iv) 結果：在XAB1之親和力成熟後候選物之篩檢及初始表徵*

**1) 隨機突變誘發方法(方法A)：**

發現在易錯PCR庫生成後之突變率最高達每一基因2至3個突變。約 $3 \times 10^4$ 個純系藉由群落過濾篩檢來篩檢，且94個純系數目鑑定為經改良且允許進行結合、解離速率及競爭ELISA。ELISA資料與定序結果組合得出6個候選物突出3個潛在改良熱點的鑑定結果：LCDR1中之位置28處的Gly至Val (G28V)；構架3中之位置66處之Gly至Val (G66V)或Ser (G66S)；LCDR3中之Asn92至Asp (N92D)(資料未圖示，但定位與XAB2 VL，亦即SEQ ID NO: 25之定位一致)。

在一個純系中觀察到終止密碼子，但並不相關，因為所用大腸桿菌菌株為允許通讀的琥珀抑制基因菌株。基於所獲得之資料，G28V及G66V突變似乎產生最佳改良。藉由標準分子生物學技術生成攜帶所提及之兩個點突變的XAB1的變異體。此外，選殖具有N92D取代之另一變異體，以便測試移除轉譯後可能的脫醯胺位點(N92、S93)是否為有利的。對該兩種變異體進行更詳細地輪廓描繪，尤其最終產生XAB2之稱為XAB\_A2的三倍突變型變異體。在XAB2中，根據Kabat定義之胺基酸號碼1至23構成構架1，胺基酸號碼24至34(Kabat)構成LCDR1，胺基酸號碼35至49(Kabat)構成構架2，胺基酸50至56(Kabat)構成LCDR2，胺基酸57至88(Kabat)構成構架3，胺基酸89至

97(Kabat)構成LCDR3且胺基酸98至107(Kabat)構成構架4。根據本發明之實施例，其他VL序列之相同細分亦適用。

因此，上文提及之G66V取代處於構架區中，其稱為外環。在一些情況下，此構架區能夠有助於結合。基於可獲得的結構資訊，回顧表明此突變實際上可能夠與不能自晶體結構解析但可接近於外環之IL-17A之區相互作用。

## 2) 合理突變誘發方法(方法B)：

藉由將32個隨機挑選之成員定序生成在隨機化位置的胺基酸分佈快照。不存在顯著偏差，儘管不能進行此小數目序列的統計。篩檢約 $4 \times 10^4$ 個純系，重複取樣理論上8000之庫大小。鑑定大數目的採樣數且允許2630個純系進行ELISA篩檢。進行結合、解離速率及競爭ELISA，將具有最高改良之60個純系定序。在該60個純系中，發現22個獨特序列，且結果概述於表11中。

**表11.所有所選22個獨特候選物之ELISA。**相對於親本Fab XAB1校正各值。代表值表明在60個採樣數內多久發現某一序列。胺基酸序列中之差異在最後三行中給出。XAB1在彼等位置具有胺基酸I S A。又大腸桿菌Fab表現培養物之粗提取物測定ELISA信號。

候選物名稱	經典ELISA	解離速率ELISA	競爭ELISA	代表%	30	31	32
MB491	2.1	43.0	44.2	5	F	F	W
MB483	3.1	47.1	45.2	2	F	W	T
MB447	3.0	45.5	57.0	5	F	W	W
MB457	2.7	34.7	41.0	5	I	W	S
MB464	2.7	34.9	36.9	7	I	Y	Q
MB432	2.3	44.2	37.3	12	L	F	A
MB454	2.9	34.2	36.6	2	L	W	A
MB444	3.2	48.9	52.4	2	L	W	E
MB456	2.4	45.1	46.7	2	L	W	H
MB440	2.8	52.5	54.0	5	L	W	Q
MB450	2.9	41.5	53.3	5	M	W	W
MB435	2.7	44.7	44.6	2	N	W	E
MB438	2.7	41.5	41.1	7	P	Y	A
MB453	2.7	43.3	46.4	9	V	F	W
MB448	2.9	40.4	51.5	5	V	W	M
MB486	1.9	58.5	64.9	2	W	W	M

MB434	2.4	44.4	39.5	7	W	W	Y
MB458	2.7	33.0	42.1	5	W	Y	Q
MB463	2.7	34.2	31.6	2	Y	F	E
MB468	2.8	43.9	60.0	5	Y	W	E
MB433	2.3	39.7	29.3	2	Y	W	G
MB461	2.9	49.8	62.8	2	Y	W	T

在22個獨特純系中，選擇6個用於0.5 L規模標準大腸桿菌表現及藉由IMAC (Ni-NTA)及SEC之兩步式純化。接著使用經純化之Fab藉由ELISA證實結合改良。

所選且經純化之Fab候選物與XAB1相比之ELISA結果展示於圖3中，其中圖形編號對應於候選物名稱如下：1為MB440；2為MB464；3為MB468；4為MB444；5為MB435；6為MB463；7為XAB1。

圖3A為展示經校正之信號與Fab濃度(M)之圖形。可見所有所選純系產生比XAB1高的信號。圖3B為展示經校正之剩餘信號與洗滌培育時間(小時)之圖形。所有所選純系產生比XAB1高的信號。圖3C為展示經校正之信號與Fab競爭者濃度(M)之圖形。再次，可見所有所選純系產生比XAB1高的信號。

#### 實例4. 靶向轉譯後可能的脫醯胺位點。

本發明之發明者假定胺基酸基元天冬醯胺後面接著甘胺酸(NG)或亦當後面接著絲胺酸(NS)時之較低延伸鏈可易於轉譯後脫醯胺。該等基元存在於抗體XAB1之L-CDR2(位置56/57)及L-CDR3(92/93)中。為了測試NG位點是否可移除而不影響結合及活性特性，生成四個IgG變異體。此四個點突變變異體藉由標準分子生物學程序選殖，且藉由100 ml規模之標準短暫HEK細胞轉染產生且經由蛋白質A管柱純化。

在活體外中和分析(例如，如實例12及13中所述)中，分析經純化之IgG變異體以便相對於親本XAB1 IgG比較其活性。結果展示在此四個變異體中，三個具有減小的活性。但候選物XAB\_B12(突變N56Q)與親本XAB1相比保留活性。

表12.對XAB1之序列修飾及對於活體外中和之相應效應的概述。

Kabat CDR		L-CDR2								IC <sub>50</sub> (nM)	
		49	50	51	52	53	54	55	56		
殘基編號		49	50	51	52	53	54	55	56	57	
Kabat編號		49	50	51	52	53	54	55	56	57	
IgG 變異體	一般名稱										
XAB1	XAB1	Y	D	A	S	S	L	E	N	G	4
XAB_G57T	XAB_A6	Y	D	A	S	S	L	E	N	T	22
XAB_N56Q	XAB_B12	Y	D	A	S	S	L	E	Q	G	2
XAB_N56T	XAB_B13	Y	D	A	S	S	L	E	T	G	11
XAB_N56S	XAB_B14	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	13

已知由此鑑定之最合適的取代，將其引入在親和力成熟方法期間所鑑定之最有希望的採樣數，產生 XAB2(XAB\_A2\_N56Q)、XAB3(MB468\_N56Q)、XAB4(MB435\_N56Q)。其係藉由HEK細胞之標準短暫轉染產生且經由蛋白質A管柱連同仍攜帶NG位點之XAB5(MB435)一起純化。

NG基元在XAB2、XAB3、XAB4中經移除(N56Q)，但仍存在於XAB5中。L-CDR3中之NS基元在XAB2中經移除(N92D)，如在隨機親和力成熟方法期間所發現。因此，最佳變異體集合可用於測試脫醯胺可能位點之敏感性。

四個經純化之候選物稀釋於緩衝液pH 8中且在40°C下培育以便推動脫醯胺反應。在若干時間點取得等分試樣，以便根據熟習此項技術者所熟知原理藉由陽離子交換層析(CEX)測定脫醯胺程度，且藉由基於細胞之分析測定活體外中和活性(例如，如實例12及13中所述)。

CEX結果展示酸性變異體百分比隨時間推移而增加，正如關於任何IgG所預期，可能歸因於抗體構架中之轉譯後修飾位點，但XAB5的增加程度比另一候選物高，亦即一週後72%對46%及4週後94%對83%。最後，活體外中和活性分析結果與CEX結果相關，展示在推動脫醯胺的條件期間培育4週後XAB5損失活性。熟習此項技術者所熟知的尺寸排阻層析-多角度光散射方法(SEC-MALS)用於監測樣品中之聚

集物含量。

資料概述於表13中。

**表13.藉由SEC-MALS分析、活體外中和活性及CEX。**

抗體	M <sup>a)</sup> [%]	EC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> [ng/ml]	CEX <sup>c)</sup> [%]	M <sup>a)</sup> [%]	EC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> [ng/ml]	CEX <sup>c)</sup> [%]	
T= 0週				T= 1週			
XAB2	99	45	15	98	n.d.	45	
XAB3	99	40	14	98	n.d.	44	
XAB5	99	45	18	98	n.d.	72	
XAB4	99	48	15	98	n.d.	48	
抗體	M <sup>a)</sup> [%]	EC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> [ng/ml]	CEX <sup>c)</sup> [%]	NG <sup>d)</sup> 位點	NS <sup>d)</sup> 位點		
T= 4週							
XAB2	95	47	85	0	0		
XAB3	97	40	81	0	1		
XAB5	94	<b>61</b>	<b>94</b>	1	1		
XAB4	94	47	84	0	1		

<sup>a)</sup> 藉由SEC-MALS分析單體，<sup>b)</sup> 在細胞用80 ng/mL IL-17刺激後抑制IL-6分泌，<sup>c)</sup> 藉由交換層析分析酸性變異體，<sup>d)</sup> CDR中之位點數(未考慮構架區)

此等資料指示成功移除轉譯後可能的脫醯胺位點，其可能已對抗體活性具有影響。此為有利的，因為XAB2、XAB3及XAB4因此可能獲得比XAB1更同源的產物，歸因於轉譯後脫醯胺不能在產生或儲存期間發生從而影響抗體活性。

#### **實例5.由親和力成熟衍生之抗體變異體：XAB2的X射線分析**

簡言之，根據熟習此項技術者所熟知的原理，選殖XAB2 Fv且在大腸桿菌TGf1-中表現，使得重鏈上具有C端六組胺酸標誌且輕鏈上具有C端Strep標誌。重組蛋白質藉由Ni-螯合層析及尺寸排阻層析(SPX-75)純化。

接著使用標準方法製備XAB2 Fv片段與人類IL-17A之複合物。簡言之，人類IL-17A(1.5 mg)與過量XAB2 Fv(3.7 mg)混合，且使複合物在S100尺寸排阻層析上，於10 mM TRIS pH 7.4、25 mM NaCl中跑膠。接著藉由超濾濃縮蛋白質複合物至26.3 mg/ml且結晶。

遵循標準結晶方案。簡言之，使用於沈滴中蒸氣擴散之方法，使晶體在19°C下生長於SD2 96孔板中。蛋白質原料與含有0.2 M乙酸鈣、20% PEG 3,350之結晶緩衝液1:1混合。總液滴尺寸為0.4  $\mu$ l。在X射線資料收集之前，將一種晶體簡單轉移至30% PEG 3,350、30%甘油1:1混合之結晶緩衝液中，且隨後急驟冷卻於液氮中。

使用標準方案進行X射線資料收集及加工。簡言之，在具有MAR225 CCD偵測器之Swiss Light Source, beamline X06DA下，使用1.0000 $\text{\AA}$  X射線輻射，收集達到2.0 $\text{\AA}$ 解析度的X射線資料。在190 mm的晶體至偵測器距離下記錄各0.5°振盪的總計360幅圖像，且用XDS套裝軟體處理。晶體屬於晶格群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2，其中晶胞參數a = 184.72 $\text{\AA}$ ，b = 55.56 $\text{\AA}$ ，c = 71.11 $\text{\AA}$ ， $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ 。達到2.0 $\text{\AA}$ 解析度之R-對稱為5.2%且資料完成100.0%。

由於XAB2 Fv複合物之晶體與XAB1 Fv複合物之晶體(實例2)高度同形，故使用後一結構作為使用程式CNX開始進行結晶學改進的輸入模型。使用 Coot(Crystallographic Object-Oriented Toolkit) 及 CNX(Crystallography & NMR eXplorer)2002版進行反覆模型修正及改進，直至無法對結晶學模型進行進一步顯著改良為止。所有資料之最終R-及R-自由分別為0.214及0.259。最終改進模型展示理想鍵長及鍵角分別為0.005 $\text{\AA}$ 及0.9°之均方根差(RMSD)。

## 結果

XAB2 Fv與人類IL-17A之複合物之X射線改進的結果提供於表14中且此複合物之三維結構展示於圖4中。X射線結晶學分析證實變異抗體XAB2保留目標特異性且以高親和力結合於與親本XAB1抗體基本上相同的抗原決定基。然而，在XAB1複合物結構中，包含Gly66之輕鏈環採用當此殘基突變成纈氨酸時不再可能的構形。因此，在XAB2複合物中，Gly66突變成纈氨酸(G66V)迫使環採用新構形，且纈氨酸

側鏈與IL-17A之Ile51進行疏水性接觸(圖5)。另兩個IL-17A殘基Pro42及Arg43在此晶體結構中變得可見(有序)。此等抗原殘基與XAB2抗體進行額外的結合相互作用，尤其與Val28進行疏水性接觸(圖5)。

**表14.藉由程式CNX獲得之XAB2 Fv與IL-17A之複合物的X射線改進。**

```

REMARK 3
REMARK 3 REFINEMENT.
REMARK 3 PROGRAM : CNX 2002
REMARK 3 AUTHORS : Brunger, Adams, Clore, Delano,
REMARK 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
REMARK 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
REMARK 3 Rice, Simonson, Warren
REMARK 3 and
REMARK 3 Accelrys Inc.,
REMARK 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,
REMARK 3 Yip, Dzakula).
REMARK 3
REMARK 3 DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 2.00
REMARK 3 RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 71.11
REMARK 3 DATA CUTOFF (SIGMA(F)) : 0.0
REMARK 3 DATA CUTOFF HIGH (ABS(F)) : 2329350.20
REMARK 3 DATA CUTOFF LOW (ABS(F)) : 0.000000
REMARK 3 COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 99.8
REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 50409
REMARK 3
REMARK 3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 CROSS-VALIDATION METHOD : THROUGHOUT
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM
REMARK 3 R VALUE (WORKING SET) : 0.214
REMARK 3 FREE R VALUE : 0.259
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.0
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 2521
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF FREE R VALUE : 0.005
REMARK 3
REMARK 3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.
REMARK 3 TOTAL NUMBER OF BINS USED : 6
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 2.00
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (A) : 2.13
REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 100.0
REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 7858
REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.262
REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.304
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.0
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 414
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : 0.015
REMARK 3
REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 5055

```

REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0  
 REMARK 3 HETEROGEN ATOMS : 0  
 REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 376  
 REMARK 3  
 REMARK 3 B VALUES.  
 REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A\*\*2) : 27.8  
 REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A\*\*2) : 37.3  
 REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE.  
 REMARK 3 B11 (A\*\*2) : -0.85  
 REMARK 3 B22 (A\*\*2) : 3.93  
 REMARK 3 B33 (A\*\*2) : -3.08  
 REMARK 3 B12 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B13 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B23 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 BULK SOLVENT MODELING.  
 REMARK 3 METHOD USED : FLAT MODEL  
 REMARK 3 KSOL : 0.338594  
 REMARK 3 BSOL : 46.0594 (A\*\*2)  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM LUZZATI PLOT (A) : 0.25  
 REMARK 3 ESD FROM SIGMAA (A) : 0.19  
 REMARK 3 LOW RESOLUTION CUTOFF (A) : 5.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 CROSS-VALIDATED ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM C-V LUZZATI PLOT (A) : 0.31  
 REMARK 3 ESD FROM C-V SIGMAA (A) : 0.22  
 REMARK 3  
 REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.  
 REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.005  
 REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 0.9  
 REMARK 3 DIHEDRAL ANGLES (DEGREES) : 21.0  
 REMARK 3 IMPROPER ANGLES (DEGREES) : 0.70  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL MODEL : RESTRAINED  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL FACTOR RESTRAINTS. RMS SIGMA  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.49 ; 1.50  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.44 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.95 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.93 ; 2.50  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NCS MODEL : NONE  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NCS RESTRAINTS. RMS SIGMA/WEIGHT  
 REMARK 3 GROUP 1 POSITIONAL (A) : NULL ; NULL  
 REMARK 3 GROUP 1 B-FACTOR (A\*\*2) : NULL ; NULL  
 REMARK 3  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 1 : protein\_rep.param  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 2 : water\_rep.param  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 3 : ion.param

```

REMARK 3 TOPOLOGY FILE 1 : protein.top
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 2 : water.top
REMARK 3 TOPOLOGY FILE 4 : ion.top
REMARK 3
REMARK 3 OTHER REFINEMENT REMARKS: NULL
SSBOND 1 CYS L 23 CYS L 88
SSBOND 2 CYS H 22 CYS H 96
SSBOND 3 CYS A 23 CYS A 88
SSBOND 4 CYS B 22 CYS B 96
SSBOND 5 CYS C 94 CYS C 144
SSBOND 6 CYS C 99 CYS C 146
SSBOND 7 CYS D 94 CYS D 144
SSBOND 8 CYS D 99 CYS D 146
CRYST1 184.719 55.558 71.109 90.00 90.00 90.00 P 21 21 2 24
ORIGX1 1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
ORIGX2 0.000000 1.000000 0.000000 0.000000
ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.000000
SCALE1 0.005414 0.000000 0.000000 0.000000
SCALE2 0.000000 0.017999 0.000000 0.000000
SCALE3 0.000000 0.000000 0.014063 0.000000

```

圖4提供XAB2 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖4A展示空間填充表示之兩個XAB2 Fv片段，且IL-17A均二聚體以草圖表示展示。圖4B展示草圖表示之兩個XAB2 Fv片段，且IL-17A均二聚體以空間填充表示展示。XAB2 Fv之重鏈及輕鏈分別以深灰色及淺灰色展示。IL-17A均二聚體之一條鏈以淺灰色展示，另一條鏈以深灰色展示。

圖5提供XAB2 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構作為抗體L-CDR1及外環區之近視圖，其帶有甘胺酸至纈胺酸之突變(分別為G28V及G66V)。G66V突變導致外環構形變化，以及與IL-17A殘基Pro42、Arg43及Ile51之額外抗體-抗原接觸。XAB2 Fv以淺灰色草圖表示，且人類IL-17A均二聚體以灰色暗色相表示。Ile51不屬於與Pro42及Arg43相同的IL-17A次單位。

#### 實例6.由親和力成熟衍生之抗體變異體：XAB5的X射線分析

選殖XAB5 Fv且在大腸桿菌TGf1-中表現，使得重鏈上具有C端六組胺酸標誌且輕鏈上具有C端Strep標誌。重組蛋白質藉由Ni-螯合層析，接著藉由在SPX-75管柱上於PBS緩衝液中之尺寸排阻層析純

化。LC-MS分析展示重鏈之預期質量(13703.4Da)且存在兩種形式之輕鏈：全長(115aa；12627.3Da；約27%)及經截短之Strep標誌(A1至Q112；12222.8Da；約73%)。

接著使用標準方法製備XAB5 Fv片段與人類IL-17A之複合物。簡言之，人類IL-17A(1.4 mg)與過量XAB5 Fv(3.4 mg)混合，且使複合物在S100尺寸排阻層析上，於10 mM TRIS pH 7.4、25 mM NaCl中跑膠。接著藉由超濾濃縮蛋白質複合物至16.5 mg/ml且結晶。

遵循標準結晶方案。簡言之，使用於沈滴中蒸氣擴散之方法，使晶體在19°C下生長於SD2 96孔板中。蛋白質原料與含有15% PEG 5,000 MME、0.1 M MES pH 6.5、0.2 M硫酸銨之結晶緩衝液1:1混合。總液滴大小為0.4  $\mu$ l。在X射線資料收集之前，將一種晶體簡單轉移至20% PEG 5,000 MME、40%甘油1:1混合之結晶緩衝液中，且隨後急驟冷卻於液氮中。

使用標準方案進行X射線資料收集及加工。簡言之，在具有Pilatus偵測器之Swiss Light Source, beamline X10SA下，使用1.00000 $\text{\AA}$  X射線輻射，收集達到3.1 $\text{\AA}$ 解析度的X射線資料。在520 mm的晶體至偵測器距離下記錄各0.25°振盪的總計720幅圖像，且用XDS套裝軟體處理。晶體屬於晶格群C222<sub>1</sub>，其中晶胞參數a = 55.37 $\text{\AA}$ ，b = 84.08 $\text{\AA}$ ，c = 156.35 $\text{\AA}$ ， $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ 。達到3.1 $\text{\AA}$ 解析度之R-對稱為8.9%且資料完成99.7%。

使用來源於先前測定之XAB2 Fv複合物的搜索模型，在程式Phaser下藉由分子置換測定結構。使用Coot(Crystallographic Object-Oriented Toolkit)及CNX(Crystallography & NMR eXplorer)2002版進行反覆模型修正及改進，直至無法對結晶學模型進行進一步顯著改良為止。所有資料之最終R-及R-自由分別為0.222及0.305。最終改進模型展示理想鍵長及鍵角分別為0.008 $\text{\AA}$ 及1.2°之均方根差(RMSD)。

## 結果

XAB5 Fv與人類IL-17A之複合物之X射線改進的結果提供於表15中且此複合物之三維結構展示於圖6中。在此晶體結構中，XAB5 Fv複合物具有精確的結晶學2重對稱：晶體之不對稱單元僅含有整個二聚複合物之一半。XAB5 Fv接觸兩個IL-17A次單位，但大多數分子間接觸僅對於一個次單位(由XAB5 Fv隱匿之約90% IL-17A表面由一個IL-17A次單位貢獻)。X射線結晶學分析證實變異抗體XAB5保留目標特異性且以高親和力結合於與親本XAB1抗體基本上相同的抗原決定基。然而，在XAB5複合物結構中，輕鏈CDRL1帶有提供增強的與人類IL-17A結合的三個點突變。XAB5輕鏈之Trp 31參加與IL-17A之Tyr 85且較小程度上IL-17A之Phe 133的強大的疏水性/芳族相互作用。XAB5輕鏈之Asn 30向IL-17A之Pro 130之主鏈羰基貢獻H鍵且與Leu 49(相同的IL-17A次單位)及Val 45(其他IL-17A次單位)凡得瓦爾力(van der Waals)接觸。XAB5輕鏈之Glu 32經由分子內H鍵相互作用穩定CDRL1環。此外，Glu 32與IL-17A之Arg 124進行有利的靜電相互作用，但不參與「頭對頭」鹽橋相互作用(圖7)。

**表15.藉由程式CNX獲得之XAB5 Fv與IL-17A之複合物的X射線改進。**

```

REMARK 3
REMARK 3 REFINEMENT.
REMARK 3 PROGRAM : CNX 2002
REMARK 3 AUTHORS : Brunger, Adams, Clore, Delano,
REMARK 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
REMARK 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
REMARK 3 Rice, Simonson, Warren
REMARK 3 and
REMARK 3 Accelrys Inc.,
REMARK 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,
REMARK 3 Yip, Dzakula).
REMARK 3
REMARK 3 DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 3.11
REMARK 3 RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 46.25
REMARK 3 DATA CUTOFF (SIGMA(F)) : 0.0
REMARK 3 DATA CUTOFF HIGH (ABS(F)) : 3778977.84
REMARK 3 DATA CUTOFF LOW (ABS(F)) : 0.000000

```

REMARK 3 COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 99.0  
 REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 6801  
 REMARK 3  
 REMARK 3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.  
 REMARK 3 CROSS-VALIDATION METHOD : THROUGHOUT  
 REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM  
 REMARK 3 R VALUE (WORKING SET) : 0.222  
 REMARK 3 FREE R VALUE : 0.305  
 REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.0  
 REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 340  
 REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF FREE R VALUE : 0.017  
 REMARK 3  
 REMARK 3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.  
 REMARK 3 TOTAL NUMBER OF BINS USED : 6  
 REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (A) : 3.10  
 REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (A) : 3.29  
 REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 89.9  
 REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 961  
 REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.293  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.403  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 4.9  
 REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 50  
 REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : 0.057  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT.  
 REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 2492  
 REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0  
 REMARK 3 HETEROGEN ATOMS : 5  
 REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 4  
 REMARK 3  
 REMARK 3 B VALUES.  
 REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A\*\*2) : 85.2  
 REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A\*\*2) : 71.0  
 REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE.  
 REMARK 3 B11 (A\*\*2) : 23.21  
 REMARK 3 B22 (A\*\*2) : 7.23  
 REMARK 3 B33 (A\*\*2) : -30.44  
 REMARK 3 B12 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B13 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3 B23 (A\*\*2) : 0.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 BULK SOLVENT MODELING.  
 REMARK 3 METHOD USED : FLAT MODEL  
 REMARK 3 KSOL : 0.389339  
 REMARK 3 BSOL : 59.5295 (A\*\*2)  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM LUZZATI PLOT (A) : 0.35  
 REMARK 3 ESD FROM SIGMAA (A) : 0.42  
 REMARK 3 LOW RESOLUTION CUTOFF (A) : 5.00  
 REMARK 3  
 REMARK 3 CROSS-VALIDATED ESTIMATED COORDINATE ERROR.

REMARK 3 ESD FROM C-V LUZZATI PLOT (A) : 0.51  
 REMARK 3 ESD FROM C-V SIGMAA (A) : 0.45  
 REMARK 3  
 REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.  
 REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.008  
 REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 1.2  
 REMARK 3 DIHEDRAL ANGLES (DEGREES) : 23.1  
 REMARK 3 IMPROPER ANGLES (DEGREES) : 0.73  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL MODEL : RESTRAINED  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL FACTOR RESTRAINTS. RMS SIGMA  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.40 ; 1.50  
 REMARK 3 MAIN-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.49 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN BOND (A\*\*2) : 1.82 ; 2.00  
 REMARK 3 SIDE-CHAIN ANGLE (A\*\*2) : 2.93 ; 2.50  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NCS MODEL : NONE  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NCS RESTRAINTS. RMS SIGMA/WEIGHT  
 REMARK 3 GROUP 1 POSITIONAL (A) : NULL ; NULL  
 REMARK 3 GROUP 1 B-FACTOR (A\*\*2) : NULL ; NULL  
 REMARK 3  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 1 : protein\_rep.param  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 2 : water\_rep.param  
 REMARK 3 PARAMETER FILE 3 : ion.param  
 REMARK 3 TOPOLOGY FILE 1 : protein\_no\_cter.top  
 REMARK 3 TOPOLOGY FILE 2 : water.top  
 REMARK 3 TOPOLOGY FILE 4 : ion.top  
 REMARK 3  
 REMARK 3 OTHER REFINEMENT REMARKS: NULL  
 SSBOND 1 CYS S 23 CYS S 88  
 SSBOND 2 CYS S 22 CYS S 96  
 SSBOND 3 CYS S 94 CYS S 144  
 SSBOND 4 CYS S 99 CYS S 146  
 CRYST1 55.372 84.082 156.350 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21 24  
 ORIGX1 1.000000 0.000000 0.000000 0.000000  
 ORIGX2 0.000000 1.000000 0.000000 0.000000  
 ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.000000  
 SCALE1 0.018060 0.000000 0.000000 0.000000  
 SCALE2 0.000000 0.011893 0.000000 0.000000  
 SCALE3 0.000000 0.000000 0.006396 0.000000

圖6提供XAB5 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。具有精確  
 結晶學雙重對稱之完整均二聚體複合物展示於此處。圖6A展示空間  
 填充表示之兩個XAB5 Fv片段，且IL-17A均二聚體以草圖表示展示。  
 圖6B展示草圖表示之兩個XAB5 Fv片段，且IL-17A均二聚體以空間填  
 充表示展示。XAB5 Fv之重鏈及輕鏈分別以深灰色及淺灰色展示。

IL-17A均二聚體之一條鏈以淺灰色展示，另一條鏈以深灰色展示。

圖7提供XAB5 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。藉由結構引導之偏差庫方法發現帶有三個突變的抗體L-CDR1的近視圖：Asn 30、Trp 31及Glu 32。此等XAB5側鏈貢獻與抗原人類IL-17A，尤其IL-17A殘基Tyr85、Phe133、Arg124、Pro 130、Leu 49(皆來自相同的IL-17A次單位)及Val 45(來自另一IL-17A次單位)的新的結合相互作用。

#### 實例7.由親和力成熟衍生之抗體變異體：XAB4的X射線分析

選殖XAB4 Fv且在大腸桿菌TG1細胞中表現，使得重鏈上具有C端六組胺酸標誌且輕鏈上具有C端Strep標誌。藉由Ni-螯合層析純化重組蛋白質。

接著使用標準方法製備XAB4 Fv片段與人類IL-17A之複合物。簡言之，人類IL-17A(0.5 mg)與過量XAB4 Fv(1.2 mg)混合，且使複合物在SPX-75尺寸排阻層析上，於10 mM TRIS pH 7.4、25 mM NaCl中跑膠。接著藉由超濾濃縮蛋白質複合物至6.9 mg/ml且結晶。

遵循標準結晶方案。簡言之，使用於沈滴中蒸氣擴散之方法，使晶體在19°C下生長於VDX 24孔板中。蛋白質原料與含有15% PEG 5,000 MME、0.1 M MES pH 6.5、0.2 M硫酸銨之結晶緩衝液2:1混合。總液滴大小為0.3 μl。在X射線資料收集之前，將一種晶體簡單轉移至25% PEG 5,000 MME、20%甘油1:1混合之結晶緩衝液中，且隨後急驟冷卻於液氮中。

使用標準方案進行X射線資料收集及加工。簡言之，在具有Pilatus偵測器之Swiss Light Source, beamline X10SA下，使用0.99984 Å X射線輻射，收集達到3.15 Å解析度的X射線資料。在500 mm的晶體至偵測器距離下記錄各0.25°振盪的總計720幅圖像，且用XDS套裝軟體處理。晶體屬於晶格群C222<sub>1</sub>，其中晶胞參數a =

55.76Å，b = 87.11Å，c = 156.31Å， $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ 。達到3.15Å解析度之R-對稱為5.5%且資料完成99.9%。

由於XAB4 Fv複合物之晶體與XAB5 Fv複合物之晶體(實例6)幾乎同形，故使用後一結構作為在程式Phaser下藉由分子置換用於結構測定的輸入模型。使用Coot(Crystallographic Object-Oriented Toolkit)及Autobuster 1.11.2版(Buster 2.11.2版)進行反覆模型修正及改進，直至無法對結晶學模型進行進一步顯著改良為止。所有資料之最終R-及R-自由分別為0.197及0.253。最終改進模型展示理想鍵長及鍵角分別為0.009Å及1.0°之均方根差(RMSD)。

#### (i) 結果

XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物之X射線改進的結果提供於表16中且此複合物之三維結構展示於圖8中。在此晶體結構中，如在XAB5複合物(實例6)中一般，XAB4 Fv複合物具有精確的結晶學2重對稱：晶體之不對稱單元僅含有整個二聚複合物之一半。XAB4 Fv接觸兩個IL-17A次單位，但大多數分子間接觸僅對於一個次單位(由一個XAB4 Fv隱匿之93% IL-17A表面由一個次單位貢獻)。X射線結晶學分析證實變異抗體XAB4保留目標特異性且以高親和力結合於與親本XAB1抗體基本上相同的抗原決定基。然而，在XAB4複合物結構中，如在XAB5複合物結構中一般，輕鏈CDRL1帶有增強與人類IL-17A結合的三個點突變。如關於XAB5複合物(實例6)已描述，XAB4輕鏈之Trp 31參加與IL-17A之Tyr 85及較小程度上IL-17A之Phe 133強大的疏水性/芳族相互作用。XAB4輕鏈之Asn 30向IL-17A之Pro 130之主鏈羰基貢獻H鍵且與Leu 49(相同的IL-17A次單位)及Val 45(其他IL-17A次單位)凡得瓦爾力接觸。XAB4輕鏈之Glu 32經由分子內H鍵相互作用穩定CDRL1環。此外，Glu 32與IL-17A之Arg 124進行有利的靜電相互作用，但不參與「頭對頭」鹽橋相互作用(圖9)。由於經設計以移除可

能的脫醯胺位點的Asn至Gln突變，XAB4在輕鏈之位置56處亦不同於XAB1。X射線分析展示XAB4之Gln 56與蛋白質抗原殘基Leu 76及Trp 90接觸，且降低Tyr 67及Ser 64之溶劑可接近性(圖10)。

**表16.藉由程式Autobuster獲得之XAB4 Fv與IL-17A之複合物的X射線改進。**

```

REMARK 3
REMARK 3 REFINEMENT.
REMARK 3 PROGRAM : BUSTER 2.11.2
REMARK 3 AUTHORS : BRICOGNE,BLANC,BRANDL,FLENSBURG,KELLER,
REMARK 3 : PACIOREK,ROVERSI,SHARFF,SMART,VONRHEIN,WOMACK;
REMARK 3 : MATTHEWS,TEN EYCK,TRONRUD
REMARK 3
REMARK 3 DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 3.15
REMARK 3 RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 78.15
REMARK 3 DATA CUTOFF (SIGMA(F)) : 0.0
REMARK 3 COMPLETENESS FOR RANGE (%) : 99.85
REMARK 3 NUMBER OF REFLECTIONS : 6881
REMARK 3
REMARK 3 FIT TO DATA USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 CROSS-VALIDATION METHOD : THROUGHOUT
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SELECTION : RANDOM
REMARK 3 R VALUE (WORKING + TEST SET) : 0.1998
REMARK 3 R VALUE (WORKING SET) : 0.1972
REMARK 3 FREE R VALUE : 0.2531
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.01
REMARK 3 FREE R VALUE TEST SET COUNT : 345
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF FREE R VALUE : NULL
REMARK 3
REMARK 3 FIT IN THE HIGHEST RESOLUTION BIN.
REMARK 3 TOTAL NUMBER OF BINS USED : 5
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS) : 3.15
REMARK 3 BIN RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS) : 3.52
REMARK 3 BIN COMPLETENESS (WORKING+TEST) (%) : 99.85
REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING + TEST SET) : 1916
REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING + TEST SET) : 0.2376
REMARK 3 REFLECTIONS IN BIN (WORKING SET) : 1820
REMARK 3 BIN R VALUE (WORKING SET) : 0.2326
REMARK 3 BIN FREE R VALUE : 0.3295
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET SIZE (%) : 5.01
REMARK 3 BIN FREE R VALUE TEST SET COUNT : 96
REMARK 3 ESTIMATED ERROR OF BIN FREE R VALUE : NULL
REMARK 3
REMARK 3 NUMBER OF NON-HYDROGEN ATOMS USED IN REFINEMENT.
REMARK 3 PROTEIN ATOMS : 2499
REMARK 3 NUCLEIC ACID ATOMS : 0
REMARK 3 HETEROGEN ATOMS : 5

```

REMARK 3 SOLVENT ATOMS : 0  
 REMARK 3  
 REMARK 3 B VALUES.  
 REMARK 3 FROM WILSON PLOT (A\*\*2) : 102.42  
 REMARK 3 MEAN B VALUE (OVERALL, A\*\*2) : 124.95  
 REMARK 3 OVERALL ANISOTROPIC B VALUE.  
 REMARK 3 B11 (A\*\*2) : -11.5511  
 REMARK 3 B22 (A\*\*2) : -28.0012  
 REMARK 3 B33 (A\*\*2) : 39.5523  
 REMARK 3 B12 (A\*\*2) : 0.0000  
 REMARK 3 B13 (A\*\*2) : 0.0000  
 REMARK 3 B23 (A\*\*2) : 0.0000  
 REMARK 3  
 REMARK 3 ESTIMATED COORDINATE ERROR.  
 REMARK 3 ESD FROM LUZZATI PLOT (A) : 0.787  
 REMARK 3 DPI (BLOW EQ-9) BASED ON FREE R VALUE (A) : 0.474  
 REMARK 3  
 REMARK 3 REFERENCES: BLOW, D. (2002) ACTA CRYST D58, 792-797  
 REMARK 3  
 REMARK 3 CORRELATION COEFFICIENTS.  
 REMARK 3 CORRELATION COEFFICIENT FO-FC : 0.9113  
 REMARK 3 CORRELATION COEFFICIENT FO-FC FREE : 0.8848  
 REMARK 3  
 REMARK 3 X-RAY WEIGHT : 20.89  
 REMARK 3  
 REMARK 3 GEOMETRY FUNCTION.  
 REMARK 3 RESTRAINT LIBRARIES.  
 REMARK 3 NUMBER OF LIBRARIES USED : 8  
 REMARK 3 LIBRARY 1 : protgeo\_eh99.dat (V1.8) 20110121 STANDARD  
 REMARK 3 AMINO ACID DICTIONARY. BONDS AND ANGLES FROM  
 REMARK 3 ENGH AND HUBER EH99. OTHER VALUES BASED ON  
 REMARK 3 PREVIOUS TNT OR TAKEN FROM CCP4. INCLUDES  
 REMARK 3 HYDROGEN ATOMS.  
 REMARK 3 LIBRARY 2 : exoticaa.dat (V1.8) 20100430 COLLECTION OF  
 REMARK 3 NON-STANDARD AMINO ACIDS, MAINLY EH91 WITHOUT  
 REMARK 3 IDEAL DISTANCE INFO  
 REMARK 3 LIBRARY 3 : nuclgeo.dat (V1.14) 20091104  
 REMARK 3 LIBRARY 4 : bcorrel.dat (V1.15) 20080423  
 REMARK 3 LIBRARY 5 : contact.dat (V1.20.2.1) 20110510  
 REMARK 3 LIBRARY 6 : idealdist\_contact.dat (V1.7) 20110119  
 REMARK 3 IDEAL-DISTANCE CONTACT TERM DATA AS USED IN  
 REMARK 3 PROLSQ. VALUES USED HERE ARE BASED ON THE REFMAC  
 REMARK 3 5.5 IMPLEMENTATION.  
 REMARK 3 LIBRARY 7 : restraints for SO4 (SULFATE ION) from cif  
 REMARK 3 dictionary SO4.cif using refmacdict2tnt revision  
 REMARK 3 1.23.2.7; buster common-compounds v 1.0 (05 May  
 REMARK 3 2011)  
 REMARK 3 LIBRARY 8 : assume.dat (V1.10) 20110113  
 REMARK 3  
 REMARK 3 NUMBER OF GEOMETRIC FUNCTION TERMS DEFINED : 15  
 REMARK 3 TERM COUNT WEIGHT FUNCTION.  
 REMARK 3 BOND LENGTHS : 2566 ; 2.00 ; HARMONIC

REMARK 3 BOND ANGLES : 3486 ; 2.00 ; HARMONIC  
 REMARK 3 TORSION ANGLES : 860 ; 2.00 ; SINUSOIDAL  
 REMARK 3 TRIGONAL CARBON PLANES : 61 ; 2.00 ; HARMONIC  
 REMARK 3 GENERAL PLANES : 369 ; 5.00 ; HARMONIC  
 REMARK 3 ISOTROPIC THERMAL FACTORS : 2566 ; 20.00 ; HARMONIC  
 REMARK 3 BAD NON-BONDED CONTACTS : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 IMPROPER TORSIONS : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 PSEUDOROTATION ANGLES : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 CHIRAL IMPROPER TORSION : 323 ; 5.00 ; SEMIHARMONIC  
 REMARK 3 SUM OF OCCUPANCIES : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 UTILITY DISTANCES : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 UTILITY ANGLES : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 UTILITY TORSION : NULL; NULL; NULL  
 REMARK 3 IDEAL-DIST CONTACT TERM : 2984 ; 4.00 ; SEMIHARMONIC  
 REMARK 3  
 REMARK 3 RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES.  
 REMARK 3 BOND LENGTHS (A) : 0.009  
 REMARK 3 BOND ANGLES (DEGREES) : 1.00  
 REMARK 3 PEPTIDE OMEGA TORSION ANGLES (DEGREES) : 4.39  
 REMARK 3 OTHER TORSION ANGLES (DEGREES) : 18.96  
 REMARK 3  
 REMARK 3 SIMILARITY.  
 REMARK 3 NCS.  
 REMARK 3 NCS REPRESENTATION : NONE  
 REMARK 3 TARGET RESTRAINTS.  
 REMARK 3 TARGET REPRESENTATION : LSSR  
 REMARK 3 TARGET STRUCTURE : xab5\_il17a\_complex\_final\_buster.pdb  
 REMARK 3  
 REMARK 3 TLS DETAILS.  
 REMARK 3 NUMBER OF TLS GROUPS : 3  
 REMARK 3  
 REMARK 3 TLS GROUP : 1  
 REMARK 3 SET : { H|\* }  
 REMARK 3 ORIGIN FOR THE GROUP (A): 10.9676 -8.7396 -10.1379  
 REMARK 3 T TENSOR  
 REMARK 3 T11: -0.1266 T22: 0.0257  
 REMARK 3 T33: -0.2829 T12: -0.3040  
 REMARK 3 T13: -0.0312 T23: 0.1050  
 REMARK 3 L TENSOR  
 REMARK 3 L11: 7.4496 L22: 4.4770  
 REMARK 3 L33: 4.2880 L12: 1.1123  
 REMARK 3 L13: -1.8044 L23: 3.0307  
 REMARK 3 S TENSOR  
 REMARK 3 S11: 0.2013 S12: 0.3070 S13: -0.5774  
 REMARK 3 S21: 0.4752 S22: -0.5377 S23: 0.7096  
 REMARK 3 S31: 1.0885 S32: -1.0885 S33: 0.3364  
 REMARK 3  
 REMARK 3 TLS GROUP : 2  
 REMARK 3 SET : { I|\* }  
 REMARK 3 ORIGIN FOR THE GROUP (A): 22.7365 0.7101 -35.1243  
 REMARK 3 T TENSOR  
 REMARK 3 T11: -0.1883 T22: 0.1529

REMARK 3 T33: -0.3560 T12: 0.0318  
 REMARK 3 T13: -0.1985 T23: 0.0144  
 REMARK 3 L TENSOR  
 REMARK 3 L11: 2.7494 L22: 9.3427  
 REMARK 3 L33: 3.8648 L12: 0.8073  
 REMARK 3 L13: -0.6650 L23: -2.0544  
 REMARK 3 S TENSOR  
 REMARK 3 S11: 0.0485 S12: 0.3188 S13: 0.0579  
 REMARK 3 S21: 0.0595 S22: 0.1433 S23: 0.7000  
 REMARK 3 S31: 0.0050 S32: -0.6066 S33: -0.1917  
 REMARK 3  
 REMARK 3 TLS GROUP : 3  
 REMARK 3 SET : { L|\* }  
 REMARK 3 ORIGIN FOR THE GROUP (A): 33.2517 -11.1794 -14.2151  
 REMARK 3 T TENSOR  
 REMARK 3 T11: 0.0667 T22: -0.1645  
 REMARK 3 T33: -0.2360 T12: 0.1870  
 REMARK 3 T13: -0.2270 T23: -0.1209  
 REMARK 3 L TENSOR  
 REMARK 3 L11: 3.3694 L22: 3.7848  
 REMARK 3 L33: 8.8916 L12: -0.6497  
 REMARK 3 L13: -2.6132 L23: 0.8234  
 REMARK 3 S TENSOR  
 REMARK 3 S11: -0.0839 S12: -0.2629 S13: -0.1560  
 REMARK 3 S21: 0.3804 S22: 0.7574 S23: -0.5378  
 REMARK 3 S31: 1.0885 S32: 1.0885 S33: -0.6736  
 REMARK 3  
 REMARK 3 REFINEMENT NOTES.  
 REMARK 3 NUMBER OF REFINEMENT NOTES : 1  
 REMARK 3 NOTE 1 : IDEAL-DIST CONTACT TERM CONTACT SETUP. ALL  
 ATOMS  
 REMARK 3 HAVE CCP4 ATOM TYPE FROM LIBRARY  
 REMARK 3  
 REMARK 3 OTHER REFINEMENT REMARKS: NULL  
 REMARK 3  
 SSBOND 1 CYS H 22 CYS H 96 1555 1555 2.03  
 SSBOND 2 CYS I 94 CYS I 144 1555 1555 2.05  
 SSBOND 3 CYS I 99 CYS I 146 1555 1555 2.04  
 SSBOND 4 CYS L 23 CYS L 88 1555 1555 2.07  
 CISPEP 1 TYR I 85 PRO I 86 0 3.67  
 CISPEP 2 GLU I 125 PRO I 126 0 -9.25  
 CISPEP 3 PRO I 126 PRO I 127 0 5.92  
 CISPEP 4 SER L 7 PRO L 8 0 -6.50  
 CISPEP 5 TYR L 94 PRO L 95 0 -6.52  
 CRYST1 55.760 87.109 156.306 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21

圖8提供XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構。圖8A展示  
 空間填充表示之兩個XAB4 Fv片段，且IL-17A均二聚體以草圖表示展  
 示。圖8B展示草圖表示之兩個XAB4 Fv片段，且IL-17A均二聚體以空

間填充表示展示。XAB4 Fv之重鏈及輕鏈分別以深灰色及淺灰色展示。IL-17A均二聚體之一條鏈以淺灰色展示，另一條鏈以深灰色展示。

圖9提供XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構作為藉由結構引導之偏差庫方法發現的帶有三個突變之抗體L-CDR1的近視圖：Asn 30、Trp 31及Glu 32。此等XAB4側鏈有助於與抗原人類IL-17A，尤其IL-17A殘基Tyr85、Phe133、Arg124、Pro 130、Leu 49(皆來自相同的IL-17A次單位)及Val 45(來自另一IL-17A次單位)的新的結合相互作用。

圖10提供XAB4 Fv與人類IL-17A之複合物的三維結構作為抗體L-CDR2之近視圖，展示Asn 56至Gln突變。此XAB4側鏈有助於與IL-17A殘基Trp 90及Leu 76結合接觸，且降低Tyr 67及Ser 64(皆來自相同IL-17A次單位)的溶劑可接近性。

為概述，X射線結晶學分析證實所選用於進一步分析之變異抗體保留其目標特異性且以高親和力結合於與親本XAB1抗體基本上相同的抗原決定基。由於額外或經改良之結合接觸，各變異抗體與IL-17A之間觀察到更緊密的結合(參見下表17)。

如下所述進行變異抗體的進一步表徵。

**表17.由XAB1、XAB2、XAB4及XAB5結合之IL-17A抗原決定基的X射線分析：抗原決定基殘基之概述及基於結構之定性分類。(\*)：由第二IL-17A次單位貢獻的殘基。**

抗原決定基殘基種類	XAB1	XAB2	XAB4	XAB5
極其重要的抗原決定基殘基	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124
其他重要的抗原決定基殘基	Pro 82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Arg 43*, Pro 82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Pro 82, Ser 87, Val 88	Pro 82, Ser 87, Val 88
額外貢獻	Val 45*, Leu	Pro 42*, Val	Val 45*, Leu 49,	Val 45*, Leu 49,

	49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*	Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*
幾乎無直接貢獻	Thr 44*, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Arg 43*, Asn 50, Ser 64, Tyr 67, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*	Arg 43*, Asn 50, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*

### 實例8. 藉由Biacore<sup>TM</sup>量測之親和力量測值及交叉反應性

使用光學生物感測器Biacore<sup>TM</sup> T200 或 T100 (<http://www.biacore.com>)，藉由表面電漿子共振量測實現動力學結合參數之測定。此技術允許對配體與受體之結合( $k_a$ )及解離( $k_d$ )的顯微速率常數進行無標記測定。因此其尤其適於表徵抗體-抗原相互作用。

抗體與Biacore<sup>TM</sup>晶片表面之間接結合係經由含25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗人類Ig抗體(GE Healthcare Bio-Sciences AB；目錄號BR-1008-39)之固定緩衝液(10 mM乙酸鈉pH 5.0)或經由含20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白質A(RepliGen: rPA-50)之固定緩衝液(10 mM乙酸鈉pH 5.0或pH 4.0)來進行。

將抗體稀釋於空白緩衝液中達到1.00或1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之最終濃度。

為測定XAB4或XAB1之解離常數，使用間接偶合/結合方法(參見上文)對重組huIL-17A (SEQ ID NO: 78，例如0.14 nM至8.8 nM之2倍倍增濃度)、重組huIL-17A/F雜二聚體(例如0.13 nM至8 nM之2倍倍增濃度)、重組huIL-17F (SEQ ID NO: 77；例如7.8 nM至500 nM之2倍倍增濃度)、食蟹獼猴IL-17A (SEQ ID NO: 79；例如0.63 nM至40 nM之2倍倍增濃度)、恆河獼猴IL-17A (SEQ ID NO: 82；例如1.6 nM至100 nM之2倍倍增濃度)、狨猴IL-17A (SEQ ID NO: 82；例如0.63 nM至40 nM之2倍倍增濃度)、重組mIL-17A (SEQ ID NO: 83；例如0.78 nM至50 nM之2倍倍增濃度)、重組mIL-17A/F (R&D Systems®目錄號5390-IL；例如1.25 nM至40 nM之2倍倍增濃度)、大鼠IL-17A (SEQ ID NO: 85；例如0.78 nM至50 nM之2倍倍增濃度)進行親和力量測，且使用10

mM甘胺酸pH 1.75或MgCl<sub>2</sub> (3 M)使表面再生。塗佈一個晶片表面且在結合能力無顯著損失的情況下重複使用該晶片表面。選擇在K<sub>D</sub>以下開始且在高於K<sub>D</sub>十倍的濃度下結束的配體濃度。

使用相似而非相同的條件量測XAB2及XAB3之親和力。

使用Biacore<sup>TM</sup> T200控制軟體1.0版評估動力學跡線。將此等跡線與增加之濃度的全部集合結合在一起且稱為一次操作。每個分析物濃度系列中包括兩個零濃度樣品(空白操作)以允許在資料評估期間雙重參考。

### 結果

使用Biacore<sup>TM</sup>技術，藉由表面電漿子共振來測定抗-IL-17抗體XAB4、XAB1、XAB2及XAB3與人類、食蟹獼猴、狨猴、恆河獼猴、小鼠及大鼠IL-17A、與人類及小鼠IL-17A/F雜二聚體及與人類IL-17F之結合。

計算締合( $k_a$ )及解離( $k_d$ )之動力學速率常數以及解離平衡常數( $K_D$ )。

XAB4之親和力資料展示於表18中，XAB1之親和力資料展示於表19中，XAB2之親和力資料展示於表20中，且XAB3之親和力資料展示於表21中。XAB1、XAB2及XAB3之親和力成熟增加對於人類、食蟹獼猴、小鼠及大鼠IL-17A之親和力。

**表18. XAB4結合之親和力及動力學速率常數。**

抗原	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
huIL-17A	4.1 ± 0.1 E+06	2.3 ± 0.1 E-05	5.7 ± 0.0 E-12
huIL-17A/F	8.9 ± 0.2 E+5	< 1.0 ± 0.0 E-05*	< 1.1 ± 0.0 E-11*
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	4.1 ± 0.5 E+05	1.3 ± 0.0 E-05	3.1 ± 0.4 E-11
marmIL-17A	1.2 ± 0.0 E+06	2.2 ± 0.0 E-05	1.8 ± 0.0 E-11
rhesIL-17A	3.0 ± 0.1 E+05	1.2 ± 0.1 E-05	4.0 ± 0.1 E-11
mIL-17A	3.8 ± 0.1 E+05	6.2 ± 0.3 E-05	1.6 ± 0.1 E-10
mIL-17A/F	2.421E+05	6.305E-05	2.604 E-10
ratIL-17A	5.5 ± 0.4 E+05	4.6 ± 0.9 E-05	8.4 ± 1.0 E-11

n.d. =不可測定，所應用之抗原濃度範圍太低，及在最高抗原濃度(500-50 pM)下觀察到抗原與參考流動細胞的非特異性結合。

\*解離速率超出可藉由儀器量測之極限( $k_d < 1 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$ )

**表19. XAB1結合之親和力及動力學速率常數。**

抗原	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
huIL-17A	2.33E+06	9.39E-05	4.03E-11
huIL-17A/F	9.097E+05	0.001342	1.475E-09
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	2.14E+05	1.13E-04	5.26E-10
rhesIL-17A	8.87E+05	9.97E-05	1.12E-09
miL-17A	4.05E+05	1.43E-04	3.53E-10
miL-17A/F	1.8757E+05	9.547E-04	5.093E-09
ratIL-17A	5.44E+05	1.64E-04	3.01E-10

n.d. =不可測定，所應用之抗原濃度範圍太低及在三個最高抗原濃度(500-50 pM)下觀察到抗原與參考流動細胞的非特異性結合。

**表20. XAB2結合之親和力及動力學速率常數。**

抗原	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
huIL-17A	4.09E+06	7.12E-05	1.76E-11

**表21. XAB3結合之親和力及動力學速率常數。**

抗原	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
huIL-17A	5.48E+06	5.01E-05	9.58E-12
huIL-17A/F	3.37E+06	1.03E-04	3.29E-11
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	1.21E+06	4.23E-05	3.49E-11
miL-17A	5.87E+05	1.01E-04	1.74E-10
ratIL-17A	9.05E+05	7.59E-05	8.26E-11

n.d. =不可測定

XAB2、XAB3及XAB5之親和力及動力學速率常數可與XAB4所觀察到的相比。

#### **實例9. ELISA 中與IL-17A及其他家族成員之結合**

進行所關注之抗體對於不同抗原的滴定。簡言之，用含1  $\mu\text{g/ml}$  重組huIL-17A (SEQ ID NO: 76；1.8 mg/ml)、重組huIL-17A/F (0.59 mg/ml)、重組huIL-17F (SEQ ID NO: 77；1.8 mg/ml)、重組huIL-17B (R&D Systems®目錄號1248IB/CF)、重組huIL-17C (R&D Systems®目

錄號1234IL/CF)、重組huIL-17D (R&D Systems®目錄號1504IL/CF)、重組huIL-17E (R&D Systems®目錄號1258-IL/CF)、重組cynoIL-17A (SEQ ID NO: 79 ; 0.21 mg/ml)、重組cynoIL-17F (SEQ ID NO: 80 ; 1.525 mg/ml)、重組mIL-17A (SEQ ID NO: 83 ; 2.8 mg/ml)、重組mIL-17A/F (R&D Systems®目錄號5390-IL)、重組mIL-17F (SEQ ID NO: 84 ; 0.2 mg/ml)及重組ratIL-17A (SEQ ID NO: 85 ; 3.8 mg/ml) (100微升/孔)之無Ca及Mg (10× ; Invitrogen目錄號14200-083) 0.02% NaN<sub>3</sub> (Sigma目錄號S-8032)的磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)塗佈ELISA微量滴定板(Nunc Immuno plates MaxiSorp: Invitrogen, 目錄號4-39454A)之孔，且在4°C下培育隔夜。

次日，在37°C下用300 μl PBS/2% BSA (fraction V; Roche目錄號10 735 094 001)/0.02% NaN<sub>3</sub>阻斷微量滴定板1小時。板接著用PBS/0.05% Tween 20 (Sigma目錄號P7949)/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。在室溫下一式三份地添加1 μg/ml XAB4或XAB1至各孔(100微升/孔)3小時。

為驗證抗原塗佈於板，使用對照抗體且詳言之小鼠mAb抗-huIL-17F (Novartis, 5 μg/ml)、山羊抗-hu-IL-17B (R&D Systems®目錄號AF1248 ; 10 μg/ml)、小鼠mAb抗-huIL-17C (R&D Systems®目錄號MAB1234 ; 10 μg/ml)、山羊抗-huIL-17D (R&D Systems®目錄號AF1504 ; 10 μg/ml)、小鼠mAb抗hu-IL-17E (R&D Systems®目錄號MAB1258 ; 10 μg/ml)小鼠抗-mIL-17A或抗-mIL-17A/F (Novartis ; 1 μg/ml)、及大鼠抗-mIL-17F (R&D Systems®目錄號MAB2057 ; 1 μg/ml) (100微升/孔於PBS、0.02% NaN<sub>3</sub>中，在室溫下3小時)。

板接著用PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。接著，在室溫下向接受測試抗體的孔中添加1/20000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之山羊抗人類IgG抗體(Sigma目錄號A9544)2小時30分鐘。在室

溫下向孔中添加1/10000稀釋(100微升/孔)之所接受之小鼠mAb、鹼性磷酸酶結合之山羊抗小鼠IgG抗體(Sigma目錄號A7434)2小時30分鐘。在室溫下向山羊抗體中添加1/50000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之小鼠抗山羊IgG抗體(Sigma目錄號A8062)2小時30分鐘。板接著洗滌4次且向各孔中添加溶解於二乙醇胺緩衝液pH 9.8中得到1 mg/ml最終濃度之100  $\mu$ l受質(磷酸對硝基苯酯錠劑；Sigma；5 mg目錄號N9389；20 mg目錄號N2765)。

30分鐘後，在使用405及490 nm濾光器之Spectra Max M5 Microplate Reader(Molecular Devices)中讀取板。值為一式三份值之平均值 $\pm$ SEM。

### 結果

此等研究展示XAB4及XAB1能夠結合人類及小鼠IL-17A，以及人類及小鼠IL-17A/F。此外，展示XAB4能夠結合食蟹獼猴及大鼠IL-17A。在此等實驗條件下並未偵測到結合於人類、食蟹獼猴及小鼠IL-17F，以及結合於其他人類家族成員(IL-17B、IL-17C、IL-17D及IL-17E)。

**表22. 藉由ELISA之XAB4及XAB1與人類、食蟹獼猴、小鼠及大鼠IL-17家族成員的交叉反應性。**

	XAB4 (1 $\mu$ g/ml) O.D值 (平均值 $\pm$ SEM)	對照抗體 (1或10 $\mu$ g/ml) O.D值 (平均值 $\pm$ SEM)	XAB1 (1 $\mu$ g/ml) O.D值 (平均值 $\pm$ SEM)	對照抗體 (1或10 $\mu$ g/ml) O.D值 (平均值 $\pm$ SEM)
hu IL-17A	2.471 $\pm$ 0.0448		1.302 $\pm$ 0.0554	
hu IL-17A/F	2.137 $\pm$ 0.0429		1.222 $\pm$ 0.0202	
hu IL-17F	0.049 $\pm$ 0.0056		0.032 $\pm$ 0.0005	1.913 $\pm$ 0.0483
hu IL-17B	0.034 $\pm$ 0.0007	0.283 $\pm$ 0.0066	0.049 $\pm$ 0.0013	1.441 $\pm$ 0.0283
hu IL-17C	0.036 $\pm$ 0.0002	0.290 $\pm$ 0.0027	0.032 $\pm$ 0.0002	0.558 $\pm$ 0.0169
hu IL-17D	0.034 $\pm$ 0.0005	0.292 $\pm$ 0.0048	0.031 $\pm$ 0.0010	0.867 $\pm$ 0.0372
hu IL-17E	0.035 $\pm$ 0.0014	0.833 $\pm$ 0.0239	0.033 $\pm$ 0.0003	2.054 $\pm$ 0.0378
cyno IL-17A	1.926 $\pm$ 0.0355			
cyno IL-17F	0.085 $\pm$ 0.0336			
小鼠IL-17A	1.585 $\pm$ 0.0428	1.086 $\pm$ 0.0119	1.439 $\pm$ 0.0354	3.697 $\pm$ 0.0602
小鼠IL-17A/F	2.263 $\pm$ 0.0243	1.142 $\pm$ 0.0315	1.762 $\pm$ 0.0097	2.084 $\pm$ 0.0223

小鼠IL-17F	0.098 ± 0.0060	1.294 ± 0.0134	0.044 ± 0.0008	1.770 ± 0.0302
大鼠IL-17A	1.772 ± 0.1668			

### 實例10. 藉由ELISA之與其他人類、小鼠及大鼠介白素的交叉反應性

在另一組實驗中，評估本發明抗體對於所選人類、小鼠或大鼠細胞激素之交叉反應性。

ELISA微量滴定板(Nunc Immuno plates MaxiSorp: Invitrogen目錄號4-39454A)之孔一式三份地用100微升/孔以下細胞激素塗佈：除重組mIL-6、重組mIL-12及重組mTNF $\alpha$ 在0.5  $\mu$ g/ml下塗佈外，含1  $\mu$ g/ml重組huIL1 $\beta$  (Novartis)、重組huIL-3 (R&D Systems®目錄號203-IL/CF)、重組huIL-4 (R&D Systems®目錄號204-IL/CF)、重組huIL-6 (R&D Systems®目錄號206-IL-1010/CF)、重組huIL-8 (R&D Systems®目錄號208-IL-010/CF)、重組huIL-12 (R&D Systems®目錄號219-IL-005/CF)、重組huIL-13 (Novartis)、重組huIL-17A (SEQ ID NO: 76)、重組huIL-17A/F、重組huIL-17F (SEQ ID NO: 77)、重組huIL-18 (MBL目錄號B003-5)、重組huIL-20 (Novartis)、重組huIL-23 (R&D Systems®目錄號1290-IL-010/CF)、重組huIFN $\gamma$  (Roche)、重組huTNF $\alpha$  (Novartis)、重組huEGF (Sigma目錄號E9644.)、重組huTGF $\beta$ 2 (Novartis)、重組mIL-1 $\beta$  (R&D Systems®目錄號401-ML)、重組mIL-2 (R&D Systems®目錄號402-ML-020/CF)、重組mIL-6 (R&D Systems®目錄號406-ML-010/CF)、重組mIL-12 (R&D Systems®目錄號419-ML-010/CF)、重組mIL-17A (SEQ ID NO: 83)、重組mIL-17A/F (R&D Systems®目錄號5390-IL)、重組mIL-17F (R&D Systems®目錄號2057-IL/CF)、重組mIL-18 (MBL目錄號B004-5)、重組mIL-23 (R&D Systems®目錄號1887-ML)、重組mIFN- $\gamma$  (R&D Systems®目錄號485-MT)、重組mTNF $\alpha$  (R&D Systems®目錄號410-MT)、重組大鼠IL-4 (R&D Systems®目錄號504-RL/CF)、重組大鼠IL-6 (R&D Systems®目

錄號 506-RL-010)、重組大鼠 IL-12 (R&D Systems® 目錄號 1760-RL/CF)、重組大鼠 IL-17A (SEQ ID NO: 85)、重組大鼠 IL-23 (R&D Systems® 目錄號 3136-RL-010/CF)、重組大鼠 TNF $\alpha$  (R&D Systems® 目錄號 510-RT/CF) 之無 Ca 及 Mg (10 $\times$ ； Invitrogen 目錄號 14200-083) 0.02% NaN<sub>3</sub>的磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)，且在4°C下培育隔夜。

次日，在37°C下用300  $\mu$ l PBS/2% BSA (fraction V; Roche 目錄號 10 735 094 001)/0.02% NaN<sub>3</sub>阻斷微量滴定板1小時。板接著用 PBS/0.05% Tween 20 (Sigma 目錄號 P7949)/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。

在室溫下添加10  $\mu$ g/ml(100微升/孔)本發明之抗體3小時。為驗證抗原塗佈於板，使用100微升/孔以下對照抗體：小鼠抗-huIL1 $\beta$  (R&D Systems® 目錄號 MAB601)、小鼠抗-huIL-3 (R&D Systems® 目錄號 MAB603)、小鼠抗-huIL4 (R&D Systems® 目錄號 MAB604)、小鼠抗-huIL-6 (R&D Systems® 目錄號 MAB206)、小鼠抗-hu-IL8 (R&D Systems® 目錄號 MAB208)、小鼠抗-huIL-12 (R&D Systems® 目錄號 MAB219)、小鼠抗-huIL-13 (Novartis)、小鼠抗-huIL-17A (Novartis)、小鼠抗-huIL-17F (Novartis)、小鼠抗-huIL-18 (MBL 目錄號 D043-3)、小鼠抗-huIL-20 (Abcam 目錄號 ab57227)、山羊抗-huIL-23 (R&D Systems® 目錄號 AF1716)、小鼠抗-huIFN- $\gamma$  (R&D Systems® 目錄號 MAB285)、小鼠抗-huTNF- $\alpha$  (R&D Systems® 目錄號 MAB610)、小鼠抗-hu-EGF (R&D Systems® 目錄號 MAB236)、人類抗-huTGF $\beta$ 2 (Novartis)、大鼠抗-mIL-1 $\beta$  (R&D Systems® 目錄號 MAB401)、大鼠抗-mIL-2 (R&D Systems® 目錄號 MAB402)、大鼠抗-mIL-6 (R&D Systems® 目錄號 MAB406)、大鼠抗-mIL-12 (R&D Systems® 目錄號 MAB419)、小鼠抗-m/ratIL-17A (Novartis)、大鼠抗-mIL-17F (R&D Systems® 目錄號 MAB2057)、大鼠抗-mIL-18 (MBL 目錄號 D047-3)、大鼠抗-mIFN- $\gamma$  (R&D Systems® 目錄號 MAB485)、山羊抗-mTNF $\alpha$

(R&D Systems®目錄號AF-410-NA)、小鼠抗大鼠IL-4 (R&D Systems®目錄號MAB504)、山羊抗大鼠IL-6 (R&D Systems®目錄號AF506)、山羊抗大鼠IL-12 (R&D Systems®目錄號AF1760)、小鼠抗大鼠IL-23 (R&D Systems®目錄號MAB3510)、小鼠抗大鼠TNF $\alpha$  (R&D Systems®目錄號MAB510)。其在室溫下於PBS、0.02% NaN<sub>3</sub>中以1或5  $\mu$ g/ml添加3小時。

板接著用PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。接著，向具有人類抗體之孔中添加1/20000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之山羊抗人類IgG抗體(Sigma目錄號A9544)。向具有小鼠抗體之孔中添加1/10000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之山羊抗小鼠IgG抗體(Sigma目錄號A1047)。向具有山羊抗體之孔中添加1/1000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之兔抗山羊IgG抗體(Sigma目錄號A7650)，且向具有大鼠抗體之孔中添加1/20000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之兔抗大鼠IgG抗體(Sigma目錄號A6066)。在室溫下培育二級抗體2小時30分鐘。板接著洗滌4次且向各孔中添加溶解於二乙醇胺緩衝液pH 9.8中得到1 mg/mL最終濃度之100  $\mu$ l受質(磷酸對硝基苯酯錠劑；Sigma；5 mg目錄號N9389；20 mg目錄號N2765)。

在室溫下30分鐘或在4°C下隔夜後，在使用405及490 nm濾光器之Spectra Max M5 Microplate Reader(Molecular Devices)中讀取板。值為一式三份值之平均值 $\pm$ SEM。

## 結果

所獲得之資料展示XAB4及XAB1皆對人類、小鼠及大鼠來源之IL-17A且對人類及小鼠來源之IL-17A/F具有高度選擇性。此外，在測試條件下，10  $\mu$ g/ml XAB1對於人類IL-17F之反應性(在1  $\mu$ g/ml下未發現，參見上文)在XAB4下並未觀察到。未偵測到對所測試之其他細胞激素的反應性。

表23. 藉由ELISA之XAB4及XAB1對人類細胞激素之交叉反應性。

	XAB4 (10 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	對照抗體 (5 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (10 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	對照抗體 (1 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)
IL1β	0.015 ± 0.0075	0.867 ± 0.0107	-0.110 ± 0.0901	3.071 ± 0.0486
IL3	0.167 ± 0.1288	0.732 ± 0.0194	-0.049 ± 0.0738	2.931 ± 0.0779
IL4	0.047 ± 0.0089	0.806 ± 0.0617	0.057 ± 0.0458	2.555 ± 0.1499
IL6	-0.015 ± 0.0103	1.452 ± 0.2020	-0.044 ± 0.0838	2.976 ± 0.1025
IL8	0.018 ± 0.0078	3.130 ± 0.0109	0.058 ± 0.0431	3.153 ± 0.1228
IL12	0.009 ± 0.0058	0.853 ± 0.0496	-0.097 ± 0.1600	2.964 ± 0.1370
IL13	0.019 ± 0.0085	2.639 ± 0.0309	0.125 ± 0.0706	2.639 ± 0.0309
IL17A	3.178 ± 0.0697	3.136 ± 0.0644	2.745 ± 0.0879	2.731 ± 0.0850
IL17A/F	3.100 ± 0.0458	3.024 ± 0.0816	2.644 ± 0.2517	3.024 ± 0.0816
IL17F	0.035 ± 0.0138	3.114 ± 0.0672	0.613 ± 0.4162	3.185 ± 0.0110
IL18	-0.001 ± 0.0234	3.313 ± 0.2080	-0.086 ± 0.0170	3.313 ± 0.2080
IL20	0.039 ± 0.0117	3.039 ± 0.0671	0.335 ± 0.2442	3.118 ± 0.0252
IL23	-0.022 ± 0.0450	3.435 ± 0.0878	0.085 ± 0.0678	3.350 ± 0.0886
IFN-γ	0.048 ± 0.0676	3.419 ± 0.0404	0.059 ± 0.0511	3.236 ± 0.0312
TNF-α	0.009 ± 0.0197	3.373 ± 0.0550	0.289 ± 0.0318	3.275 ± 0.0440
EGF	0.126 ± 0.0858	3.432 ± 0.1050	0.062 ± 0.0427	3.233 ± 0.1126
TGFβ2	0.018 ± 0.0190	3.397 ± 0.0358	0.146 ± 0.0653	3.246 ± 0.0303
BSA	0.009 ± 0.0194	0.010 ± 0.0192	0.043 ± 0.0033	0.149 ± 0.0558

注意：負值歸因於減去空白(無特異性抗體之孔的O.D.值)的事實。

表24. 藉由ELISA之XAB4及XAB1對小鼠細胞激素之交叉反應性。

	XAB4 (10 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	對照抗體 (5 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (10 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	對照抗體 (5 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)
IL-1β	0.022 ± 0.0057	0.611 ± 0.0665	0.007 ± 0.0123	0.624 ± 0.0455
IL2	0.024 ± 0.0227	3.548 ± 0.1283	0.022 ± 0.0125	3.295 ± 0.0557
IL6	0.031 ± 0.0063	3.291 ± 0.0174	0.038 ± 0.0091	3.340 ± 0.1115
IL12	0.035 ± 0.0110	3.359 ± 0.0094	-0.005 ± 0.0121	3.295 ± 0.0331
IL17A	3.285 ± 0.0445	3.180 ± 0.0702	2.974 ± 0.0281	3.186 ± 0.0505
IL17A/F	3.342 ± 0.1047	3.407 ± 0.1102	3.169 ± 0.0340	3.214 ± 0.0145
IL17F	0.034 ± 0.0122	3.359 ± 0.0247	-0.058 ± 0.0326	3.264 ± 0.0309
IL18	0.054 ± 0.0149	2.650 ± 0.0227	0.022 ± 0.0123	2.572 ± 0.0145
IL23	0.058 ± 0.0139	0.601 ± 0.0314	0.009 ± 0.0007	0.590 ± 0.0378
IFN-γ	0.038 ± 0.0114	2.751 ± 0.0515	0.048 ± 0.0063	2.388 ± 0.2351
TNF-α	0.065 ± 0.0154	3.258 ± 0.1097	0.025 ± 0.0081	3.476 ± 0.0714
BSA	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047

注意：負值歸因於減去空白(無特異性抗體之孔的O.D.值)的事實。

表25. 藉由ELISA之XAB4及XAB1對大鼠細胞激素之交叉反應性。

	XAB4 (10 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	對照抗體 (5 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (10 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)	對照抗體 (5 µg/ml) O.D值 (平均值 ± SEM)
IL4	0.026 ± 0.0082	3.168 ± 0.0297	0.017 ± 0.0092	3.324 ± 0.1092
IL6	0.021 ± 0.0028	3.116 ± 0.0318	0.000 ± 0.0141	3.253 ± 0.1078
IL12	0.009 ± 0.0113	3.185 ± 0.0921	-0.007 ± 0.0082	3.310 ± 0.0692
IL17A	3.483 ± 0.0910	3.156 ± 0.0890	1.202 ± 0.0136	3.359 ± 0.0670
IL23	0.023 ± 0.0050	3.380 ± 0.2127	0.011 ± 0.0010	3.199 ± 0.1078
TNF-α	0.020 ± 0.0104	3.346 ± 0.1376	0.003 ± 0.0029	3.159 ± 0.0854
BSA	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047

注意：負值歸因於減去空白(無特異性抗體之孔的O.D.值)的事實。

#### 實例11. IL-17A - IL-17RA及IL-17A/F-IL-17RA活體外競爭性結合抑制分析

使用來自儲備溶液(BTP22599: 1.68 mg/ml = 46.2 µM)之人類IL-17RA。用含人類IL-17RA (100微升/孔，1 µg/ml，約27.5 nM)之PBS/0.02% NaN<sub>3</sub>塗佈ELISA微量滴定板且在室溫下培育隔夜。次日，板在37°C下用300 µl PBS/2% BSA/0.02% NaN<sub>3</sub>阻斷1小時。接著，板用PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。

在此製備後，抗體變異體之滴定(50 µl，IL-17A之濃度為12 nM至0.12 nM且IL-17A/F之濃度為1200 nM至40 nM，3個步驟)在室溫下與人類IL-17A生物素(50 µl，在0.94 nM下)或IL-17A/F(50 µl，在31 nM下)一起預培育30分鐘。

在室溫下向孔中添加100 µl混合物3小時30分鐘。在用PBS/0.05% Tween20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌後，添加四次最終1/10000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之抗生蛋白鏈菌素。在室溫下45分鐘後，板再用PBS/0.05% Tween20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次且添加(100微升/孔)含受質磷酸對硝基苯酯之二乙醇胺緩衝液pH 9.8(1 mg/ml)。

30分鐘後，在spectra Max M5 Microplate reader、405及490 nm濾

光器中讀取板(一式三份)。使用四參數邏輯斯諦模型(Excel Xlfit；FIT 模型205)進行不同抗體變異體之抑制百分比及IC<sub>50</sub>值的計算。

## 結果

資料展示XAB4及XAB1皆能夠阻斷huIL-17A及huIL-17A/F結合於huIL-17RA。XAB4對IL-17A及IL-17A/F之較高親和力反映在較高抑制能力中。IC<sub>50</sub>值報導在表中。阻斷IL-17A/F-IL-17RA相互作用所需之較高濃度主要由分析中使用約30倍高濃度之IL-17A/F的事實解釋。抗體結合於A/F之A次單位且因此不能阻止F次單位結合於IL-17RA。然而，F與IL-17RA之結合實際上較弱，在300 nM範圍中。

**表26.XAB4及XAB1抑制huIL-17A及huIL-17A/F結合於huIL-17RA。**

配體\受體相互作用	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) (平均值 ± SEM)	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) (平均值 ± SEM)	對照抗體(nM)
huIL-17A\huIL-17RA	0.321 ± 0.037	0.830 ± 0.112	>60
huIL-17A/F\huIL-17RA	153.9 ± 18.9	301.3 ± 51.9	

## 實例12.由本發明之抗體變異體活體外中和人類IL-17A及IL-17A/F活性

### (i) 對C20A4Cl6細胞(人類軟骨細胞株)之分析

在補充以10%胎牛血清超低IgG (Gibco目錄號16250-078；批次1074403)、β-巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}$  M最終)及Normocin (0.1 mg/ml；InvivoGen目錄號ant-nr-2)之RPMI (Gibco目錄號61870-010)中培養C20A4Cl6或C-20/A4純系6(Goldring MB等人, 1994, J Clin Invest; 94:2307-16)細胞。

使用Accutase溶液(PAA目錄號L11-007)使細胞自塑膠脫離。細胞以100 μl孔中 $5 \times 10^3$ 之密度分佈於96孔微量滴定板中無胎牛血清、β-巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}$  M最終)及Normocin(0.1 mg/ml)的RPMI 1640 (Gibco目錄號61870-010)中。

使C20A4Cl6細胞黏附於板隔夜。次日早晨，在50 μl不同濃度之

測試抗體(XAB4；XAB1)、對照抗體(Simulect® 1.1%溶液，批次C0011；831179)或對照培養基存在下，向孔中一式三份地添加50  $\mu$ l體積的不同濃度重組huIL-17A (SEQ ID NO: 76；MW 32000)、重組huIL-17A/F (MW 32800)、重組huIL-17F (SEQ ID NO: 77；MW 30000)或在人類TNF $\alpha$  (Novartis；MW 17500)存在下之對照培養基以達到200微升/孔之最終體積及0.5%胎牛血清之最終濃度。

huIL-17A (30 pM)、huIL-17A/F (300 pM)及huIL-17F (10 nM)與huTNF $\alpha$  (6 pM)一起添加。XAB4 (MW 150000)以介於1至0.003 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A，以介於10至0.03 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A/F且以介於3  $\mu$ M至30 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17F。XAB1 (MW 150000)以介於3至0.01 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A，以介於10至0.03 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A/F且以介於3  $\mu$ M至30 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17F。Simulect®以介於3  $\mu$ M至100 nM範圍之濃度添加。在培育24小時後收集培養物上清液且藉由ELISA量測huIL-6產生。

#### (ii) 對BJ細胞(人類纖維母細胞)之分析

在補充以10%胎牛血清超低IgG (Gibco目錄號16250-078；批次1074403)、 $\beta$ -巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}$  M最終)及Normocin (0.1 mg/ml；InvivoGen目錄號ant-nr-2)之RPMI (Gibco目錄號61870-010)中培養BJ細胞(ATCC目錄號CRL 2522之人類皮膚纖維母細胞)。使用Accutase溶液(PAA目錄號L11-007)使細胞自塑膠脫離。

細胞以100  $\mu$ l孔中 $5 \times 10^3$ 之密度分佈於96孔微量滴定板中無胎牛血清、 $\beta$ -巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}$  M最終)及Normocin(0.1 mg/ml)的RPMI 1640中。使BJ細胞黏附於板隔夜。次日早晨，在50  $\mu$ l不同濃度之測試抗體(XAB4；XAB1)、對照抗體(Simulect® 1.1%溶液，批次號C0011；831179)或對照培養基存在下，向孔中一式三份地添加50  $\mu$ l體積的不

同濃度rhuIL-17A (SEQ ID NO: 76 ; MW 32000)、rhuIL-17A/F (MW 32800)及rhuIL-17F (SEQ ID NO: 77 ; MW 30000)或在人類TNF $\alpha$  (Novartis ; MW 17500)存在下之對照培養基以達到200微升/孔之最終體積及0.5%胎牛血清之最終濃度。

HuIL-17A (30 pM)、huIL-17A/F (300 pM)及huIL-17F (10 nM)與huTNF $\alpha$  (6 pM)一起添加。XAB4 (MW 150000)以介於1至0.003 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A，以介於10至0.03 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A/F且以介於3  $\mu$ M至30 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17F。XAB1 (MW 150000)以介於3至0.01 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A，以介於10至0.03 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17A/F且以介於3  $\mu$ M至30 nM範圍之濃度添加來中和huIL-17F。Simulect $\circledR$ 以介於3  $\mu$ M至100 nM範圍之濃度添加。在培育24小時後收集培養物上清液且藉由ELISA量測huIL-6及huGRO $\alpha$ 產物。

### (iii) 偵測分析

#### 1) 用於偵測人類IL-6產生之ELISA

ELISA微量滴定板用含抗人類IL-6小鼠Mab (R&D Systems $\circledR$ 目錄號MAB206；100微升/孔，在1  $\mu$ g/ml下)之PBS 0.02%NaN<sub>3</sub>塗佈且在+4°C下培育隔夜。次日，微量滴定板在室溫下用300  $\mu$ l PBS/2% BSA/0.02% NaN<sub>3</sub>阻斷3小時。板接著用PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。添加C20A4C16 (最終1:5稀釋之用huIL-17A加huTNF $\alpha$ 刺激之培養物、或最終1:2稀釋之用huTNF $\alpha$ 加huIL-17A/F或IL-17F刺激之培養物；100微升/孔)或BJ細胞(最終1:10稀釋之用huIL-17A加huTNF $\alpha$ 刺激之培養物、或最終1:5稀釋之用huTNF $\alpha$ 加huIL-17A/F或IL-17F刺激之培養物；100微升/孔)之培養物上清液。

為建立滴定曲線，在1:2稀釋步驟中滴定500 pg/ml至7.8 pg/ml之rhuIL-6 (Novartis；100微升/孔)。在室溫下隔夜培育後，板用

PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。添加生物素結合之山羊抗人類IL-6抗體(R&D Systems®目錄號BAF206；30 ng/ml；100微升/孔)。使樣品在室溫下反應4小時。在洗滌(4次)後，添加最終1/10000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之抗生蛋白鏈菌素(Jackson Immunoresearch目錄號016-050-084)。

在室溫下40分鐘後，板再洗滌4次。將磷酸對硝基苯酯受質錠劑(Sigma；5 mg，目錄號N9389；20 mg，目錄號N2765)溶解於二乙醇胺緩衝液pH 9.8中得到1 mg/ml之最終濃度。向各孔中添加100  $\mu$ l且1小時後，在使用405及490 nm濾光器之Spectra Max M5 Microplate Reader (Molecular Devices)中讀取O.D.。

## 2) 用於偵測人類GRO $\alpha$ 產生之ELISA

ELISA微量滴定板用含抗人類GRO $\alpha$ 小鼠mAb (R&D Systems®目錄號MAB275；100微升/孔，在1.5  $\mu$ g/ml下)之PBS/0.02% NaN<sub>3</sub>塗佈且在4°C下培育隔夜。次日，微量滴定板在室溫下用300  $\mu$ l PBS/2% BSA/0.02% NaN<sub>3</sub>阻斷3小時。板接著用PBS/0.05% Tween20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。添加BJ細胞之培養物上清液(最終1:2稀釋；100微升/孔)。

為建立滴定曲線，在1:2稀釋步驟中滴定2 ng/ml至0.03 ng/ml之人類GRO $\alpha$  (R&D Systems®目錄號275-GR/CF；100微升/孔)。在室溫下隔夜培育後，板用PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。

添加生物素結合之山羊抗人類GRO $\alpha$ 抗體(R&D Systems®目錄號BAF275；100 ng/ml；100微升/孔)。使樣品在室溫下反應4小時。在洗滌(4次)後，添加最終1/10000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之抗生蛋白鏈菌素(Jackson Immunoresearch目錄號016-050-084)。在室溫下40分鐘後，板再洗滌4次。將磷酸對硝基苯酯受質錠劑(Sigma；5 mg，目錄號N9389；20 mg，目錄號N2765)溶解於二乙醇胺緩衝液pH

9.8中得到1 mg/ml之最終濃度。向各孔中添加100  $\mu$ l且1小時後，在使用405及490 nm濾光器之Spectra Max M5 Microplate Reader (Molecular Devices)中讀取O.D.。

### 3) 計算

資料以平均值 $\pm$  SEM形式報導。使用四參數曲線擬合進行ELISA計算。使用Xlfit(FIT模型205)計算抗體對IL-6及GRO- $\alpha$ 分泌之抑制之IC<sub>50</sub>值。

#### (iv) 結果

##### 1) 對C20A4Cl6細胞(人類軟骨細胞株)之分析

XAB4及XAB1皆能夠在rhuTNF $\alpha$ 存在下中和經rhuIL-17A及rhuIL-17A/F刺激之C20A4Cl6細胞誘發分泌huIL-6。在100 nM下之對照抗體(Simulect®)無效應。XAB4及XAB1之IC<sub>50</sub>值(平均值 $\pm$  SEM)報導於表27中。甚至在3  $\mu$ M之Ab濃度下亦未觀察到對於huIL-17F之抑制。

表27. XAB4及XAB1對於由C20A4Cl6細胞分泌huIL-6之抑制作用。

刺激物	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) (平均值 $\pm$ SEM)	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) (平均值 $\pm$ SEM)	對照抗體 (nM)
rhuIL-17A (1 nM) <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.06		>100
rhuIL-17A/F (3 nM) <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 0.18		>100
rhuIL-17F (30 nM) <sup>a</sup>	>3000		>1000
rhuIL-17A (30 pM) + rhuTNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	0.024 $\pm$ 0.004	1.21 $\pm$ 0.09	>3000
rhuIL-17A/F (300 pM) + rhuTNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	0.108 $\pm$ 0.02	>10	>3000
rhuIL-17F (10 nM) + rhuTNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	>3000	>3000	>3000

<sup>a</sup>減去無刺激之hu IL-6產生的背景值(0.13 $\pm$ 0.003)

<sup>b</sup>減去僅具有TNF之培養物中huIL-6產生之背景值(0.20 $\pm$ 0.003)

根據此等實驗，顯然親本XAB1抗體與其衍生物共有中和活性。亦發現XAB4變異體具有比XAB1高的中和活性。

在與上述實驗類似的額外實驗中，比較所有抗體XAB1-XAB5，

如表28所示。此處能夠看出XAB2、XAB3及XAB5之抑制概況可與XAB4及XAB1(尤其XAB4)所觀察到的相比。

**表28. XAB抗體對於由C20A4Cl6細胞分泌huIL-6之抑制作用。**

刺激物	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB2 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB3 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB5 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM
rhuIL-17A (0.5 nM) <sup>a</sup>	0.29 ± 0.03	0.72 ± 0.08	0.63 ± 0.15	0.51 ± 0.04	0.55 ± 0.01

<sup>a</sup>減去無刺激物之HuIL-6產生背景值(0.04±1.13 ng/ml)。

## 2) 對BJ細胞(人類纖維母細胞)之分析

XAB4及XAB1皆在huTNF $\alpha$ 存在下中和經rhuIL-17A及rhuIL-17A/F刺激之BJ細胞誘發分泌huIL-6及huGRO $\alpha$ 。在100 nM下之對照抗體(Simulect®)無效應。IL-6及hu GRO $\alpha$ 抑制之IC<sub>50</sub>值報導於表29及表30。甚至在3  $\mu$ M之Ab濃度下亦未觀察到對於huIL-17F之抑制。根據此等實驗，顯然親本XAB1抗體與其衍生物共有中和活性。

亦發現XAB4變異體具有比XAB1高的中和活性。

**表29. XAB4及XAB1對於由BJ細胞分泌huIL-6之抑制作用。**

刺激物	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	對照抗體(nM)
rhuIL-17A (1 nM) <sup>a</sup>	0.63 ± 0.02		>100
rhuIL-17A/F (3 nM) <sup>a</sup>	1.68 ± 0.05		>100
rhuIL-17F (30 nM) <sup>a</sup>	>3000		>1000
rhuIL-17A (30 pM) + rhuTNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	0.012 ± 0.002	0.47 ± 0.02	>3000
rhuIL-17A/F (300 pM) + rhuTNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	0.17 ± 0.01	3.83 ± 0.63	>3000
rhuIL-17F (10 nM) + rhuTNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	>3000	>3000	>3000

<sup>a</sup>減去無刺激物之hu IL-6產生的背景值(0.32±0.002 ng/ml)。

<sup>b</sup>減去僅用TNF刺激之培養物中huIL-6產生之背景值(0.45±0.02 ng/ml)。

表30. XAB4及XAB1對於由BJ細胞分泌hu-GRO- $\alpha$ 之抑制作用。

刺激物	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	對照抗體(nM)
IL-17A (1 nM) <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.01		>100
IL-17A/F (3 nM) <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.05		>100
IL-17F (30 nM) <sup>a</sup>	>3000		>1000
IL-17A (30 pM) + TNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	0.007 $\pm$ 0.0004	0.72 $\pm$ 0.12	>3000
IL-17A/F (300 pM) + TNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.01	6.22 $\pm$ 0.44	>3000
IL-17F (10 nM) + TNF- $\alpha$ (6 pM) <sup>b</sup>	>3000	>3000	>3000

<sup>a</sup>減去無刺激物之hu GRO $\alpha$ 產生的背景值(0.03 $\pm$ 0.01 ng/ml)。

<sup>b</sup>減去僅具有TNF之培養物中hu GRO $\alpha$ 產生之背景值(0.15 $\pm$ 0.008 ng/ml)。

在與上述實驗類似的額外實驗中，比較所有抗體XAB1-XAB5，如表31及表32所示。此處能夠看出XAB2、XAB3及XAB5之抑制概況可與XAB4及XAB1(尤其XAB4)所觀察到的相比。

表31. XAB抗體對於由BJ細胞分泌huIL-6之抑制作用。

刺激物	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB2 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB3 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB5 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM
rhuIL-17A (0.5 nM) <sup>a</sup>	4.97 $\pm$ 0.59	0.64 $\pm$ 0.22	0.50 $\pm$ 0.002	0.55 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup>減去無刺激物之HuIL-6產生背景值(0.15 $\pm$ 4.06 ng/ml)

表32. XAB抗體對於由BJ細胞分泌huGRO $\alpha$ 之抑制作用。

刺激物	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB2 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB3 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB5 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM
rhuIL-17A (0.5 nM) <sup>a</sup>	1.39 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.05

<sup>a</sup>減去無刺激物之HuGRO $\alpha$ 產生背景值(0.03 $\pm$ 0.02 ng/ml)

實例13. 由本發明之抗體變異體活體外中和小鼠IL-17A及IL-17A/F活性

在補充以10%胎牛血清超低IgG (Gibco目錄號16250-078；批次1074403)、 $\beta$ -巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}$  M最終)及Normocin (0.1 mg/ml；InvivoGen目錄號ant-nr-2)之RPMI (Gibco目錄號 61870-010)中培養CMT-93細胞(ATCC CCL-223)。

使用Accutase溶液(PAA目錄號L11-007)使細胞自塑膠脫離，且將細胞以100  $\mu$ l孔中 $5 \times 10^3$ 之密度分佈於96孔微量滴定板中無胎牛血清、 $\beta$ -巯基乙醇及Normocin的RPMI 1640中。

使細胞黏附於板隔夜。次日早晨，在50  $\mu$ l不同濃度之測試抗體(XAB4或XAB1)、對照抗體(Simulect ® 1.1%溶液；C0011，831179)或對照培養基存在下，向孔中一式三份地添加50  $\mu$ l體積之1 nM rmIL-17A (SEQ ID NO: 83，MW 31000)、3 nM之rmIL-17A/F (R&D Systems®目錄號5390-IL；MW 30400)、30 nM之rmIL-17F (SEQ ID NO: 84；MW 30000)、1 nM之rratIL-17A (SEQ ID NO: 85；MW 31000)或對照培養基以達到200微升/孔之最終體積及1%胎牛血清之最終濃度。

在培育24小時後收集培養物上清液且藉由ELISA量測KC產生。

#### (i) 用於偵測小鼠KC產生之ELISA

ELISA微量滴定板用含大鼠抗小鼠KC MAb (R&D Systems®目錄號MAB453；100微升/孔，在1  $\mu$ g/ml下)之PBS/0.02% NaN<sub>3</sub>塗佈且在4°C下培育隔夜。次日，微量滴定板在室溫下用300  $\mu$ l PBS/2% BSA/0.02% NaN<sub>3</sub>阻斷3小時。板接著用PBS/0.05% Tween20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。添加CMT-93細胞之培養物上清液(最終1:5稀釋；100微升/孔)。

為建立滴定曲線，在1:2稀釋步驟中滴定1 ng/ml至0.016 ng/ml之小鼠KC (R&D Systems®編號453-KC，100微升/孔)。在室溫下隔夜培育後，板用PBS/0.05% Tween 20/0.02% NaN<sub>3</sub>洗滌4次。添加0.1  $\mu$ g/ml

之生物素結合之山羊抗小鼠KC抗體(R&D Systems®目錄號BAF453；100微升/孔)。使樣品在室溫下反應4小時。在洗滌(4次)後，添加最終1/10000稀釋(100微升/孔)之鹼性磷酸酶結合之抗生蛋白鏈菌素(Jackson Immunoresearch目錄號016-050-084)。在室溫下歷經40分鐘後，板再洗滌4次。將磷酸對硝基苯酯受質錠劑(Sigma；5 mg，目錄號N9389；20 mg，目錄號N2765)溶解於二乙醇胺緩衝液pH 9.8中得到1 mg/ml之最終濃度。向各孔中添加100  $\mu$ l培養物上清液，且1小時後，在使用405及490 nm濾光器之Spectra Max M5 Microplate Reader(Molecular Devices)中讀取O.D.。

(ii) 計算

資料以平均值 $\pm$  SEM形式報導。使用四參數曲線擬合進行ELISA計算。使用Xlfit<sup>TM</sup>(FIT模型205)計算抗體對KC分泌之抑制之IC<sub>50</sub>值。

(iii) 結果

XAB4及XAB1皆能夠中和經小鼠或大鼠IL-17A及小鼠IL-17A/F刺激之CMT-93細胞誘發分泌小鼠KC。對照抗體(Simulect®)無效應。XAB4及XAB1之IC<sub>50</sub>值(平均值 $\pm$  SEM)報導於表33中。甚至在10  $\mu$ M之Ab濃度下亦未觀察到對於huIL-17F之抑制。

**表33. XAB4及XAB1對於由CMT-93細胞分泌小鼠KC之抑制作用。**

刺激物	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 $\pm$ SEM	對照抗體 (nM)
mIL-17A (1 nM) <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 0.48	539 $\pm$ 29.4	>3000
mIL-17A/F (3 nM) <sup>a</sup>	10.3 $\pm$ 1.06	>1000	>3000
mIL-17F (30 nM) <sup>a</sup>	>10000	>10000	>3000
rIL-17A (1 nM) <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 0.84	467 $\pm$ 25.1	>3000

<sup>a</sup>減去無刺激物之KC產生背景值(0.07 $\pm$ 0.001 ng/ml)。

根據此等實驗，顯然親本XAB1抗體以及其衍生物皆具有中和活性。亦發現XAB4變異體具有比XAB1高的中和活性。

在與上述實驗類似的額外實驗中，比較所有抗體XAB1-XAB5，如表34所示。此處能夠看出XAB2、XAB3及XAB5之抑制概況可與XAB4及XAB1(尤其XAB4)所觀察到的相比。

**表34 XAB抗體對於由CMT-93細胞分泌KC之抑制作用。**

刺激物	XAB1 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB2 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB3 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB4 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM	XAB5 IC <sub>50</sub> (nM) 平均值 ± SEM
mIL-17A (0.15 nM) <sup>a</sup>	128 ± 14.2	20.9 ± 0.96	<1	7.0 ± 0.29	7.8 ± 0.78

<sup>a</sup>減去無刺激物之KC產生背景值(0.19±5.81 ng/ml)。

#### **實例14.大鼠抗原誘發之關節炎分析(大鼠AIA)**

在21天前及14天前，雌性路易斯(Lewis)大鼠(120-150 g)在背部兩個部位用與完全弗氏佐劑(complete Freund's adjuvant)1:1勻化之甲基化牛血清白蛋白(mBSA)皮內致敏(0.1 ml含有5 mg/ml mBSA)。在第0天，經由面罩使用5%異氟烷/空氣混合物使大鼠麻醉且使用3.5%異氟烷保持以便關節內注射。右膝接受50  $\mu$ l含10 mg/ml mBSA之5%葡萄糖溶液(抗原注射膝蓋)，而左膝僅接受50  $\mu$ l 5%葡萄糖溶液(媒劑注射膝蓋)。接著，在關節內注射後立即使用測徑規量測左膝及右膝的直徑且在第2天、第4天及第7天再次量測。

在3天前藉由單次皮下注射投與治療劑。注射0.15、1.5、15及116 mg/kg之本發明抗體。以左膝腫脹之比率形式計算右膝腫脹，且相對於時間繪製R/L膝腫脹比，得到對照組及治療組之曲線下面積(AUC)圖。使用Excel試算表相較於對照組AUC(0%抑制)計算各治療組AUC中個別動物之抑制百分比。

#### **結果**

結果展示於表35中。證明XAB4之右膝腫脹劑量相關抑制，其中經計算之ED<sub>50</sub>為1.68 mg/kg s.c。

表35. 使用XAB4之單次劑量治療在路易斯大鼠抗原誘發之關節炎中自第0天至第7天對於膝蓋腫脹的效應。

抗體劑量(mg/kg)	膝蓋腫脹AUC之抑制百分比
0.15	18.46 ± 1.61*
1.5	65.76 ± 3.41**
15	71.59 ± 1.27**
116	77.01 ± 1.72**

資料點表示n = 5隻動物之平均值±SEM。\* p<0.05及\*\* p<0.01

ANOVA後為相對於對照曲線之杜奈特檢驗(Dunnett's test)。

類似地，在使用威斯塔(Wistar)大鼠之模型(資料未展示)中及在使用小鼠抗原誘發之關節炎模型之模型(資料未展示)中證明XAB4之膝蓋腫脹劑量相關抑制。

#### 實例15. 血管生成機械模型

含有人類IL-17A(150 ng至200 ng)之腔室當皮下置放於小鼠中時，在植人物周圍導致新血管生長。血管生成的量與此區域中新形成的組織的重量有關。使用0.01、0.03、0.1、0.3、1及3 mg/kg XAB4之預防性治療抑制人類IL-17誘發之血管生成。5個較高劑量皆引起有效且顯著的組織腔室重量抑制。4個較高劑量未展示劑量依賴性，然而，0.03 mg/kg之劑量沒有0.1 mg/kg及0.1 mg/kg以上之劑量有效。

此研究證明，IL-17A之有效血管生成效應可用抗-IL-17A抗體中和且提供XAB4對於人類IL-17A活體內有效性的實驗證據。

#### 實例16. 實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)模型

實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)模型為已知的多發性硬化症的動物模型(回顧例如Constantinescu等人, Br J Pharmacol 2011)。已展示抑制IL-17降低C57Bl/6小鼠之EAE嚴重程度(Haak S等人 2009, JCI; 119:61-69)。

雌性C57Bl/6小鼠(9週大，Harlan, Germany)經重組大鼠髓磷脂寡樹突神經膠質細胞糖蛋白肽(MOG<sub>1-125</sub>)(自身生成)及完全弗氏佐劑

(CFA，藉由添加8 mg/ml結核分枝桿菌菌株H37RA (Difco)至不完全弗氏佐劑(IFA, Sigma)生成)之50/50混合物免疫。在第0天藉由在尾根處皮下注射每隻動物200  $\mu$ g MOG<sub>1-125</sub>進行免疫。此外，在第0天及第2天腹膜內注射每隻動物200 ng百日咳毒素(PT)。

測試XAB4之治療性治療效應及預防性治療效應兩者。

### 治療性治療

關於治療性治療，使用16隻小鼠(8隻用於XAB4且8隻用於對照)。在動物具有至少2.5之臨床計分(嚴重反肢虛弱)3天後開始治療。此後，每週以單劑量皮下注射15 mg/kg XAB4或同型對照抗體。

結果展示於圖11至15中(d.p.i為免疫後天數)。在所有圖中，XAB4由圓形表示且同型對照由方形表示。治療性計分(平均值+SEM)展示於圖11中。清楚地看出用XAB4治療之動物具有比同型對照低的平均臨床計分。圖12展示兩組小鼠之重量變化(%)，且圖13展示累積治療性計分。圖14及15為處理前後治療性計分之比較。在所有圖中清楚地看出XAB4與同型對照相比具有治療效應。因此，使用XAB4之治療性治療顯著降低EAE之嚴重程度。

### 預防性治療

關於預防性治療，使用19隻小鼠(10隻用於XAB4且9隻用於對照)。每隻動物在經由單次皮下注射15 mg/kg XAB4或同型對照免疫之前治療一天。此後，每週以單劑量皮下注射15 mg/kg XAB4或同型對照抗體。

結果展示於圖16至20中(d.p.i為免疫後天數)。在圖16至19中，XAB4由實心圓形表示且同型對照由空心方形表示。預防性計分(平均值+SEM)展示於圖16中。清楚地看出用XAB4治療之動物具有較低平均臨床計分。圖17展示兩組小鼠之重量變化(%)，且圖18展示累積預防性計分。最大預防性計分見於圖19中。在所有圖中清楚地看出

XAB4與同型對照相比具有效應。此外，在圖20中，其中XAB4由實線表示且同型對照由虛線表示，看出與用同型對照治療之小鼠組相比，用XAB4治療之小鼠組的EAE發病較後。

因此，展示使用XAB4之預防性治療顯著延遲EAE發病且降低最大EAE嚴重程度。

#### 實例17. 人類星形膠質細胞中IL17A誘發之IL6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2含量的衰減

研究XAB4對於自人腦之大腦皮質分離之星形膠質細胞中IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2之含量的影響。星形膠質細胞釋放許多使其可調控神經元、神經膠質及免疫細胞之細胞通信、遷移及存活之生長因子、細胞激素及趨化因子。星形膠質細胞終足(end-feet)與內皮細胞之直接通信亦使得星形膠質細胞可控制血腦屏障之功能。此外，星形膠質細胞在突觸間隙釋放且吸收神經傳遞質(諸如穀胺酸鹽)以使其可調控突觸傳遞及興奮性中毒。顯著的是星形膠質細胞在CNS損傷後形成疤痕病變，因此在正常生理機能及病理生理學中具有顯而易見的相對作用。在疾病中，星形膠質細胞被認為在精神、神經及神經退化性病症範圍內發揮作用，其中其在神經炎症中之作用可能為重要的。

資料展示IL-17A及TNF $\alpha$ 之協同刺激增強IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2之釋放，且XAB4抑制人類星形膠質細胞中IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2之含量。此等資料表明IL-17A在星形膠質細胞之細胞激素釋放中的支配作用且支持其用作靶向神經發炎疾病之藥物。值得注意的是，使用XAB4預處理人類星形膠質細胞抑制IL-17A誘發及IL-17A/TNF $\alpha$ 誘發(而不影響TNF $\alpha$ 誘發)之IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2的含量。總之，資料表明使用XAB4選擇性抑制IL-17A信號傳導衰減人類星形膠質細胞中促炎性細胞激素

的含量。在疾病中，星形膠質細胞被認為在精神、神經及神經退化性病症範圍內發揮作用，其中其在神經炎症中之作用可能為重要的。改變星形膠質細胞功能之新穎藥物因此具有潛在價值，其中調控星形膠質細胞功能可證明在治療上有用。因此，由於XAB4經展示對星形膠質細胞之IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2產生有影響，故可推斷出XAB4可為有用的治療劑，諸如用於治療多發性硬化症(MS)。

### 物質及方法

所有細胞激素購自R&D Systems。巴利昔單抗(Basiliximab；Novartis, Basel, Switzerland)用作同型對照。所用一級抗體為：抗-IL17RA Alexa Fluor 647 (BG/hIL17AR, Biolegend)、抗-IL17RC Alexa Fluor 488 (309822, R&D Systems, UK)、抗-p65 (Santa Cruz, USA)、小鼠IgG Alexa Fluor 647 (MOPC-21, Biolegend, UK)、小鼠IgG Alexa Fluor 488 (133303, R&D System, UK)、小鼠IgG Biotin (G155-178, BD Biosciences, Switzerland)及大鼠IgG PE (A95-1, BD Biosciences, Switzerland)。所用二級抗體及染料為：生物素標記之山羊抗兔IgG (BA1000, Vector, UK)、抗生蛋白鏈菌素結合之Alexa Fluor 488及Alexa Fluor 633 (S11223及S2137, Life Technology, USA)、山羊抗小鼠Alexa Fluor 488及Alexa Fluor 633 (A1101及A21050, Life Technology, USA)、抗生蛋白鏈菌素BV421 (405226, Biolegend, UK)、Hoechst 34580 (H21486, Life Technology, USA)。

來源於大腦皮質之人類星形膠質細胞購自ScienCell Research Laboratory (USA) (目錄號1800)。根據供應商之說明書使細胞生長。簡言之，細胞在補充以1%星形膠質細胞生長補充劑(ScienCell目錄號1852)、5%胎牛血清(ScienCell目錄號0010)及1%青黴素/鏈黴素(ScienCell目錄號0503)之人類星形膠質細胞培養基(ScienCell目錄號1801)中生長。細胞維持在5% CO<sub>2</sub>及37°C下之T75培養瓶中，培養基

每三天更換一次直至80%匯合為止。關於所有的處理，將70,000個細胞充分接種於24孔板中，生長3天，使血清缺乏2-4小時，之後用XAB4處理星形膠質細胞2小時，且此後如圖例中所指示用重組人類細胞激素處理18-20小時。細胞團塊用以藉由qPCR定量細胞激素之mRNA含量，且上清液用以藉由HTRF (Cisbio, France，用於IL-6、IL-8及CXCL1)或AlphaLISA (PerkinElmer, USA，用於CCL2及GM-CSF)定量細胞激素之蛋白含量。

藉由實時聚合酶鏈反應(RT-PCR)進行細胞激素mRNA之量測。簡言之，星形膠質細胞在室溫下藉由於350  $\mu$ l溶解緩衝液(具有1%  $\beta$ -巯基乙醇之RLT緩衝液)中溫和震盪溶解5分鐘，且使用RNeasy Microkit (74004, Qiagen, Switzerland)提取總RNA。使用SuperScript III逆轉錄酶(18080-400, Life Technology, Switzerland)合成cDNA。在ViiA7實時PCR機(Life Technology, Switzerland)中藉由q-PCR評估每一基因之表現量。Taqman探針購自Life Technology, Switzerland。每一樣品經一式三份地分析且校正至次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HPRT)。藉由HTRF (IL6 : 62IL6PEC ; IL8 : 62IL8PEC ; CXCL1 : 6FGROPEG, Cisbio, France)評估人類星形膠質細胞上清液(10  $\mu$ l)中人類IL6、IL8、CXCL1蛋白質之含量(ng/ml)，且藉由AlphaLISA 人類CCL2/MCP1 (AL244C, PerkinElmer, USA)評估人類星形膠質細胞上清液(5  $\mu$ l)中人類CCL2蛋白質之含量(ng/ml)。根據製造商說明書進行所有量測。

使用PBS-5 mM EDTA由黏附型培養物獲得人類星形膠質細胞之細胞懸浮液。關於胞外染色，細胞與完整小鼠IgG一起在4°C下於PBS 2% BSA中培育10分鐘，且隨後用抗體在4°C下於PBS 2% BSA中染色30分鐘。關於胞內染色，細胞在4°C下用Cytofix/Cytoperm溶液(554714, BD Biosciences, Switzerland)滲透20分鐘，隨後在4°C下與抗體一起培育30分鐘。在經由70  $\mu$ m過濾器過濾後，在BDFortessa (BD

Biosciences, Switzerland)上獲取細胞且使用FlowJo軟體(Tree Star Inc., USA)分析資料。

在化合物處理後，細胞於PBS (Sigma Aldrich, Germany)中洗滌，接著於冰冷的100%甲醇中固定10分鐘。細胞於無菌PBS中洗滌3×5 min，接著藉由與0.2% Triton-X-100 (Sigma Aldrich, Germany)一起於PBS中在室溫下培育5分鐘而經滲透。非反應性部位在+4°C下用由含10%正常山羊血清(Life Technology, USA)及2%牛血清白蛋白(Sigma Aldrich, Germany)之PBS組成的阻斷緩衝液阻斷隔夜。細胞接著在一級抗體中在4°C下培育隔夜。移除一級抗體且細胞用PBS洗滌3×5 min，之後在室溫下施用二級螢光抗體2小時。蓋片接著在PBS中洗滌5×5 min且用Hoescht 34580核染劑複染。蓋片最後以VectashieldR封固劑(Vector, UK)封固在顯微鏡載片上且蓋片邊緣以指甲油密封。細胞使用利用Axiovert 200M倒置顯微鏡之Zeiss LSM 510 META共焦雷射掃描顯微鏡(Zeiss Ltd, Germany)成像。

## 結果

藉由XAB4之TNF- $\alpha$ 或IL-17A刺激、或IL-17A/TNF- $\alpha$ 協同刺激之拮抗作用展示於圖21A至25A中。藉由XAB4之IL-1 $\beta$ 或IL-17A/IL-1 $\beta$ 協同刺激之拮抗作用展示於圖21B至25B中。

圖21展示對於IL-6釋放之拮抗效應，圖22展示對於CXCL1釋放之拮抗效應，圖23展示對於IL-8之拮抗效應，圖24展示對於GM-CSF之拮抗效應且圖25展示對於CCL2之拮抗效應。

在存在或不存在IL-17A (50 ng/ml)、TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)、IL-1 $\beta$ 、IL-17A/TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ 的情況下，用濃度漸增之XAB4 (0.01 nM、0.1 nM、1 nM及10 nM)處理初生人類星形膠質細胞。全部所用濃度指示於圖中。所展示之資料為XAB4 0.01 nM之兩個實驗及XAB4 0.1 nM、1 nM及10 nM之三個實驗的代表。所示值為平均值±S.E.M。

如圖21A所示，XAB4(全部濃度)與對照及同型相比對於經IL-17A或IL-17A/TNF- $\alpha$ 刺激之星形膠質細胞之IL-6釋放具有拮抗效應。對於各資料集，IL-6之濃度(ng/ml)由y軸表示且XAB4之濃度表示在x軸上(0亦即對照、0.01 nM、0.1 nM、1 nM及10 nM)及10 nM同型。資料集左側係關於未經刺激之細胞，下一資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)刺激之細胞，下一資料集係關於經IL-17A (50 ng/ml)刺激之細胞及最後一個資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞。最後一個資料集具有y軸約10倍高的標度。如圖21B所示，XAB4(全部濃度)與同型相比不具有對於經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)刺激或經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞的拮抗效應。

如圖22A所示，XAB4(全部濃度)與對照及同型相比對於經IL-17A或IL-17A/TNF- $\alpha$ 刺激之星形膠質細胞之CXCL1釋放具有拮抗效應。對於各資料集，CXCL1之濃度(ng/ml)由y軸表示且XAB4之濃度表示在x軸上(0亦即對照、0.01 nM、0.1 nM、1 nM及10 nM)及10 nM同型。資料集左側係關於未經刺激之細胞，下一資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)刺激之細胞，下一資料集係關於經IL-17A (50 ng/ml)刺激之細胞及最後一個資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞。最後一個資料集具有y軸約10倍高的標度。如圖22B所示，XAB4(全部濃度)與同型相比不具有對於經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)刺激或經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞的拮抗效應。

如圖23A所示，XAB4(全部濃度)與對照相比對於經IL-17A或IL-17A/TNF- $\alpha$ 刺激之星形膠質細胞之IL-8釋放具有拮抗效應。與同型相比，XAB4 (0.1 nM、1 nM及10 nM)對於IL-8釋放具有拮抗效應。對於各資料集，IL-8之濃度(ng/ml)由y軸表示且XAB4之濃度表示在x軸上(0亦即對照、0.01 nM、0.1 nM、1 nM及10 nM)及10 nM同型。資料集

左側係關於未經刺激之細胞，下一資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)刺激之細胞，下一資料集係關於經IL-17A (50 ng/ml)刺激之細胞及最後一個資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞。最後一個資料集具有y軸約5倍高的標度。如圖23B所示，XAB4(全部濃度)與同型相比不具有對於經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)刺激或經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞的拮抗效應。

如圖24A所示，XAB4(全部濃度)與對照及同型相比對於經IL-17A/TNF- $\alpha$ 刺激之星形膠質細胞之GM-CSF釋放具有拮抗效應。XAB4 (0.1 nM、1 nM及10 nM)與同型及對照相比對於經IL-17A刺激之星形膠質細胞的GM-CSF釋放具有拮抗效應。對於各資料集，GM-CSF之濃度(ng/ml)由y軸表示且XAB4之濃度表示在x軸上(0亦即對照、0.01 nM、0.1 nM、1 nM及10 nM)及10 nM同型。資料集左側係關於未經刺激之細胞，下一資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)刺激之細胞，下一資料集係關於經IL-17A (50 ng/ml)刺激之細胞及最後一個資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞。如圖24B所示，XAB4(全部濃度)與同型相比不具有對於經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)刺激或經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞的拮抗效應或具有較低拮抗效應。

如圖25A所示，XAB4(全部濃度)與對照及同型相比對於經IL-17A刺激之星形膠質細胞之CCL2釋放具有拮抗效應。XAB4 (0.1 nM、1 nM及10 nM)與同型及對照相比對於經IL-17A/TNF- $\alpha$ 刺激之星形膠質細胞的CCL2釋放具有拮抗效應。對於各資料集，CCL2之濃度(ng/ml)由y軸表示且XAB4之濃度表示在x軸上(0亦即對照、0.01 nM、0.1 nM、1 nM及10 nM)及10 nM同型。資料集左側係關於未經刺激之細胞，下一資料集係關於經TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)刺激之細胞，下一資料集係關於經IL-17A (50 ng/ml)刺激之細胞及最後一個資料集係關於經

TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞。如圖25B所示，XAB4(全部濃度)與同型相比不具有對於經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)刺激或經IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml)及IL-17A (50 ng/ml)協同刺激之細胞的拮抗效應。

總之，資料表明使用XAB4選擇性抑制IL-17A信號傳導衰減人類星形膠質細胞中促炎性細胞激素的含量。在疾病中，星形膠質細胞被認為在精神、神經及神經退化性病症範圍內發揮作用，其中其在神經炎症中之作用可能為重要的。由於XAB4經展示對星形膠質細胞之IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF及CCL2產生有影響，故XAB4可為有用的治療劑，諸如用於治療多發性硬化症(MS)。

### 序列資訊

為便於參考，關於XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之序列資料概述如下。

表1描述實例XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之全長重鏈及輕鏈的胺基酸序列(SEQ ID NO)。

抗體XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5可使用習知抗體重組產生及純化方法產生。舉例而言，將如表3或表4中所述之編碼序列選殖於生產載體中以便在哺乳動物生產細胞株中重組表現。

圖2概述XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之可變重鏈(VH)及輕鏈(VL)胺基酸序列，其可用於生成XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之嵌合抗體。

表5概述適用於生成替代CDR移植抗體之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之CDR序列(加共同序列)，其中該等XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之CDR區係根據Kabat定義來定義。

表6概述適用於生成替代CDR移植抗體之XAB1、XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之CDR序列(加共同序列)，其中該等XAB1、

XAB2、XAB3、XAB4及XAB5之CDR區係根據Chothia定義來定義。

在本說明書中所提及之所有序列(SEQ ID NO)見於表36。

### 序列表

適用於實踐本發明之胺基酸及核苷酸序列見於表36。

**表36.序列表**

抗體/ 片段	序列識別符 (SEQ ID NO:)	胺基酸序列或聚核苷酸序列(PN)
XAB1, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB1, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB1, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (CHOTHIA)	4	SQGIISA
XAB1, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB1, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB1, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB1, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKKG
XAB1, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (KABAT)	9	RPSQGIISALA
XAB1, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB1, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB1, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLVTVSS
XAB1, VL	13	AIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRPSQGIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
XAB1, 重鏈	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR

		EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB1, 輕鏈	15	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC TGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAA TAGTACCCCTCACTTCCAGGGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAA
PN 編 碼 SEQ ID NO: 13	17	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGCCAAGTCAGGGCATTATCAGTGCTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAACG TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTGGAAAATGGG GTCCCCTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAA TAGTACCCCTCACTTCCAGGGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAA
PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAAGCGGGCACAGCCGCCCTGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGCGGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCCTGGTGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG

		GGTGGGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCTCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCCAGCGACATGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGCCAGGCCAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGCCCCGG CAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 15	19	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGCCAAGTCAGGGCATTATCAGTGCTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAACG TCCTGATCTATGATGCCTCAGTTGGAAAATGGG GTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAA TAGTTACCCCTCACTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAACGTACGGTGGCCGCTCCAGC GTGTTCATCTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCGCTGCTGA ACAACCTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG GAAGGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTG AGCAAGGCCGACTACGGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCC CCGTGACCAAGAGCCTCAACAGGGCGAGTGC
XAB2, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB2, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB2, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (CHOTHIA)	20	SQVIISA
XAB2, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB2, CDRL3 (CHOTHIA)	21	FDSYPL
XAB2, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB2, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKKG
XAB2, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (KABAT)	22	RPSQVIISALA
XAB2, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ

XAB2, CDRL3 (KABAT)	24	QQFDSYPLT
XAB2, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLVTVSS
XAB2, VL	25	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRPSQVIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSVSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFDSYPLTFGGGTKEIK
XAB2, 重鏈	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB2, 輕鏈	26	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRPSQVIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSVSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFDSYPLTFGGGTKEIKRTV AAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCCGGCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 25	27	GCCATCCAGCTGACCCAGAGGCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGCCCAGCCAGGTATCATCATCAGCGCCCTG GCCTGGTATCAGCAGAACAGCCTGGCAAGGCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTCAGCGGCAGCGTGT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCC GCAGCCCGAGGAACCTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTCGACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCCGGCGA

		GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCC GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCAGCAGCTGC GTCCTGGAACAGCGGAGGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCAAGAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCTGGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGCGGCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCTCCGGAGG AGATGACCAAGAACCGAGGTGTC GGTGAAGGGCTTCTACCCCTGACG GGAGTGGGAGAGCAACGCCAGGCCAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTG GGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GCTGCAGCGTGATGC ACTACACCCAGAAGAGC CAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 26	28	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGCCCAGCCAGGT GCCTGGTATCAGCAGAACGC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCT AGGGCGTGC CCGGCACCGACT GCAGCCCGAGGACT CAGTCGACAGCT GCACCAAGGTGG CTCCCAGCGT GCAGCTGAAGAGCG GCAGCTGAAGAGCG GTGCAGTGG GGCAACAGCC AGCAAGGACT TGACCC GGTGTAC GTCCAG CGAGTGC
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGG GTGCAGCCTGGCG GCCGCTAGTGG TGAGCTGG GAGGTGCG GACAGGCC CTGGCAAGGG GAC

		TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 25	30	GCTATTCA GCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGTGATCATTAGCGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGGCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCTCTAGGTTAGCGGCTCAGTGTCAAGG CACCGACTTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCA GCA G TCGATAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGT GGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTATAGCTACTGGA TGAGCTGGT GCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCAAGTG TCTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTGGTTGTCTGGTGA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTGTGACTGTGCCTAGTTCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTCTGTTCTGTTCCCCCCCAGC AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGGCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCCTGACAGTGTGCTGCACCAAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCTGCCAGGCCGGAGGGAGATGAC CAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAAGCGATATGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAG ACCAACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG

替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 26	32	GCTATTCA GCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGTGATCATTAGCGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTAGGTTAGCGGCTCAGTGTCAAGG CACCGACTTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCA GAG TCGATAGTACCCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTCATCTCCCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGT GC
XAB3, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB3, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB3, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (CHOTHIA)	33	SQGIYWE
XAB3, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB3, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB3, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB3, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKKG
XAB3, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (KABAT)	34	RPSQGIYWELA
XAB3, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB3, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB3, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLVTVSS
XAB3, VL	35	AIQLTQSPSSL SASVGDRVTITCRPSQGIYWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
XAB3, 重鏈	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY

		WGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVE VHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB3, 輕鏈	36	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRPSQGIYWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDF LTSSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCAGGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 35	37	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCAC TGTCTGGCCCAGCCAGGGCATCTACTGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGG AGGGCGTGCAGGCCGGTTAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCT GCAGCCCGAGGAACCTCGCCACCTACTACTGCC CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCAGGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAAGCGGGCACAGCCCTGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGGCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGGCCGTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGC AGCAGCAGCCTGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCAAGAGAGCTGCGACAAGAC

		CCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCTCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCCAGCGACATGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCTGGG CAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 36	38	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGCCCAGCCAGGGCATCTACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAACGCCTGGCAAGGCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTCAGCGGAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCC GCAGCCCAGGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCC GTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCCTGAGCAAGGCCAGTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAAGGGCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGG CGAGTGC
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTACTGAGCTACTGGA TGAGCTGGTGGCAGAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGTGGCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCC GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT ACAGTGTCTTCT
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 35	39	GCTATTAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGCCAGGGAACTACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAACGCCGGCAAGGCCCTAAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG

		GC GTGCCCTAGGTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCCTGACCTCAGGAGGCAC TAAGGTGAAATCAAG
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTCACCTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGTGCACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGTGGCCAATTAAAGCAGGACGGCTC AGAGAAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTGGTTGTCTGGTGAAG GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAAGTGTGGGA GGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCA AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCCTGACAGTGTGCAACAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCAGGGCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGCCAGCCAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAAGTGTGGACAGCGACGGCAGC TTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCA GCGTGTGACAGGAGGCCCTGACAAACCACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 36	40	GCTATTCACTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGCCAGGGAACTACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTGTGGAACAGG GCGTGCCTCTAGGTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCCTGACCTCAGGAGGCAC TAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTCATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC

		TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
XAB4, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB4, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB4, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE
XAB4, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB4, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB4, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB4, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKKG
XAB4, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB4, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB4, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB4, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLTVVSS
XAB4, VL	43	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
XAB4, 重鏈	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQ SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB4, 輕鏈	44	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDFT

		LTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCCAGGGACCG GGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCC GCAGCCCGAGGAACCTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 43	45	GCCATCCAGCTGACCCAGAGGCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTCCCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGAACCTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCC GGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAAGCGGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCC GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCAGTGTACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTCCCCGCGCTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCTGGCCCCAGCAGCCAGAGCT GCTGGCGGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAGGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGACCAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGG CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCTCCCCCTCCGGGAGG

		AGATGACCAAGAACCGAGGTGTCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCGACGACATGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 44	46	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCAC TGTGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAACGCCTGGCAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCAGGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGAAGCTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTAAACAGGGG CGAGTGC
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGGGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTAGCTACTGGA TGAGCTGGTGCACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGT ACAGTGTCTTCT
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 43	47	GCTATTCACTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAACACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAACGCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCCAGTGTAGCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCA CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGGGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTAGCTACTGGA TGAGCTGGTGCACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC

		CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCCTGACAGTGTCCCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCGTGTAC AGCCTGAGCAGCGTGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCAGACAAGACCCACACC TGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAAACGCCAAGACCAAGGCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGTGCACTGACGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCTCAGCCGGAGGAGATGAC CAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAG ACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGC TTCTCCTGTACAGCAAGTGTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCA GCGTGTGACAGGAGGCCCTGACAAACCAACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
替代性PN編碼 SEQ ID NO: 44	48	GCTATTCACTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGATTAACACTGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGGCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTGTGGAACAGG GCGTGCCTCTAGGTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCA CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACCTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGC TGAACAACTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAGCACCCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAAGGGCCTGTCCA GCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGT GC
第二替代性PN編碼 SEQ ID NO: 12	49	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTGAGACTGTCTTGC CCGCCTCCGGCTTACCTCTCCAGCTACTGGAT GTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACT

		GGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCTC CGAGAAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCG GTTCACCATCTCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACACTCCCTGCAGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCAGGCCAGGGACCGG GGCTCCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTG GTGACAGTGTCCCTCC
第二替代性PN編碼SEQ ID NO: 43	50	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGT CTGCCTCCGTGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCGGCCCTCCCAGGGCATCAACTGGGAACGGC CTGGTATCAGCAGAAGGCCGGCAAGGGCCCCAA GCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAACAG GGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCG GCACCGACTTCACCCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TTCAACTCCTACCCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAAATCAAG
第二替代性PN編碼SEQ ID NO: 14	51	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGC CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACTGGAT GTCCTGGGTGCGACAGGGCCCTGGCAAGGGACT GGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCTC CGAGAAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCG GTTCACCATCTCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACACTCCCTGCAGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCAGGCCAGGGACCGG GGCTCCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTG GTGACAGTGTCCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCAA GCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCCCCGGCTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCCGAGCCGTGACCGTGTC CTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTCCCCCGCGTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCCAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCC ACACCTGCCCTGGCCAGCAGGCCAGCTGC TGGCGGACCCAGCGTGTCCCTGTTCCCCC GCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGAACCCCC GAGGTGACCTGTGTGGTGACGTGCCCCAC GAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCC AACAAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGAGGCC AGGTGTACACCCTGCCACCCAGCAGGGAGGAGA TGACCAAGAACCGAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGT GAAGGGCTTCTACCCAAAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCAGAACA CAAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGG CAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGAC AAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCAGGCAA

		G
第二替代性PN編碼SEQ ID NO: 44	52	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGT CTGCCTCCGTGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCGGCCCTCCAGGGCATCAACTGGGAAGTGGC CTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAA GCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAACAG GGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCG GCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TTCAACTCCTACCCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTC CCAGCGTGTTCATCTCCCCCAAGCGACGAGCA GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTCT GCTGAACAACTTCTACCCCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAGCACCCTGA CCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGG TGTACGCCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTCAACAGGGCGA GTGC
XAB5, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB5, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB5, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE
XAB5, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB5, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB5, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB5, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKKG
XAB5, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB5, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB5, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB5, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLVTVSS
XAB5, VL	53	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
XAB5, 重鏈	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI

		SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYW WGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPALQSS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPK DTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVFKFNWYVDGVE VHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB5, 輕鏈	54	AIQLTQSPSSLASVGDRVITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGGGACCTG GTGCAGCCTGGCGGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCCAGGGCC GGACACCGCCGTGTACTACTGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCC GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 53	55	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAACGCCTGGCAAGGCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAA ACGGCGTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCC GCAGCCCCGAGGAACCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGGACCTG GTGCAGCCTGGCGGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGG TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCCAGGGCC GGACACCGCCGTGTACTACTGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGCCAGGGCACCC GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAAGCGGGCACAGCCGCCCTGGCTGCC GGTGAAGGACTACTCCCCGAGGCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA

		CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCCC AAGCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCACCAAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCAGCCCCCTCCGGAGG AGATGACCAAGAACCGAGGTGTCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCCAGCGACATGCCGT GGAGTGGAGAGCAACGCCAGCCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGG CAAG
PN 編 碼 SEQ ID NO: 54	56	GCCATCCAGCTGACCCAGAGGCCAGCGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAACGCTGGCAAGGCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAA ACGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCC GCAGCCCAGGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCC GTGCAGTGGAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCGAGCACCC TGACCCCTGAGCAAGGCCAGTACGAGAGCATAA GGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGC GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCCACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCAATATTAAGCAGGACGCC AGAGAAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCC GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCAG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGT ACAGTGTCTT
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 53	57	GCTATTCAAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAACCTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGGCCGGCAAGGCCCTAAG

		CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAAAACG GCGTGCCTCTAGGTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCCTGACCTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGAAATCAAG
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTCACCTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGTTGTCTGGTGA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCGTAC AGCCTGAGCAGCGTGTGACTGTGCCTAGTTCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAAGTGCTGG GGACCCAGCGTGTCTGTTCCAGGACCTGG AGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG GTCCCGTCTGACAGTGCTGCACCAAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCAGGGAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA GGCTTCTACCCCAAGCGATATGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTACAAG ACCACCCCCCAAGTGCCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGACAAACCAACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 54	58	GCTATTCACTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTCTGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGGCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAAAACG GCGTGCCTCTAGGTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTCACCCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCCTGACCTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTCATCTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGC

		TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCGTGACCAAGAGCTAACAGGGCGAGT GC
重鏈之前導序列	59	MEFGLSWVFLVAILEGVHC
輕鏈之前導序列	60	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 59	61	ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGGTGTTCCCTGGTCG CGATTCTGGAAGGCGTGCAGTC
PN 編 碼 SEQ ID NO: 60	62	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGG CTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGCGCCAGATGT
重鏈之替代性前導序列	63	MAWWWTLPFLMAAAQSVQA
輕鏈之替代性前導序列	64	MSVLTQVLALLLWL TGTRC
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 63	65	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCCCTCCTGATGG CCGCTGCTCAGTCAGTGCAGGCC
替代性 PN 編 碼 SEQ ID NO: 64	66	ATGAGCGTGCTGACTCAGGTGCTGGCCCTGCTGC TGCTGTGGCTGACCGGGCACCCGCTGC
重鏈之第二替代性前導序列	67	MEWSWVFLFFLSVTGVHS
輕鏈之第二替代性前導序列	68	MSVPTQVLGLLLWLTDARC
第二替代性PN編碼SEQ ID NO: 67	69	ATGGAATGGCCTGGGTGTTCCCTGTTCTCCTGTC CGTGACCACAGGCGTGCACTCC
第二替代性PN編碼SEQ ID NO: 68	70	ATGTCGCGCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTG CTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGC
共同 , CDRL1 (CHOTHIA)	71	SQX <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
共同 , CDRL3 (CHOTHIA)	72	FX <sub>1</sub> SYPL
共同 , CDRL1 (KABAT)	73	RPSQX <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> LA
共同 , CDRL2 (KABAT)	74	DASSLEX <sub>1</sub>
共同 , CDRL3 (KABAT)	75	QQFX <sub>1</sub> SYPLT
huIL-17A	76	GITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTN PKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCP NSFRLEKILSVGCTCVTPIVHHVAEFRH
huIL-17F	77	MRKIPKVGHFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINEN QRVMSMRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQ AQCRNLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQ GCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ

替代性huIL-17A	78	GPIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
cynoIL-17A	79	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTSTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
cynoIL-17F	80	MRKIPKVGHFFFQKPESCPPPEGSMKLDTGIINENQRVSMRSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCKHLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVLRRKHQGCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVVHHQ
rhesusIL-17A	81	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTSTS PKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
marmosetIL-17A	82	SPQNPQCPNAEDKNFPRTVMVNLNIRNRNTNSKRA SDYYNRSSSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVDADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHCTNSFRLEKMLVSVGCTCVTPIVHHVA
mIL-17A	83	MAAIIPQSSACPNTAEAKDFLQNVKVNLFNSLGAKVSSRRPSDYLNRSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVLIQQEILVLKREPESCPFTFRVEKMLVGVGCTCVASIVRQAA
mIL-17F	84	APEPEFRHRKNPKAGVPALQKAGNCPPLEDNTVRVDIRIFNQNQGISVPREFQRSSSPWDYNITRDPHRFPSEIAEAQCRHSGCINAQGQEDSTMNSVAIQQEILVLRREPQGCSNSFRLEKMLLKVGCTCVKPIVHQAA
ratIL-17A	85	MAVLIPQSSVCPNAEANNFLQNVKVNLFNSLSSKASSRRPSDYLNRSTSPWTLRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVLIQQEILVLKREPEKCPFTFRVEKMLVGVGCTCVSSIVRHAS
huIL-17RA	86	NCTVKNSTCLDDSWIHPRLTPSSPKDLQIQLHFAHTQQGDLFPVAHIEWTLQTDASILYLEGAELSVLQLNTNERLCVRFELSKLRHHHRRWRFTFSHFVVDPDQEYEVTVHHLPKPIPQDPNQSKNFLVPDCEHARMKVTPCMSSGSLWDPNITVETLEAHQLRVSFTLWNESTHYQILLTSFPHMENHSCFEHMHHIPAPRPEEFHQRSNVTTLRNLKGCCRHQVQIQPFFSSCLNDCLRHSATVSCPEMPDTPEPIPQDYMPLWEFRHDGGGLNDIFEAQKIEWHE

### 【符號說明】

無

## 【補充序列表】

<110> 瑞士商諾華公司

<120> 抗-IL-17A 抗體及其於治療自體免疫及發炎病症之用途

<130> PAT055329

<140> 103104172

<141> 2014-02-07

<150> US 61/762406

<151> 2013-02-08

<160> 86

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Lys Gln Asp Gly Ser Glu  
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Tyr  
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala  
1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Asp Ala Ser  
1

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Ser Tyr Trp Met Ser  
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 9  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 9

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 10

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 11

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 12  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 12

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

<210> 14

<211> 446

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu  
180 185 190

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

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420

425

430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 15  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 15

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

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

165

170

175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 16  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 16  
 gaggtgcagc tggtcgagtc tggcgccgac ctgggtgcagc ctggcgccag cctgagactg 60  
 agctgcgccg ccagcggctt caccctcagc agctactgga tgtcctgggt ccgccaggcc 120  
 cctggcaaag gcctcgaatg ggtggccaac atcaagcagg acggcagcga gaagtactac 180  
 gtggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccggaca acgccaagaa cagcctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgctg 300  
 ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgtccagc 348  
 ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgtccagc

<210> 17  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 17  
 gccatccagt tgacccagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtacc 60  
 atcacttgcc ggccaagtca gggcattatc agtgcttag cctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaaatgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggtatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttgc caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac tttcgccgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 18  
 <211> 1338

<212> DNA  
 <213> 智人

<400> 18  
 gaggtgcagc tggtcgagtc tggcgccgac ctgggtgcagc ctggcgccag cctgagactg 60  
 agctgcgccc ccagcggctt caccctcagc agctactgga tgtcctgggt ccgccaggcc  
 cctggcaaag gcctcgaatg gttggccaac atcaagcagg acggcagcga gaagtactac 120  
 gtggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac  
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg  
 ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccc tgtccagcgc tagcaccaag 180  
 ggccccagcg tttccccctt ggccccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc  
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gagcccgta ccgtgtcctg gaacagcgg 240  
 gcccgtaccc ccggcgtgca caccctcccc gccgtgtgc agagcagcgg cctgtacagc  
 ctgtccagcg tggtgacagt gcccagcagc agcctggca cccagaccta catctgcaac  
 gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggta gacaagagag tggagccaa gagctgcgc 300  
 aagacccaca cctgcccccc ctggccagcc ccagagctgc tggcggacc ctccgtgttc  
 ctgttcccccc ccaagccaa ggacaccctg atgatcagca ggaccccccga ggtgacctgc  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc  
 gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg  
 gtggtgccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 360  
 aaggcttcca acaaggccctt gccagcccccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaaggc  
 cagccacggg agccccaggt gtacaccctg ccccccctccc gggaggagat gaccaagaac  
 caggtgtccc tgaccgtct ggtgaaggc ttcttacccca gcgacatcgc cgtggagtgg  
 gagagcaacg gccagccgaa gaccaactac aagaccaccc ccccaagtgc ggacagcgc 420  
 ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac  
 gtgtttagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacccca gaagagcctg  
 agcctgtccc ccggcaag 480  
 540  
 600  
 660  
 720  
 780  
 840  
 900  
 960  
 1020  
 1080  
 1140  
 1200  
 1260  
 1320  
 1388

<210> 19  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 19  
 gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc ggccaagtca gggcattatac agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tgaaaaatgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggtac tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatttg caacttatta ctgtcaacag ttaatagtt accctctcac ttcggcgg 300  
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgccc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
 ccccgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala  
1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Phe Asp Ser Tyr Pro Leu  
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Arg Pro Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 24

Gln Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 25  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 25

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

<210> 26  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 26

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 27  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 27  
 gccatccagc tgacccagag cccagcagc ctgagcgcc a c g t g g g c g a c a g a t g a c c 60  
 a t c a c c t g t c g g c c a g c c a g g t c a t c a t c a g c g c c t g g c t g g t a t c a 120  
 g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c a c g a c g c a g c t c c t g g a a c a g g g c g t g c c a g c g 180  
 c g g t t c a g c g g c a g c t g t c c g g c a c c g a c t t c a c c t g a c c a g c t c c t g c a g c c c 240  
 g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c a g c a g t a c c c c t g a c c t g a c c t g g c g g a 300  
 g g c a c c a a g g t g g a a t c a a g g 321

<210> 28  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 28  
 gccatccagc tgacccagag cccagcagc ctgagcgcc a c g t g g g c g a c a g a t g a c c 60  
 a t c a c c t g t c g g c c a g c c a g g t c a t c a t c a g c g c c t g g c t g g t a t c a 120  
 g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c a c g a c g c a g c t c c t g g a a c a g g g c g t g c c a g c g 180  
 c g g t t c a g c g g c a g c t g t c c g g c a c c g a c t t c a c c t g a c c a g c t c c t g c a g c c c 240  
 g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c a g c a g t a c c c c t g a c c t g a c c t g g c g g a 300  
 g g c a c c a a g g t g g a a t c a a g c g t a c g g t g g c g c t c c a g c t g t t c a t c t t c c c c c c c c 360  
 a g c g a c g a g c a g c t g a a g a g c g g c a c c g g c c a g c g t g g t g t g c t g c t g a a c a c t t c t a c 420  
 c c c c g g g a g g c c a a g g t g c a g t g g a a g g t g g a a c a c g c c c t g c a g a g c g g a a c a c a g c c a g 480  
 g a g a g c g t c a c c g a g g a a g g a c a g g a c t c c a c c t a c a g c c t g a g c a g c a c c c t g a c c 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac agggcgagt gc 642

<210> 29  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 29  
 gaggtgcagc tggtggaatc aggaggcgac ctgggtgcagc ctggcggctc actgagactg 60  
 agctgcgccc ctagtggctt cacctttagt agctactgga tgagctgggt gcgcacaggcc 120  
 cctggcaagg gactggagtg ggtggccaat attaagcagg acggctcaga gaagtactac 180  
 gtggactcag tgaaggccc gttcactatt agccggata acgctaagaa tagcctgtac 240  
 ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgcccgtgt actactgcgc tagagataga 300  
 ggctcactgt actactgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcttct 348

<210> 30  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 30  
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact 60  
 atcacctgta gaccttagtca ggtgatcatt agcgcctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtccctct 180  
 aggttagcg gctcagtgtc aggacccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttcgatagct accccctgac cttcggcggga 300  
 ggcactaagg tggaaatcaa g 321

<210> 31  
 <211> 1338  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 31  
 gaggtgcagc tggtggaatc aggaggcgac ctgggtgcagc ctggcggctc actgagactg 60  
 agctgcgccc ctagtggctt cacctttagt agctactgga tgagctgggt gcgcacaggcc 120  
 cctggcaagg gactggagtg ggtggccaat attaagcagg acggctcaga gaagtactac 180

gtggactcg	tgaaggccg	gttactatt	agccggata	acgctaagaa	tagcctgtac	240
ctgcagatga	atagcctgag	agccgaggac	accgcgtgt	actactgcgc	tagagataga	300
ggctcactgt	actactgggg	ccagggcacc	ctggtgacag	tgtcttctgc	tagcaccaag	360
ggcccaagtg	tcttccct	ggcccccagc	agcaagtcca	caagcggagg	cactcagct	420
ctgggttgc	tggtaagga	ctacttcccc	gagccgtga	cagtgtcctg	gaacagcgg	480
gccctgacct	ccggcgtgca	cacccccc	gccgtgctgc	agagcagcgg	cctgtacagc	540
ctgagcagcg	tcgtgactgt	gcctagttcc	agcctggca	cccagaccta	tatctgcaac	600
gtgaaccaca	agcccagcaa	caccaaggtg	gacaagagag	tggagccaa	gagctgcgac	660
aagacccaca	cctgcccccc	ctgcccagct	ccagaactgc	tgggaggacc	cagcgtgttc	720
ctgttccccc	ccaagccaa	ggacaccctg	atgatcagca	ggaccccccga	ggtgacactgc	780
gtggtggtgg	acgtgtccca	cgaggacca	gaggtgaagt	tcaactggta	cgtggacggg	840
gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	agagaggagc	agtacaacag	cacctacagg	900
gtggtgtccg	tcctgacagt	gctgcaccag	gattggctga	acggcaaaga	atacaagtgc	960
aaagtctcca	acaaggccct	gccagcccc	atcgaaaaga	caatcagcaa	ggccaagggc	1020
cagccacggg	agccccaggt	gtacaccctg	ccccccagcc	gggaggagat	gaccaagaac	1080
cagggtgtccc	tgacctgtct	ggtgaaggc	ttctacccca	gcgatatcgc	cgtggagtgg	1140
gagagcaacg	gccagccga	gaacaactac	aagaccaccc	ccccagtgc	ggacagcgcac	1200
ggcagcttct	tcctgtacag	caagctgacc	gtggacaagt	ccaggtggca	gcagggcaac	1260
gtgttcagct	gcagcgtgat	gcacgaggcc	ctgcacaacc	actacacccca	gaagtcctg	1320
agcctgagcc	ccggcaag					1338

<210> 32  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 32	gctattcagc	tgactcagtc	acctagtagc	ctgagcgcta	gtgtggcga	tagagtact	60
	atcacctgta	gacctagtc	ggtgatcatt	agcgcctgg	cctggtatca	gcagaagccc	120
	ggcaaggccc	ctaagctgct	gatctacgac	gctagtagtc	tgaaacaggg	cgtccctct	180
	aggtagtgc	gctcagtgac	aggcaccgac	ttcaccctga	ctattagtag	cctgcagccc	240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttcgatagct accccctgac cttcgccgga 300  
 ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgccc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
 ccccgaggagg ccaaggtgca gtgaaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacccata gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 33

Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu  
 1 5

<210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 34

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu Leu Ala  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 35

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

<210> 36  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 37

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 37

gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatctac tggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggAACAGGG cgtgccccc 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcacccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttgc ccacctaacta ctggcagcag ttcaacagct acccccgtgac cttcgccgga 300

ggcaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 38

<211> 642

<212> DNA

<213> 智人

<400> 38

gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatctac tggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggAACAGGG cgtccccagc	180
cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttccaccctga ccatcagctc cctgcagccc	240
gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
ggcaccaagg tggAAATCAA gcgtacggtg gccgctccc gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgac agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaagggtgca gtggagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgagggtgac ccaccaggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642

<210> 39  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 39	
gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
atcacctgta gacctagcca gggaaatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggAACAGGG cgtccccctct	180
aggtttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttccaccctga ctattagtag cctgcagccc	240
gaggacttgc ctacctacta ctgccagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
ggcactaagg tggAAATCAA g	321

<210> 40  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 40	
gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
atcacctgta gacctagcca gggaaatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggAACAGGG cgtccccctct	180
aggtttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttccaccctga ctattagtag cctgcagccc	240
gaggacttgc ctacctacta ctgccagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
ggcactaagg tggAAATCAA gcgtacggtg gccgctccc gcgtgttcat cttccccccc	360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
 ccccccggagg ccaagggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 41

Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu  
 1 5

<210> 42  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 42

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu Leu Ala  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人

<400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu  
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 45

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 45

gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggAACAGGG cgtgcccagc 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcgccgga 300

ggcaccaagg tggAAATCAA g 321

<210> 46

<211> 642

<212> DNA

<213> 智人

<400> 46

gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggAACAGGG cgtgcccagc 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcgccgga 300  
 ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgccc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
 ccccgagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac agggcgagt gc 642

<210> 47  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 47  
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact 60  
 atcacctgta gacctagtc ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tgaaacaggg cgtccctct 180  
 aggttagcg gtcaggctc aggaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttttaactcct accccctgac cttcgccgga 300  
 ggcactaagg tggaaatcaa g 321

<210> 48  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 48  
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact 60  
 atcacctgta gacctagtc ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tgaaacaggg cgtccctct 180  
 aggttagcg gtcaggctc aggaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttttaactcct accccctgac cttcgccgga 300  
 ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgccc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
 ccccgagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacccata gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgagggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 49  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 49  
 gaggtgcagc tggtggaatc tggcgccgac ctgggtgcagc ctggcggtc tctgagactg 60  
 tcttgcgccc cctccggctt caccctctcc agctactgga tgtcctgggt gcgacaggcc 120  
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaaggcagg acggctccga gaagtactac 180  
 gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgccaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgcccgtgt actactgcgc cagggaccgg 300  
 ggctccctgt actattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcctcc 348

<210> 50  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 50  
 gccatccagc tgacccagtc cccctccagc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60  
 atcacctgtc ggccctccca gggcatcaac tggaaactgg cctggtatca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggAACAGGG cgtccctcc 180  
 agattctccg gctctggctc cggcaccgac ttccacctga ccatctccag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcag ttcaactcct accccctgac cttcggcgga 300  
 ggcaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 51  
 <211> 1338  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 51  
 gaggtgcagc tggtggaatc tggcgccgac ctgggtgcagc ctggcggtc tctgagactg 60  
 tcttgcgccc cctccggctt caccctctcc agctactgga tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg	gactggaatg	ggtggccaac	atcaagcagg	acggctccga	gaagtactac	180
gtggactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgggaca	acgccaagaa	ctccctgtac	240
ctgcagatga	actccctgcg	ggccgaggac	accgcccgt	actactgcgc	cagggaccgg	300
ggctccctgt	actattgggg	ccagggcacc	ctggtgacag	tgtcctccgc	ctccaccaag	360
ggcccaagcg	tgttccccct	ggcccccagc	agcaagagca	ccagcggcgg	cacagccgccc	420
ctgggctgcc	tggtgaaagga	ctacttcccc	gagcccgta	ccgtgtcctg	gaacagcgg	480
gccctgacct	ccggcgtgca	cacccctcccc	gccgtgctgc	agagcagcgg	cctgtacagc	540
ctgagcagcg	tggtgaccgt	gcccagcagc	agcctggca	cccagaccta	catctgtAAC	600
gtgaaccaca	agcccagcaa	caccaaggtg	gacaagagag	tggagcccaa	gagctgtgac	660
aagacccaca	cctgcccccc	ctgcccagcc	cccagactgc	tggcggacc	cagcgtgttc	720
ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	atgatcagca	gaaccccccga	gtgacactgt	780
gtggtggtgg	acgtgtccca	cgaggaccca	gaggtgaagt	tcaactggta	cgtggacggc	840
gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	agagaggagc	agtacaacag	cacccacagg	900
gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgt	960
aagggtgtcca	acaaggccct	gccagcccc	atcgaaaaga	ccatcagcaa	ggccaagggc	1020
cagccaaagag	agcccccaggt	gtacaccctg	ccacccagca	gggaggagat	gaccaagaac	1080
caggtgtccc	tgacctgtct	ggtgaagggc	ttctacccaa	gcgacatcgc	cgtggagtgg	1140
gagagcaacg	gccagcccc	gaacaactac	aagaccaccc	ccccagtgct	ggacagcgcac	1200
ggcagcttct	tcctgtacag	caagctgacc	gtggacaaga	gcagatggca	gcagggcaac	1260
gtgttcagct	gctccgtat	gcacgaggcc	ctgcacaacc	actacacccca	gaagagcctg	1320
agcctgtccc	caggcaag					1338

<210> 52  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 52	gccatccagc	tgacccagtc	cccctccagc	ctgtctgcct	ccgtgggcga	cagagtgacc	60
	atcacctgtc	ggccctccca	gggcataaac	tgggaactgg	cctggtatca	gcagaagccc	120
	ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctacgac	gccagctccc	tggaacaggg	cgtgccctcc	180

agattctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaactcct accccctgac cttcgccgga	300
ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccc gcgtgttcat cttccccca	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgccc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac	420
cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccaggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagttcaac aggggcgagt gc	642

<210> 53  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
  
 <400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu  
 20                   25                   30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50                   55                   60

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

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

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

<210> 54  
 <211> 214

<212> PRT  
 <213> 智人

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 55  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 55  
gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgaa cagagtgacc 60  
atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120  
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaaaacgg cgtgcccagc 180  
cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttccacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcgccgga 300  
ggcaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 56  
<211> 642  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 56  
gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgaa cagagtgacc 60  
atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120  
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaaaacgg cgtgcccagc 180  
cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttccacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcgccgga 300  
ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgac agcgtgggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
ccccgggagg ccaagggtgca gtggaaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540  
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc 600  
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac agggggcgagt gc 642

<210> 57

<211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 57  
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtggcgta tagagtgact 60  
 atcacctgta gacctagtc gggattaaac tggagctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tgaaaacgg cgtccctct 180  
 aggttagcg gctcaggctc aggacccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttactcct accccctgac cttcgccgga 300  
 ggcactaagg tggaaatcaa g 321

<210> 58  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 58  
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtggcgta tagagtgact 60  
 atcacctgta gacctagtc gggattaaac tggagctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tgaaaacgg cgtccctct 180  
 aggttagcg gctcaggctc aggacccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttactcct accccctgac cttcgccgga 300  
 ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
 agcgtacggc agctgaagag cggcaccgccc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420  
 ccccgagg ccaagggtgca gtggaaaggta gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacccata gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgagggtgac ccaccaggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagttcaac agggcgagtg 642

<210> 59  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重鏈之前導序列

<400> 59

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Val His Cys

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈之前導序列

<400> 60

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys  
20

<210> 61

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈之前導序列之編碼序列

<400> 61

atggaatttcg gcctgagctg ggtgttcctg gtgcgcattc tggaaggcgt gcactgc 57

<210> 62

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈之前導序列之編碼序列

<400> 62

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggcgcc 60

agatgt

66

<210> 63

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重鏈之替代性前導序列

<400> 63

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
 1 5 10 15

Val Gln Ala

<210> 64  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 輕鏈之替代性前導序列

<400> 64

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys  
 20

<210> 65  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重鏈之替代性前導序列之編碼序列

<400> 65

atggcctggg tgtggaccct gcccttcctg atggccgctg ctcagtcagt gcaggcc 57

<210> 66  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 輕鏈之替代性前導序列之編碼序列

<400> 66  
 atgagcgtgc tgactcaggt gctggccctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccggctgc 60

<210> 67  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重鏈之第二替代性前導序列

<400> 67

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 68  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 輕鏈之第二替代性前導序列

<400> 68

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys  
 20

<210> 69  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重鏈之第二替代性前導序列之編碼序列

<400> 69  
 atggaatggc cctgggtgtt cctgttcttc ctgtccgtga ccacaggcgt gcactcc 57

<210> 70  
 <211> 60

<212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 輕鏈之第二替代性前導序列之編碼序列

<400> 70  
 atgtccgtgc ccacacaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60

<210> 71  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 可變

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (5)..(7)  
 <223> 可變

<400> 71

Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 72  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 可變

<400> 72

Phe Xaa Ser Tyr Pro Leu  
 1 5

<210> 73  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 可變

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (7)..(9)  
 <223> 可變

<400> 73

Arg Pro Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala  
1 5 10

<210> 74  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 可變

<400> 74

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Xaa  
1 5

<210> 75  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 可變

<400> 75

Gln Gln Phe Xaa Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 76  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 76

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys  
1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn  
20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr  
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser  
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp  
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile  
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu  
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val  
115 120 125

His His Val Ala Glu Phe Arg His  
130 135

<210> 77

<211> 134

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu  
1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile  
20 25 30

Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg

35

40

45

Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr  
 50 55 60

Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln  
 85 90 95

Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe  
 100 105 110

Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro  
 115 120 125

Val Ile His His Val Gln  
 130

<210> 78  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 78

Gly Pro Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys  
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu  
 20 25 30

Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp  
 35 40 45

Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp  
 50 55 60

Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu  
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val

85

90

95

Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys  
 100 105 110

Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr  
 115 120 125

Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala  
 130 135

<210> 79  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> 食蟹獼猴

<400> 79

Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys  
 1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn  
 20 25 30

Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr  
 35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser  
 50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp  
 65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile  
 85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu  
 100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val  
 115 120 125

His His Val Ala

130

<210> 80  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> 食蟹獼猴

<400> 80

Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu  
 1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Val Pro Glu Gly Ser Met Lys Leu Asp Thr Gly Ile  
 20 25 30

Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg  
 35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr  
 50 55 60

Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Lys His Leu Gly Cys Ile Asn  
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln  
 85 90 95

Glu Thr Leu Val Leu Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe  
 100 105 110

Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro  
 115 120 125

Val Val His His Val Gln  
 130

<210> 81  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> 恒河獼猴

<400> 81

Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys  
 1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn  
20 25 30

Thr Ser Thr Ser Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr  
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser  
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp  
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile  
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu  
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val  
115 120 125

His His Val Ala  
130

<210> 82  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 猿猴

<400> 82

Ser Pro Gln Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ala Glu Asp Lys Asn Phe Pro  
1 5 10 15

Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile Arg Asn Arg Asn Thr Asn Ser  
20 25 30

Lys Arg Ala Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Ser Ser Pro Trp Asn Leu  
35 40 45

His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala  
50 55 60

Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Asp Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr  
65 70 75 80

His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg  
85 90 95

Glu Pro Arg His Cys Thr Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Val  
100 105 110

Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala  
115 120 125

<210> 83

<211> 134

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 83

Met Ala Ala Ile Ile Pro Gln Ser Ser Ala Cys Pro Asn Thr Glu Ala  
1 5 10 15

Lys Asp Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Phe Asn Ser  
20 25 30

Leu Gly Ala Lys Val Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg  
35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr  
50 55 60

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn  
65 70 75 80

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln  
85 90 95

Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Cys Pro Phe Thr Phe  
100 105 110

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ala Ser  
115 120 125

Ile Val Arg Gln Ala Ala  
130

<210> 84  
<211> 141  
<212> PRT  
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 84

Ala Pro Glu Pro Glu Phe Arg His Arg Lys Asn Pro Lys Ala Gly Val  
1 5 10 15

Pro Ala Leu Gln Lys Ala Gly Asn Cys Pro Pro Leu Glu Asp Asn Thr  
20 25 30

Val Arg Val Asp Ile Arg Ile Phe Asn Gln Asn Gln Gly Ile Ser Val  
35 40 45

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

Thr Arg Asp Pro His Arg Phe Pro Ser Glu Ile Ala Glu Ala Gln Cys  
65 70 75 80

Arg His Ser Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Gln Glu Asp Ser Thr Met  
85 90 95

Asn Ser Val Ala Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro  
100 105 110

Gln Gly Cys Ser Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Leu Lys Val  
115 120 125

Gly Cys Thr Cys Val Lys Pro Ile Val His Gln Ala Ala  
130 135 140

<210> 85  
<211> 134  
<212> PRT  
<213> 溝鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 85

Met Ala Val Leu Ile Pro Gln Ser Ser Val Cys Pro Asn Ala Glu Ala  
 1 5 10 15

Asn Asn Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Ile Asn Ser  
 20 25 30

Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg  
 35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu Ser Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr  
 50 55 60

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn  
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln  
 85 90 95

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

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ser Ser  
 115 120 125

Ile Val Arg His Ala Ser  
 130

<210> 86  
 <211> 295  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 86

Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His  
 1 5 10 15

Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu  
 20 25 30

His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile  
 35 40 45

Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala  
50 55 60

Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg  
65 70 75 80

Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His Arg Arg Trp Arg Phe  
85 90 95

Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr  
100 105 110

Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln  
115 120 125

Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val  
130 135 140

Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr  
145 150 155 160

Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp  
165 170 175

Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met  
180 185 190

Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg  
195 200 205

Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn  
210 215 220

Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser  
225 230 235 240

Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro  
245 250 255

Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp  
260 265 270

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala  
275 280 285

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu  
290 295

## 申請專利範圍

1. 一種經分離之抗體或包含其抗原結合部分之蛋白質，其包含重鏈可變區( $V_H$ )及輕鏈可變區( $V_L$ )，其中：
  - a) 該  $V_H$  包含依序為 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 及 SEQ ID NO: 3 之三個CDR，其，及
  - b) 該  $V_L$  包含依序為 SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 23 及 SEQ ID NO: 11 之三個CDR，  
且其中該抗體或蛋白質特異性結合於均二聚體IL-17A及雜二聚體IL-17AF，但不特異性結合於均二聚體IL-17F。
2. 如請求項1之經分離之抗體或蛋白質，其中該IL-17A、IL-17AF或IL-17F係選自食蟹獼猴、恆河獼猴、狨猴、大鼠、小鼠或人類中之一或多者。
3. 如請求項1或2之經分離之抗體或蛋白質，其包含以下  $V_H$  肽氨基酸序列：
  - a) SEQ ID NO: 12，及  
以下  $V_L$  肽氨基酸序列：
    - b) SEQ ID NO: 43。
4. 如請求項1或2之經分離之抗體或蛋白質，其包含以下  $V_H$  肽氨基酸序列：
  - a) SEQ ID NO: 14，及  
以下  $V_L$  肽氨基酸序列：
    - b) SEQ ID NO: 44。
5. 一種經分離之抗體或蛋白質，其結合於與如請求項1至4中任一項之經分離之抗體或蛋白質相同的抗原決定基。
6. 如請求項5之經分離之抗體或蛋白質，其結合於包含 Arg78、

Glu80及Trp90之IL-17A抗原決定基。

7. 如請求項6之經分離之抗體或蛋白質，其中該抗原決定基另外包含Tyr85或Arg124中之任一或多者。
8. 一種經分離之抗體或蛋白質，其包含具有與如請求項1至7中任一項所定義之抗體或蛋白質等效的抗原決定基識別特徵的抗原識別表面。
9. 一種經分離之抗體或蛋白質，其與IL-17A或IL-17AF之結合受到如請求項1至8中任一項所定義之抗體中之至少一者交叉阻斷。
10. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其中該抗體或蛋白質不特異性結合於：
  - a)人類IL-17F均二聚體、IL-17B均二聚體、IL-17C均二聚體、IL-17D均二聚體、IL-17E均二聚體中之任一或多者，及/或
  - b)食蟹獮猴IL-17F均二聚體、小鼠IL-17F均二聚體中之任一或多者，及/或
  - c)選自由IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、gIFN、TNF  $\alpha$ 、EGF、GMCSF、TGF  $\beta$ 2組成之群之其他人類細胞激素中之任一或多者，及/或
  - d)選自由IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL18、IL23、IFN或TNF組成之群之其他小鼠細胞激素中之任一或多者。
11. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其中結合於IL-17A
  - a)抑制或阻斷IL-17A與其受體之間的結合，及
  - b)降低或中和IL-17A活性。
12. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其中如由Biacore<sup>TM</sup>所量測，對人類IL-17A之結合親和力小於200 pM或100 pM。

13. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其能夠在較佳使用所培養之軟骨細胞或纖維母細胞活體外評估時抑制IL-6分泌或GRO- $\alpha$ 分泌。
14. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其能夠在抗原誘發之關節炎之活體內實驗模型中抑制膝蓋腫脹。
15. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其係與另一活性部分結合。
16. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其為單株抗體或其抗原結合部分，較佳為嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體或其部分。
17. 如請求項1、2及5至9中任一項之經分離之抗體或蛋白質，其適用於治療由IL-17A介導或可藉由抑制IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌而得到治療之病理性病症。
18. 如請求項17之經分離之抗體或蛋白質，其適用於治療發炎病症或病狀。
19. 如請求項18之經分離之抗體或蛋白質，其適用於治療關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬、慢性阻塞性肺病、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、哮喘、多發性硬化症或囊腫性纖維化。
20. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗體或蛋白質與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑之組合。
21. 如請求項20之醫藥組合物，另外包含一或多種額外活性成分。
22. 一種如請求項1至16中任一項之抗體或蛋白質之用途，其係用於製造適用於治療由IL-17A介導或可藉由抑制IL-6或GRO- $\alpha$ 分泌而得到治療之病理性病症的藥劑。
23. 如請求項22之用途，其中該病理性病症為發炎病症或病狀。

24. 如請求項23之用途，其中該發炎病症或病狀為關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬、慢性阻塞性肺病、全身性紅斑狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、哮喘、多發性硬化症或囊腫性纖維化。
25. 一種經分離之核酸分子，編碼如請求項1至16中任一項所定義之抗體或蛋白質中之任一者。
26. 如請求項25之經分離之核酸分子，其中該核酸分子為信使RNA(mRNA)。
27. 一種包含一或多個如請求項25之核酸序列的選殖或表現載體，其中該載體適於重組產生如請求項1至16中任一項所定義之經分離之抗體或蛋白質。
28. 一種宿主細胞，包含一或多個如請求項27之選殖或表現載體。
29. 一種用於產生如請求項1至16中任一項之經分離之抗體或蛋白質的方法，包含培養如請求項28之宿主細胞，純化及回收該抗體或蛋白質。