



(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 I495643 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：102121200

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 14 日

(51)Int. Cl. : C07K16/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/15 美國

61/660,232

(71)申請人：輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：艾波葛 詹姆士 瑞森納 APGAR, JAMES REASONER (US)；麥德 米歇爾 馬力 MADER, MICHELLE MARIE (US)；派瑞斯 凱文 迪洛斯 PARRIS, KEVIN DELOS (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2004/037861A2

WO 2007/024535A2

WO 2009/058346A1

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：61 項 圖式數：12 共 133 頁

(54)名稱

經改良之對抗 G D F - 8 的拮抗劑抗體及其用途

IMPROVED ANTAGONIST ANTIBODIES AGAINST GDF-8 AND USES THEREFOR

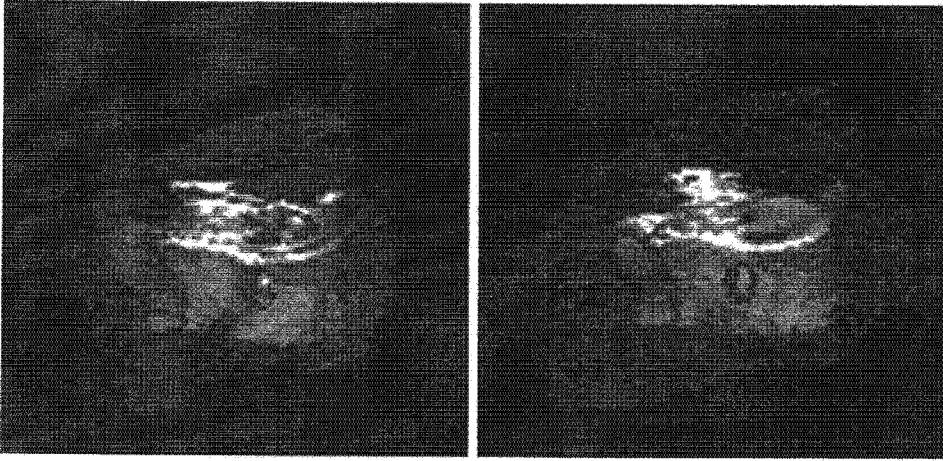
(57)摘要

本發明提供經改良之中和性抗 GDF-8 抗體，其能在宿主細胞中以顯著高於先前抗 GDF-8 抗體之程度表現。本發明亦提供使用包含該等抗體之組合物增加肌肉質量或強度及治療或預防肌肉病症、神經肌肉病症、代謝性病症、脂肪組織病症或骨病之方法。

The disclosure provides improved neutralizing anti-GDF-8 antibodies capable of substantially higher levels of expression in host cells compared to previous anti-GDF-8 antibodies. Also provided are methods of using compositions comprising such antibodies to increase muscle mass or strength, and to treat or prevent muscular disorders, neuromuscular disorders, metabolic disorders, adipose tissue disorders or bone disorders.

I495643

TW I495643 B



公告本

發明摘要

※ 申請案號：10212/200

C07K 16/22 (2006.01)

※ 申請日：102.6.14

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

【發明名稱】

經改良之對抗GDF-8的拮抗劑抗體及其用途

IMPROVED ANTAGONIST ANTIBODIES AGAINST GDF-8 AND
USES THEREFOR**【中文】**

本發明提供經改良之中和性抗GDF-8抗體，其能在宿主細胞中以顯著高於先前抗GDF-8抗體之程度表現。本發明亦提供使用包含該等抗體之組合物增加肌肉質量或強度及治療或預防肌肉病症、神經肌肉病症、代謝性病症、脂肪組織病症或骨病之方法。

【英文】

The disclosure provides improved neutralizing anti-GDF-8 antibodies capable of substantially higher levels of expression in host cells compared to previous anti-GDF-8 antibodies. Also provided are methods of using compositions comprising such antibodies to increase muscle mass or strength, and to treat or prevent muscular disorders, neuromuscular disorders, metabolic disorders, adipose tissue disorders or bone disorders.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（11）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】

經改良之對抗GDF-8的拮抗劑抗體及其用途

IMPROVED ANTAGONIST ANTIBODIES AGAINST GDF-8 AND
USES THEREFOR

相關申請案的交叉參考

本申請案主張2012年6月15日申請之美國臨時申請案第61/660,232號之權益，該申請案之內容係全文以引用方式併入本文中。

序列表參考

在37 CFR §1.821下以電腦可讀取形式(CRF)經由EFS-Web以檔案名PC071914_SEQLIST_ST25.txt同時提交的序列表係以引用方式併入本文中。序列表之電子副本係於2013年5月14日創建，檔案大小為71 KB。

生物寄存

本發明之代表性材料係於2012年6月14日寄存於美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection,「ATCC」)，學院大道(University Boulevard) 10801號，馬納薩斯，VA 20110-2209，美國。具有ATCC 登錄號 PTA-12980之載體OGD1.0.0-HC係編碼OGD1.0.0重鏈可變區之多核苷酸，且具有ATCC登錄號PTA-12981之載體OGD1.0.0-LC係編碼OGD1.0.0輕鏈可變區之多核苷酸。

寄存物係在國際承認用於專利程序的微生物寄存布達佩斯條約(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure)及其下條例(「布

達佩斯條約」)之規定下製備。此保證可將寄存物之活培養物自寄存之日起維持30年。根據布達佩斯條約條款將使寄存物可藉由ATCC獲得且使其遵守Pfizer公司與ATCC之間之協議，其保證公眾可基於相關美國專利的發佈或基於向公眾公開任何美國或外國專利申請案(以先達到者為準)永久且不受限制地獲得寄存培養物之後代，且保證由美國專利商標局根據35 U.S.C. § 122和依據35 U.S.C. § 122之委員會規則(包括37 CFR § 1.14，尤其參照886 OG 638)確定授權者可獲得該後代。

本申請案之專利權人已同意，若所寄存材料之培養物當在適宜條件下培養時死亡或丟失或被破壞，則將迅速更換該材料之另一培養物並作出通知。所寄存材料之可獲得性不應視為允許在違反任何政府機關根據其專利法授予之權利之情況下實踐本發明。

【先前技術】

生長及分化因子-8 (GDF-8)亦稱作肌肉生長抑制素(myostatin)，其係分泌蛋白及結構相關生長因子之轉化生長因子- β (TGF- β)超家族之成員。此超家族之成員具有生長調節及形態演發性質(Kingsley等人(1994) *Genes Dev.* 8:133-46；Hoodless等人(1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 228:235-72)。人類GDF-8係以375個胺基酸之前體蛋白質來合成，其形成同型二聚體複合體。在處理期間，稱為「潛伏相關肽」(LAP)之胺基末端前肽被裂解且可與該同型二聚體保持非共價結合，從而形成名為「小潛伏複合體」之無活性複合體(Miyazono等人(1988) *J. Biol. Chem.* 263:6407-15；Wakefield等人(1988) *J. Biol. Chem.* 263:7646-54；Brown等人(1999) *Growth Factors* 3:35-43；Thies等人(2001) *Growth Factors* 18:251-59；Gentry等人(1990) *Biochemistry* 29:6851-57；Derynck等人(1995) *Nature* 316:701-05；Massague (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.* 12:597-641)。諸如濾泡抑素(follistatin)及其相關

物等蛋白質亦結合成熟 GDF-8 同型二聚體且抑制 GDF-8 生物活性 (Gamer 等人(1999) *Dev. Biol.* 208:222-32)。

來自不同物種之推斷 GDF-8 胺基酸序列之比對顯示，GDF-8 非常保守 (McPherron 等人(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12457-61)。人類、小鼠、大鼠、豬及雞 GDF-8 之序列在 C 末端區 100% 一致，而狒狒、牛及羊 GDF-8 在 C 末端處僅相差 3 個胺基酸。GDF-8 在物種之間之高保守度表明，GDF-8 具有必需的生理功能。

已顯示 GDF-8 可藉由抑制肌母細胞及衛星細胞之增殖及分化二者在肌肉發育調節及體內恆定中起重要作用 (Lee and McPherron (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:604-07；McCroskery 等人(2003) *J. Cell. Biol.* 162:1135-47)。其早期在發育中之骨骼肌中表現，且繼續在成年骨骼肌中表現，優先在快縮類型中表現。另外，在成年小鼠中過表現之 GDF-8 造成顯著肌肉損失 (Zimmers 等人(2002) *Science* 296:1486-88)。同樣，已顯示使 GDF-8 基因無活性之天然突變在動物及人類二者中可引起肥大及增生二者 (Lee 及 McPherron (1997)，見上文)。舉例而言，GDF-8 敲除轉基因小鼠之特徵在於骨骼肌之顯著肥大及增生以及骨皮質結構經改變 (McPherron 等人(1997) *Nature* 387:83-90；Hamrick 等人(2000) *Bone* 27:343-49)。在天然 GDF-8 突變之牛中顯現類似的骨骼肌質量增加 (Ashmore 等人(1974) *Growth* 38:501-07；Swatland 等人(1994) *J. Anim. Sci.* 38:752-57；McPherron 等人，見上文；Kambadur 等人(1997) *Genome Res.* 7:910-15)。另外，不同研究顯示，增加之 GDF-8 表現與 HIV 誘導之肌肉耗損有關 (Gonzalez-Cadavid 等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:14938-43)。亦已顯示 GDF-8 參與肌肉特異性酶 (例如，肌酸激酶) 之產生及肌母細胞增殖 (WO 00/43781)。

除了其生長調節及形態演發性質以外，相信 GDF-8 參與多種其他生理過程，包括在 2 型糖尿病發展期間之葡萄糖體內恆定、葡萄糖耐

受不良、代謝症候群(即，例如症候群X之症候群，其涉及同時發生一組健康病況，該等病況可包括胰島素抗性、腹部肥胖症、異常血脂症、高血壓、慢性發炎、易血栓狀態等，其使個人具有2型糖尿病及/或心臟病之高風險)、胰島素抗性(例如，有諸如殘疾或氮失調症等創傷誘導之抗性)及脂肪組織病症(例如，肥胖症、異常血脂症、非酒精性脂肪肝疾病等) (Kim等人(2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281:902-06)。

多種人類及動物病症與肌肉組織功能受損有關，例如，肌萎縮側索硬化症(「ALS」)、肌營養不良(「MD」；包括杜興氏肌營養不良(Duchenne's muscular dystrophy))、肌萎縮、器官萎縮、衰弱症、充血阻塞性肺病(COPD)、肌少症、惡病質及由其他疾病及病況引起之肌肉耗損症候群。目前，幾乎沒有可靠或有效之療法可治療該等病症。該等疾病之病理指示GDF-8信號傳導在該等疾病之治療中作為靶之潛在作用。

ALS係遲發且致死之神經變性疾病，且其特徵在於中樞神經系統變性及肌萎縮。ALS通常始於步態異常及靈活性損失，且然後進展至肢體及膈膜癱瘓。儘管大多數ALS病例係散發性的且病因未知，但已顯示5-10%病例源自顯性家族性(FALS)遺傳。約10-20%之FALS病例歸因於Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)基因中之突變(綜述於Bruijn等人(2004) *Ann. Rev. Neurosci.* 27:723-49中)。SOD1係催化超氧化物變為過氧化氫及雙原子氧之反應的異型二聚金屬-蛋白質，且由於SOD1之損失不引起運動神經元疾病(Reaume等人(1996) *Nat. Genet.* 13:43-47)，人們相信毒性功能獲得可誘導疾病(綜述於Bruijn等人，見上文)。SOD1誘導之神經元細胞死亡之具體機制尚未明瞭，且可能涉及軸突運輸之改變、對錯誤摺疊蛋白質之細胞反應、線粒體功能失調及興奮神經毒性(Bruijn等人，見上文)。

在ALS中觀察到之運動神經元變性可經由多種機制發生，包括運動神經元中斷營養因子之攝取或運輸(綜述於Holzbaur (2004) *Trends Cell Biol.* 14:233-40中)。因此，ALS可用藉由提供最佳存活環境來使變性神經元恢復活力之療法來治療。神經環境包括諸如神經膠質及肌肉細胞等受運動神經元支配之非神經元細胞。此環境提供由神經元內吞且經由逆行軸突運輸運輸至細胞體之營養及生長因子(Chao (2003) *Neuron* 39:1-2；Holzbaur，見上文)。

FALS已藉由突變體SOD1之過表現在小鼠及大鼠二者中建模(Howland等人(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:1604-09)。過表現突變體SOD1之G93A形式之轉基因小鼠截至90至100日齡時顯示肌肉無力及萎縮，且通常在接近130日齡時死亡(Gurney等人(1994) *Science* 264:1772-75)。然而，潛在的SODG93A誘導之病理(其包括握力減弱及神經肌肉接合點損失)早在50日齡時即顯著(Frey等人(2000) *J. Neurosci.* 20:2534-42；Fisher等人(2004) *Exp. Neuro.* 185:232-40；Ligon等人(2005) *NeuroReport* 16:533-36；Wooley等人(2005) *Muscle Nerve* 32:43-50)。表現SODG93A突變之轉基因大鼠遵循類似的變性時程(Howland等人，見上文)。近期研究已表明，病理之發展並非細胞自主性，此與以下假設一致：在ALS中觀察到之運動神經元變性經由多種機制而發生，包括運動神經元中斷營養因子之攝取及運輸(見上文)。Clement及合作者已使用嵌合小鼠顯示，野生型非神經元細胞可延長表現突變體SOD1之運動神經元之存活(Clement等人(2003) *Science* 302:113-17)。該等觀察已促使人們研究可能藉由提供最佳存活微環境來減慢神經元變性之療法。舉例而言，經由直接肌內注射病毒表現之生長因子(包括IGF-1、GDNF及VEGF)治療SODG93A小鼠延長動物存活(Kaspar等人(2003) *Science* 301:839-42；Azzouz等人(2004) *Nature* 429:413-17；Wang等人(2002) *J. Neurosci.* 22:6920-28)。另

外，在SODG93A轉基因小鼠模型中，局部IGF-1特異性異型體(mIGF-1)之肌肉特異性表現穩定神經肌肉接合點，促進運動神經元存活且延遲疾病之發作及進展，表明在轉基因SOD1動物中，對肌肉之直接效應可影響疾病發作及進展(Dobrowolny等人(2005) *J. Cell Biol.* 168:193-99)。亦已在ALS小鼠中報導肌肉高代謝與運動神經元易損性之間之關聯，從而支持肌肉缺陷可促進疾病病因之假設(Dupois等人(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:11159-64)。因此，促進肌肉生長應可改良對運動神經元之局部支持，且因此產生治療益處。

抑制肌肉生長抑制素表現導致肌肉肥大及增生二者(Lee及McPherron，見上文；McPherron等人，見上文)。肌肉生長抑制素負向調節損傷後之肌肉再生，且在GDF-8無效小鼠中，缺少肌肉生長抑制素導致肌肉再生加速(McCroskery等人，(2005) *J. Cell. Sci.* 118:3531-41)。肌肉生長抑制素中和抗體增加野生型小鼠(Whittemore等人(2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:965-71)及mdx小鼠(肌營養不良模型，Bogdanovich等人(2002) *Nature* 420:418-21；Wagner等人(2002) *Ann. Neurol.* 52:832-36)之體重、骨骼肌質量以及骨骼肌之肌肉大小及強度。此外，在該等小鼠中，肌肉生長抑制素抗體降低對膈膜(在ALS發病期間亦被靶向之肌肉)之損傷。已假設，諸如HGF等生長因子對肌肉之作用可係由於抑制肌肉生長抑制素表現所致(McCroskery等人(2005)，見上文)，由此幫助在正向上移動再生與變性之間之「推拉(push and pull)」或平衡。因此，GDF-8抑制係作為治療ALS、肌營養不良(MD)及其他期望增加肌肉質量、強度、大小等之GDF-8相關病症(例如神經肌肉病症)之潛在藥理學靶存在。由於可獲得ALS之多種動物模型(小鼠及大鼠)，可在兩種不同物種中測試治療劑，由此提高治療效應在人類活體內之可信度。

除了人類之神經肌肉病症以外，亦存在與骨損失相關之生長因

子相關病況，例如骨質疏鬆及骨關節炎，其主要影響老人及/或停經後女性。另外，代謝性骨疾病及病症包括由於長期糖皮質素療法、性腺早衰、雄激素抑制、維生素D缺乏、繼發性副甲狀腺機能亢進、營養缺乏及神經性厭食症所致的低骨量。儘管該等病況之多種當前療法係藉由抑制骨再吸收來發揮作用，但促進骨形成之療法可係有用的替代性治療。由於GDF-8在骨發育以及肌肉發育中具有一定作用，GDF-8之調節亦係治療骨變性病症之極佳藥理學靶。

先前將特異性拮抗GDF-8之鼠類單株抗體之生物效應尤其闡述為在ALS之齧齒動物模型中增加肌肉質量及強度。Holzbaur, EL等人，Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis, Neurobiology of Disease (2006) 23(3):697-707。因此預期在ALS患者以及在受其他特徵為過量GDF-8或由其介導之疾病及病症(例如上述之彼等)影響之患者中，小鼠抗體及其人類化對應體可有效增加肌肉質量及強度。

上文所提及之小鼠抗GDF-8抗體(如多種單株抗體及其他基於蛋白質之治療劑)之製造困難且昂貴，此乃因其製造通常需要在活哺乳動物細胞中進行生產。因此，提高此抗體或其他具有類似特異性之抗體之產率允許以較少輸入產生等量活性藥物。此將具有雙重益處，即在降低製造成本的同時釋放有限的製造設施用於生產其他生物藥物。兩種益處皆會促進達成提高治療性抗GDF-8抗體以及其他生物製劑對於患者之可用性之目標。因此，業內需要在哺乳動物細胞中具有較高產率之抗GDF-8抗體之改良形式。

【發明內容】

本發明提供人類化抗GDF-8抗體或其抗原結合片段，其能以與共享相同互補決定區(CDR)之該等抗體之先前形式相比較高之程度在宿主細胞中表現。亦提供用於本發明方法中之包含該等抗體之組合物。

在某些實施例中，該等抗體具有可變重鏈(VH)區，其中CDR1定義為胺基酸序列SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:20，CDR2定義為胺基酸序列SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:21，CDR3定義為胺基酸序列SEQ ID NO:12，且其中VH區經修飾以使得在Kabat位置108之胺基酸係白胺酸而非甲硫胺酸。在其他實施例中，該等抗體具有包含相同CDR之VH區，且其中VH區之第四框架區包含SEQ ID NO:44之胺基酸106-116。在該等抗體之其他實施例中，CDR接枝至人類生殖細胞系VH基因區段DP-47上且然後與JH4人類重鏈J區段基因接合。且在其他實施例中，該等抗體之VH區包含胺基酸序列SEQ ID NO:44。

在Kabat位置108具有白胺酸之本發明抗體(例如上文所例示之彼等)之特徵在於表現程度與在相同位置存在甲硫胺酸之形式相比有所提高。在某些實施例中，前一形式在類似條件下之表現程度比後一形式高大於約50%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、1200%、1400%、1600%、1800%或甚至2000%之量。

根據本發明抗體之其他實施例，前一段落中闡述之VH區可與可變輕鏈(VL)區配對，在該輕鏈可變(VL)區中CDR1定義為胺基酸序列SEQ ID NO:13，CDR2定義為胺基酸序列SEQ ID NO:14且CDR3定義為胺基酸序列SEQ ID NO:15，且其中VL區中Kabat位置100之胺基酸係甘胺酸或麩醯胺酸。在其他實施例中，VH區與VL區配對，在該VL區中輕鏈CDR接枝至人類生殖細胞系VL基因區段DPK-9且然後與JK4人類輕鏈J區段基因接合。根據該等抗體之一些其他實施例，先前所述之VH區與VL區配對，該等VL區具有先前所述之VL區CDR且其中VL區之第四框架區包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:46之胺基酸98-107。且在其他實施例中，先前所述之VH區與VL區配對，該等VL區包含胺基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:46。

在一些其他實施例中，上文所述VH區接合至來自人類抗體亞型(包括IgA、IgG、IgD、IgE或IgM)之重鏈恆定區。如果重鏈恆定區來自IgG，則在其他實施例中，抗體重鏈恆定區來自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之IgG亞型。重鏈恆定區可經修飾以(例如)消除一或多種Fc結構域效應子功能，如SEQ ID NO:57中所例示。在其他實施例中，上文所述VL區接合至可為 λ 或 κ 亞型之輕鏈恆定區。

根據其他實施例，SEQ ID NO:44之VH區與胺基酸序列SEQ ID NO:57之經修飾重鏈區接合以產生胺基酸序列SEQ ID NO:58之全長抗體重鏈。相反，在其他實施例中，SEQ ID NO:46之VL區可與胺基酸序列SEQ ID NO:17之 κ 恆定輕鏈接合以產生胺基酸序列SEQ ID NO:59之全長抗體輕鏈。在其他實施例中，然後可組合每一全長抗體重鏈及輕鏈二者以產生具有兩個抗原結合位點之抗GDF-8抗體。且在其他實施例中，抗體可包含該等全長完整抗體之片段或衍生物包括(例如)Fab、F(ab')₂、scFv、scFv-Fc、scFv-CH、scFab、scFv-拉鏈、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、微型抗體、Fv及雙特異性抗體。

本發明抗體可對GDF-8具有一定範圍內之結合親和性，例如約5000 nM或甚至更高，例如至少約4000 nM、3000 nM、2000 nM、1000 nM、900 nM、800 nM、700 nM、600 nM、500 nM、400 nM、300 nM、200 nM、100 nM、90 nM、80 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM或0.001 nM。

本發明亦提供編碼抗GDF-8抗體之核酸，以及包含該等核酸序列之表現載體，以及用於表現該等抗體之宿主細胞。

本發明亦提供可用於治療或預防患者中特徵為肌肉質量或強度減小之肌肉病症之方法。該等方法係藉由向需要治療或預防該等病症

之患者投與治療或預防有效量之包含特異性結合GDF-8之抗體或其抗原結合片段之組合物來實施。可用於該等方法之抗體包括上文及本發明全文中闡述之彼等抗體。

根據某些實施例，本發明抗體組合物可以治療或預防有效量投與需要治療或預防肌肉病症之患者，該肌肉病症包括選自由以下組成之群之彼等：肌營養不良、肌萎縮、肌少症、惡病質、肌肉耗損症候群、年齡相關性肌肉質量或強度損失及衰弱症。在其他實施例中，肌肉病症係由癌症引起之惡病質。在其他實施例中，肌肉病症係杜興氏肌營養不良。且在後一情況之某些實施例中，投與抗GDF-8抗體可有效改良患者在6分鐘步行測試中之表現。

在一些實施例中，亦有用地藉由在有效治療肌營養不良之另一藥劑之前、同時或之後投與包含本發明抗體之組合物來治療患有肌營養不良(例如杜興氏肌營養不良)之患者。在某些實施例中，此一藥劑係糖皮質素，例如普賴松(prednisone)。

亦提供藉由以有效增加哺乳動物之肌肉質量或強度之量向哺乳動物投與包含本發明抗GDF-8抗體之組合物來增加哺乳動物之肌肉質量或強度之方法。在多個實施例中，肌肉係骨骼肌(包括一或多種在呼吸中發揮作用者)或心肌。

亦提供藉由向需要治療或預防神經肌肉病症之個體投與治療或預防有效量之本發明抗GDF-8抗體來治療或預防神經肌肉病症之方法。在某些實施例中，欲治療或預防之神經肌肉病症係ALS。

亦提供藉由向需要治療或預防代謝性病症之個體投與治療或預防有效量之本發明抗GDF-8抗體來治療或預防代謝性病症之方法。在多個實施例中，欲治療或預防之代謝性病症包括2型糖尿病、代謝症候群、症候群X、胰島素抗性及葡萄糖耐受不良。

亦提供藉由向需要治療或預防脂肪組織病症之個體投與治療或

預防有效量之本發明抗GDF-8抗體來治療或預防脂肪組織病症之方法。在多個實施例中，欲治療或預防之脂肪組織病症包括肥胖症及異常高身體質量指數。

亦提供藉由向需要治療或預防骨損失病症之個體投與治療或預防有效量之本發明抗GDF-8抗體來治療或預防骨損失病症之方法。在多個實施例中，欲治療或預防之骨損失病症包括骨質疏鬆、骨量減少、骨關節炎及骨質疏鬆相關性骨折。

在一些其他實施例中，可用於本發明方法中之抗GDF-8抗體包括與有用地改變其功能或特徵(例如，但不限於延長血清半衰期)之部分偶聯之抗體。在其他實施例中，可出於類似目的或其他目的來實現胺基酸變化。

用於本發明方法中之抗體組合物可製備為不同調配物(包括(但不限於)水性懸浮液)用於藉由多種途徑投與，該等途徑包括(但不限於)皮下投與、靜脈內投與、肌內投與、腹膜內投與、輸注投與或推注投與。

在一些實施例中，本發明抗GDF-8抗體之有效劑量在0.001 mg/kg至約250 mg/kg範圍內，其可在一次投與中或在多次間隔投與中給予。

本發明亦提供由臨床醫師及其他人員用於幫助將抗GDF-8抗體組合物投與患者之醫藥套組。在一些實施例中，套組包括呈凍乾形式或呈水溶液之本發明抗GDF-8抗體、稀釋劑(例如醫藥級水或緩衝液)及用於投與抗前胃泌素抗體之裝置(例如注射器及針)。在其他實施例中，套組可另外包括第二治療劑。

【圖式簡單說明】

圖1A提供來自某些本發明抗GDF-8抗體之VH區之胺基酸序列之比對，該等VH區包括鼠類抗體VH區及藉由將鼠類重鏈CDR接枝至人

類生殖細胞系VH區DP-47中產生之兩個人類化抗體VH區(即，VH0及VH1)。另外提供進一步人類化VH區VH2-VH5之胺基酸序列之比對。重鏈CDR之胺基酸序列係使用粗體加下劃線字型突出顯示。在Kabat位置108之胺基酸係使用星號下方之粗體字型突出顯示。

圖1B提供來自某些本發明抗GDF-8抗體之VL區之胺基酸序列之比對，該等VL區包括鼠類抗體VL區及藉由將鼠類輕鏈CDR接枝至人類生殖細胞系VL區DPK-9中產生之兩種人類化抗體VL區(即，VL0及VL1)。另外提供進一步人類化VL區VL2-VL5之胺基酸序列之比對。輕鏈CDR之胺基酸序列係使用粗體加下劃線字型突出顯示。在Kabat位置100之胺基酸係使用星號下方之粗體字型突出顯示。

圖2A提供顯示來自經10 mg/kg OGD1.0.0抗體治療兩週之C57Bl/6小鼠之腓腸肌(GAS)及四頭肌(QUAD)質量與媒劑對照相比之增加的圖表。圖2B以經OGD1.0.0抗體治療之小鼠之肌肉質量相對於對照之增加百分比報告圖2A中之相同數據。圖2B另外顯示來自同組抗體治療小鼠及對照小鼠之趾長伸肌(EDL)之肌肉質量之增加百分比。

圖3提供顯示由來自經10 mg/kg OGD1.0.0抗體治療兩週之C57Bl/6小鼠之EDL肌肉生成之總強直性張力與媒劑對照相比之增加的圖表。

圖4A提供顯示來自經PBS媒劑及0.3、1、3、10及30 mg/kg OGD1.0.0抗體每週一次治療4週之C57Bl/6小鼠之腓腸肌(Gastroc)及四頭肌(Quad)質量之劑量反應性增加的圖表。數據代表在4週結束時量測之肌肉質量。圖4B以經OGD1.0.0抗體治療之小鼠之腓腸肌及四頭肌質量相對於對照之增加百分比報告圖4A中之相同數據。

圖5A提供顯示經PBS媒劑及0.3、1、3、10及30 mg/kg OGD1.0.0抗體每週一次治療4週之C57Bl/6小鼠之全身瘦肉質量(lean mass)之劑量反應性增加的圖表。數據代表在4週中每週結束時量測之瘦肉質

量。圖5B提供顯示經PBS媒劑及0.3、1、3、10及30 mg/kg OGD1.0.0抗體每週一次治療4週之C57Bl/6小鼠在4週研究結束時全身瘦肉質量之增加的圖表。

圖6A提供顯示經10 mg/kg OGD1.0.0抗體每週一次治療8週之mdx小鼠之全身瘦肉質量相對於投與PBS媒劑之對照mdx小鼠之增加的圖表。圖6B提供顯示經10 mg/kg OGD1.0.0抗體每週一次治療8週之mdx小鼠之最大峰值握力相對於投與PBS媒劑之對照mdx小鼠之增加的圖表。

圖7A提供顯示來自經10 mg/kg OGD1.0.0抗體每週一次治療8週之mdx小鼠及C57Bl/6小鼠之腓腸肌及四頭肌質量相對於投與PBS媒劑之對照小鼠之增加的圖表。數據代表在8週結束時量測之肌肉質量。圖7B以經OGD1.0.0抗體治療之mdx小鼠之腓腸肌及四頭肌質量相對於對照之增加百分比報告圖7A中之相同數據。

圖8提供顯示經0、3、10及30 mg/kg OGD1.0.0抗體治療之食蟹猴中全身瘦肉質量及腿部瘦肉質量之劑量反應性增加的圖表。

圖9提供顯示經10 mg/kg及30 mg/kg OGD1.0.0抗體治療之食蟹猴之全身瘦肉質量之增加在抗體治療中斷後仍持續數週的圖表。

圖10A提供顯示經10 mg/kg及30 mg/kg OGD1.0.0抗體治療8週之食蟹猴中覆蓋L3 - L5椎骨之軸上肌體積相對於投與PBS媒劑之對照動物有所增加的圖表。圖10B提供顯示由該等處理所引起的肌肉體積增加百分比之圖表。

圖11提供在4週之OGD1.0.0抗體治療之前及之後來自實例性動物個體之軸上肌之3D呈像。

圖12A提供含有在本文中稱作VH0之可變重鏈區之實例性抗GDF-8抗體重鏈之胺基酸序列。

圖12B提供含有在本文中稱作VL0之可變輕鏈區之實例性抗GDF-8抗體輕鏈之胺基酸序列。

【實施方式】

本發明提供人類化抗GDF-8抗體之改良形式，其能在細胞中以與該抗體之先前形式相比顯著較高之程度表現。因此，預期本文所述抗GDF-8抗體之改良形式與先前形式相比能在相同輸入下以更大量及更低商品成本來產生。本發明亦闡述使用改良抗體進行治療或預防之各種方法。因此，在某些實例性非限制性實施例中，改良抗GDF-8抗體可用於治療肌肉營養不良、惡病質及預期增加個體之肌肉質量或強度可產生治療益處之其他病症。

抗體結構及多樣性

如本文所用，術語抗體係指完整免疫球蛋白(Ig)或其任一抗原結合片段、部位(part)或部分(portion)，且尤其涵蓋任何包含完整或部分抗原結合位點且保留至少一定抗原結合特異性之多肽。抗體亦可係指衍生自完整抗體之抗原結合片段、部位或部分與另一分子(包括不同抗體、來自Ig超家族之蛋白質或並非源於免疫系統之蛋白質或其他類型之分子)之組合。該等抗體衍生物可包括非蛋白質性部分(portion)或部分(moiety)。

抗原係指能被抗體特異性結合之物質、蛋白質或其他。抗原可具有一個以上抗原決定子或表位，其係抗原中被抗體結合之部分。

免疫球蛋白(Ig)係異型四聚蛋白質，其包含兩條各自約50 kDa之重鏈及兩條各自約25 kDa之輕鏈。每條鏈包含多個Ig結構域。自胺基末端開始，重鏈含有單一可變區(VH)，之後端視Ig亞型係三個或四個稱作CH1、CH2、CH3及(在存在時) CH4之恆定區。類似地，在輕鏈中，單一可變區(VL)位於多肽之胺基末端，之後係單一恆定區(CL)。在CH1與CH2區之間係長度可變之鉸鏈區，其端視同種型產生分子撓性。CH1之重鏈羧基末端(包括鉸鏈)、CH2、CH3及(在存在時) CH4構成Fc區。每一可變區或恆定區包含單一Ig結構域。

Ig輕鏈經由二硫鍵結合至Ig重鏈，且Ig重鏈對經由二硫鍵彼此結合。非共價相互作用亦可有助於穩定重鏈及輕鏈之間及配對重鏈之間之鏈間四級結構。在完整Ig分子中，配對重鏈及輕鏈之VH及VL區之位置彼此相鄰且相互作用並合作形成抗原結合位點。因為完整Ig分子含有兩對配對重鏈及輕鏈，即總計兩條重鏈及兩條輕鏈，Ig分子含有兩個抗原結合位點。鉸鏈區之存在使抗原結合位點與分子之其餘部分之間具有撓性。

重鏈及輕鏈恆定區不直接參與抗原識別。然而，重鏈、尤其Fc區含有能與免疫系統之效應子分子及細胞相互作用之序列，從而使得重鏈恆定區可介導Ig分子之重要的生物功能。

重鏈及輕鏈二者之可變區含有三個胺基酸差異性增強之間隔區域(稱作超變區或互補決定區(CDR))，其與CDR周圍保守性更高之框架區(FR)相比在不同Ig分子之間廣泛變化。自可變區之胺基末端起，FR及CDR之連續順序及編號係FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。框架區主要負責決定可變區Ig結構域之三級結構。與之相比，CDR形成自每一可變區向外延伸之環。相鄰VH及VL區之CDR合作形成抗原結合表面，其主要負責界定具體Ig分子之抗原結合特異性。

研究抗體結構及功能之研究者已研發出不同方案來鑑別存於任何具體VH或VL區之胺基酸序列內之重鏈及輕鏈CDR。該等方案中之多者根據與重鏈及輕鏈可變區之周圍框架相關之不變或幾乎不變之模式鑑別CDR。然後使用對應於其組成殘基在VH及VL區範圍內之位置之數字範圍來定義CDR。因為CDR、尤其第三CDR之長度可變，方案有時亦使用字母來定義組成殘基。第一種該等方案中之一者稱為Kabat編號系統，其係基於比對隨後已知之VH及VL序列以確定可變CDR子序列在保守性更高之框架區範圍內之位置。用於定義CDR之其

他方案包括AbM編號系統及Chothia編號系統。其他方案亦有可能。舉例而言，可將CDR定義為彼等接觸抗原之可變區殘基，即使該等殘基不完全符合CDR之更正式的定義(例如Kabat或Chothia編號方案)亦可。例如，參見 Y. Ofran 等人，Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes, J Immunol. 2008年11月1日；181(9):6230-5，其係以引用方式併入。Kabat編號方案及某些其他抗體編號方案更詳細地闡述於(例如) Handbook of Therapeutic Antibodies (2007)，Stefan Dubel編輯，Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim，其係以引用方式併入。

重鏈及輕鏈可變區之CDR內之胺基酸接觸抗原中之殘基且主要負責界定抗體對抗原之結合特異性。端視所研究之抗體-抗原對，所有或少於所有之CDR殘基可直接接觸抗原。此外，某些接觸可比其他接觸更有助於界定特異性及/或親和性。

抗體及抗原二者中之接觸殘基之身份可使用x射線結晶學或其他熟習此項技術者已知之方法來測定。該等接觸殘基之突變通常(但並非總是)會對抗原結合特異性及/或親和性造成負面影響。相反，可能使非接觸CDR殘基以及FR殘基突變且不顯著影響抗原結合特異性或親和性。儘管預期保守胺基酸變化更可能保留抗原結合特異性及親和性，但任何具體CDR或框架突變之實際效應可使用熟習此項技術者熟悉之技術根據經驗來確定。

儘管VH及VL區中藉由其各別框架區支撐之CDR通常負責建立抗原結合特異性及親和性，但可能有例外。舉例而言，在某些Ig分子中，FR殘基可能亦有助於抗原結合，而在某些其他Ig分子中，一或多個CDR可能不直接接觸抗原。此外，在其他Ig分子中，分離VH區及VL區之CDR即使在不存在通常會與其配對之相應可變區時亦可具有

顯著抗原結合特異性。某些分離Ig分子可變區特異性結合抗原之能力類似於鯊魚或駱駝抗體之抗原結合特異性，該等抗體包含配對重鏈，但不包含輕鏈。

某些物種之Ig分子可根據不同同種型來分類。舉例而言，在人類中，Ig同種型包括IgA、IgG、IgD、IgE及IgM。此外，IgA及IgG同種型可分類為多種亞型，其分別稱作IgA1及IgA2以及IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。同種型及亞型係依照重鏈恆定區胺基酸序列之差異來定義。因此，不同同種型及亞型能與不同免疫細胞上的不同效應子分子相互作用，由此產生不同效應子功能。舉例而言，IgA分子有助於黏膜免疫力，而IgE分子有助於對抗某些寄生蟲之免疫力。IgM及IgE之重鏈含有四個串聯排列之CH Ig結構域，其自胺基末端CH區開始編號為CH1、CH2、CH3及CH4。然而，IgA、IgD及IgG僅含有三個串聯排列之CH區。輕鏈恆定區包含兩個同種型(稱作 κ 及 λ)，其不具有已知生物效應子功能。天然Ig分子將僅具有單一輕鏈恆定區同種型。

表現抗體重鏈及輕鏈之基因係在活體內經由稱為V(D)J重組之多次基因重排來構築。此過程負責自駐留於基因組中之相當有限之基因序列庫生成大型抗原結合蛋白質庫。關於此過程之其他資訊闡述於Abbas, A.K.、Lichtman, A.H.及Pillai, S., 2010, *Cellular and Molecular Immunology*，第6版，第8章，Saunders, Philadelphia, PA中，其係全文以引用方式併入。

在人類生殖細胞系DNA中，三個單獨基因座編碼構築免疫球蛋白重鏈、 κ 輕鏈及 λ 輕鏈所需之外顯子。重鏈基因座駐留於染色體14上， κ 鏈基因座駐留於染色體2上且 λ 鏈基因座駐留於染色體22上。在每一基因座之5'端處具有多個可變(V)基因區段，每一區段長約300個鹼基對，其編碼構成抗體重鏈及輕鏈可變區(包括第一及第二互補決定區(CDR1及CDR2)二者)之大部分胺基酸。在人類中，在重鏈基因座

中有約100個V基因，在 κ 鏈基因座中有約35個V基因，且在 λ 鏈基因座中有約30個V基因。V基因區段係藉由內含子彼此隔開。

位於人類重鏈基因座及 κ 輕鏈基因座中之V區段下游及恆定(C)基因區段上游者係接合(J)區段簇，其通常長約30-50個鹼基對且彼此及與鄰近V及C基因藉由非編碼序列隔開。重鏈基因座在與不同Ig同種型相關之9個功能性C基因之上游含有6個功能性J區段之簇，且 κ 輕鏈基因座在單一 C_κ 基因上游含有5個J區段之簇。人類 λ 輕鏈基因座亦含有4個功能性J區段，但各自定位於4個相應功能性 C_λ 基因中之一者之5'處。人類重鏈基因座亦含有定位於V基因下游及J區段簇上游之超過20個多樣性(D)基因區段之簇。兩個輕鏈基因座皆不含D基因區段。

在成熟Ig輕鏈基因中，V區係由V及J基因區段編碼，而在Ig重鏈中，V區係由V、J及D基因區段編碼。重鏈及輕鏈二者中之CDR1及CDR2係由V基因區段編碼。然而，構築CDR3更複雜。對於重鏈，CDR3係由包括D及J區段及接合殘基之VDJ接合點編碼。類似地，輕鏈之CDR3係由包括J區段及接合殘基之VJ接合點編碼。

在不成熟B細胞中，所有V、D及J基因區段皆單獨位於生殖細胞系中且無法用於表現功能性Ig蛋白質。相反，隨著B細胞成熟，該等基因區段經歷稱作V(D)J重組之複合體DNA重排過程，該過程使隨機選擇之重鏈V、D及J基因區段或輕鏈V及J基因區段相互接近。在V、D及J基因區段之接合期間，負責實施V(D)J重組之分子隨機添加或移除區段之間之核苷酸。以此方式，在成熟B細胞之基因組中生成完整可變區外顯子，其隨後與編碼功能性Ig重鏈及輕鏈蛋白質之mRNA中之其他外顯子(包括彼等編碼C區者)組合。

不同V、D及J基因區段隨機組合構築V區外顯子以及在所接合基因區段之間隨機添加或移除核苷酸係免疫系統生成高多樣性抗原結合位點之兩個重要機制。該等現象分別稱作組合多樣性及接合多樣性。

因為CDR3係自由V、D及J區段(在重鏈情形中)或V及J區段(在輕鏈情形中)貢獻之序列形成，故接合多樣性解釋為何CDR3在三種CDR中可變性最高且通常與抗原形成之接觸最廣泛。

由於Ig分子之結構基本上模組化，且不同區實施不同功能，故可能製備抗GDF-8抗體之保留GDF-8結合能力之片段或衍生物。該等片段或衍生物涵蓋於本文所用術語抗體中。自Ig分子製備之抗原結合片段或衍生物之非限制性實例包括Fab片段，其係包含VH、CH1、VL及CL區之單價片段；F(ab')₂，其係包含兩個經由鉸鏈區彼此接合之Fab之二價片段；Fd片段，其包含VH及CH1區；Fv片段，其包含VL及VH區；dAb片段，其包含VH或VL區。另一實例係單鏈Fv區(scFv)，其包含在單一多肽鏈中串聯排列且藉由允許可變區結合並形成單價抗原結合位點之多肽連接體間隔之VH及VL區。單鏈Fv區可經設計，其中VH區在VL區之前，或另一選擇為其中VL區在VH區之前。連接體之非限制性實例係15個殘基(Gly₄Ser)₃之肽(SEQ ID NO:34)。其他連接體亦有可能。其他片段或衍生物包括Fab'、替代抗體(surrobody)、二硫鍵穩定之Fv抗體(dsFv)、雙鏈抗體、三鏈抗體及單結構域抗體(例如鯊魚抗體或駱駝化抗體或奈米抗體)。其他片段或衍生物亦有可能。抗原結合片段、部位或部分(例如本文所述之彼等)可以重組方式或藉由完整抗體之酶促或化學裂解來產生。

實例性抗GDF-8抗體

GDF-8係指生長及分化因子-8，其係TGF- β 超家族之成員。成熟人類GDF-8之胺基酸序列展示於SEQ ID NO:1中。

先前研究鑑別能特異性結合GDF-8並中和其生物活性之鼠類單株抗體。顯示在小鼠中，包括在肌萎縮側索硬化症(ALS)之小鼠模型中，此抗體可增加肌肉質量及強度。參見WO 2007/024535，其係全文以引用方式併入。小鼠抗體之VH區具有胺基酸序列SEQ ID NO:3且

其VL區具有胺基酸序列SEQ ID NO:4。該等VH及VL區分別顯示於圖1A及圖1B中，其中VH及VL區CDR各自之胺基酸序列係以粗體字型來描繪。在Kabat及AbM編號系統二者中與每一VH及VL CDR相關之SEQ ID NO列示於下文所示表1中。如根據Kabat編號系統定義之CDR H1、H2及H3分別被指定為SEQ ID NO:10、11及12，而CDR L1、L2及L3分別被指定為SEQ ID NO:13、14及15。根據AbM編號系統，CDR H1、H2及H3分別被指定為SEQ ID NO:20、21及22，而CDR L1、L2及L3分別被指定為SEQ ID NO:23、24及25。

表1：藉由序列標識編號標識之本發明之核酸及胺基酸序列

Seq ID No.	類型	物種	序列說明
1	蛋白質	人類	成熟GDF-8
2	DNA	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VH區
3	蛋白質	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VH區
4	DNA	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VL區
5	蛋白質	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VL區
6	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VH1 (自SEQ ID NO:7反翻譯)
7	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH1
8	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VL1 (自SEQ ID NO:9反翻譯)
9	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL1
10	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR H1 Kabat編號系統
11	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR H2 Kabat編號系統
12	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR H3 Kabat編號系統
13	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR L1 Kabat編號系統
14	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR L2 Kabat編號系統
15	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR L3 Kabat編號系統
16	DNA	人類	κCL區

17	蛋白質	人類	κCL區
18	DNA	人工	具有兩個取代突變之人類IgG1 CH區
19	蛋白質	人工	具有兩個取代突變之人類IgG1 CH區
20	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR H1 AbM編號系統
21	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR H2 AbM編號系統
22	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR H3 AbM編號系統
23	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR L1 AbM編號系統
24	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR L2 AbM編號系統
25	蛋白質	小鼠	抗GDF-8抗體CDR L3 AbM編號系統
26	蛋白質	人工	具有回復突變之人類化抗GDF-8抗體VH
27	蛋白質	人工	具有回復突變之人類化抗GDF-8抗體VL
28	DNA	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VH + 前導序列
29	蛋白質	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VH + 前導序列
30	DNA	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VL + 前導序列
31	蛋白質	小鼠	小鼠抗GDF-8抗體VL + 前導序列
32	蛋白質	人類	DPK-9 生殖細胞系 VL區
33	蛋白質	人類	DP-47 生殖細胞系 VH區
34	蛋白質	人工	合成連接體序列
35	DNA	人類	JH3 J區(基因庫(Genbank)登錄號X86355)
36	蛋白質	人類	JH3 J區(基因庫登錄號X86355)
37	DNA	人類	JH4 J區(基因庫登錄號J00256)
38	蛋白質	人類	JH4 J區(基因庫登錄號J00256)
39	DNA	人類	JK1 J區(基因庫登錄號J00242)
40	蛋白質	人類	JK1 J區(基因庫登錄號J00242)
41	DNA	人類	JK4 J區(基因庫登錄號J00242)
42	蛋白質	人類	JK4 J區(基因庫登錄號J00242)
43	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VH0
44	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH0
45	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VL0
46	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL0

47	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VH1
48	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VL1
49	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VH0 + 前導序列
50	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH0 + 前導序列
51	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VL0 + 前導序列
52	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL0 + 前導序列
53	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VH1 + 前導序列
54	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH1 + 前導序列
55	DNA	人工	人類化抗GDF-8抗體VL1 + 前導序列
56	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL1 + 前導序列
57	蛋白質	人工	具有三個取代突變之人類IgG1 CH區
58	蛋白質	人工	具有三個取代突變之人類化抗GDF-8抗體VH0 + 人類IgG1 CH區
59	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL0 + 人類κCL區
60	DNA	人工	抗GDF-8 scFv-Fc小鼠VL –小鼠VH
61	蛋白質	人工	抗GDF-8 scFv-Fc小鼠VL –小鼠VH
62	DNA	人工	抗GDF-8 scFv-Fc人類化VL0 –人類化VH0
63	蛋白質	人工	抗GDF-8 scFv-Fc人類化VL0 –人類化VH0
64	DNA	人工	抗GDF-8 scFv-Fc人類化VH0 –人類化VL0
65	蛋白質	人工	抗GDF-8 scFv-Fc人類化VH0 –人類化VL0
66	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH2
67	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL2
68	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH3
69	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL3
70	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH4
71	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL4
72	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VH5
73	蛋白質	人工	人類化抗GDF-8抗體VL5

如在WO 2007/024535中進一步解釋，鼠類抗體係藉由CDR接枝來人類化。特定而言，鼠類VH區係藉由使用人類生殖細胞系可變重

鏈(VH)基因DP47 (VH3-23；基因庫登錄號AB019439)作為將鼠類VH CDR接枝至其之人類接受體框架來人類化。DP47之胺基酸序列(SEQ ID NO:33)顯示於圖1A中。鼠類VL區係使用人類生殖細胞系κ可變輕鏈(VL)基因DPK9 (O12m Vk1；基因庫登錄號X59315)作為將鼠類VL CDR接枝至其之人類接受體框架來人類化。DPK9之胺基酸序列(SEQ ID NO:32)顯示於圖1B中。

因為DP47及DPK9 V區序列係衍生自生殖細胞系而非重組V區基因，故人類化過程亦需要選擇人類J基因區段以編碼CDR3羧基末端之每一部分人類化VH及VL區之胺基酸序列。如WO 2007/024535中所述，人類化係使用JH3重鏈J區段(SEQ ID NO:35，對於VH區，即DP47/JH3)及使用JK1輕鏈J區段(SEQ ID NO:39，對於VL區，即DPK9/JK1)來完成。在圖1A及圖1B所示之序列比對中，由該等J區段基因編碼之胺基酸序列分別直接出現在VH CDR3及VL CDR3之後。

如本文所用，在WO 2007/024535中闡述之使用DP47及JH3構築之人類化抗GDF-8抗體VH區稱作VH1 (SEQ ID NO:7)，而使用DPK9及JK1構築之人類化抗GDF-8抗體VL區稱作VL1 (SEQ ID NO:9)。亦如本文所用，包含VH1及VL1之人類化抗GDF-8抗體稱作OGD1.1.1。在此命名法中，VH區編號緊跟在抗體名稱「OGD1」之後且VL區編號緊跟在VH區編號之後。因此，例如，抗體名稱OGD1.0.1將係指具有VH0區及VL1區之抗體，而抗體名稱OGD1.1.0將係指具有VH1區及VL0區之抗體。在小鼠VH及VL區、人類化VH1及VL1區以及由DPK9及DP47基因序列編碼之胺基酸之間之比對圖解說明於圖1A及圖1B中。

人類化抗GDF-8抗體之新穎形式闡述於本文中，其具有以顯著高於OGD1.1.1之程度由細胞表現同時保留以高親和性特異性結合GDF-8並中和GDF-8活性之能力之驚人性質。

在該等新穎抗體之某些實施例中，在VH區中在CDR3之後使用不同重鏈J區段、即JH4 (基因庫登錄號J00256，SEQ ID NO:37)。由於此變化，與VH1相比，在VH區之位置108 (使用Kabat編號方案)處，Leu (L)替代Met (M)。如本文所用，此L出現在Kabat位置108之新穎人類化VH區稱作VH0。VH0之胺基酸序列(SEQ ID NO:44)圖解說明於圖1A之序列比對中。

因為Kabat編號方案使用附加至某些相同數字之字母來指示不同長度之CDR，故殘基之Kabat編號與其在多肽之殘基序列中之物理位置之間不需要一一對應。因此，VH區之Kabat位置108相當於SEQ ID NO:44 (即，VH0)及本文所揭示進一步人類化VH區之胺基酸序列中之胺基酸編號111。

在本發明抗體之其他實施例中，在VL區中在CDR3之後使用不同輕鏈J區段、即JK4 (基因庫登錄號J00242，SEQ ID NO:41)。由於此變化，與VL1相比，在VL區之位置100 (使用Kabat編號方案)處，Gly (G)替代Gln (Q)。如本文所用，此G出現在Kabat位置100之新穎人類化VL區稱作VL0。VL0之胺基酸序列(SEQ ID NO:46)圖解說明於圖1B之序列比對中。

如本文所用，包含含有VH0之重鏈及含有VL0之輕鏈之人類化抗GDF-8抗體稱作OGD1.0.0。

與上述VH及VL實施例相關之基因區段、序列及術語概述於下表2中。

表2： 人類化VH及VL區之概述

人類化可變區	人類接受體框架	人類J-區段
VH1 (Seq ID No:7)	DP47 (Seq ID No:33)	JH3 (Seq ID No:36)
VH0 (Seq ID No:44)	DP47 (Seq ID No:33)	JH4 (Seq ID No:38)
VL1 (Seq ID No:9)	DPK9 (Seq ID No:32)	JK1 (Seq ID No:40)
VL0 (Seq ID No:46)	DPK9 (Seq ID No:32)	JK4 (Seq ID No:42)

如實例中進一步闡述，已令人驚訝地發現，包含VH0之抗GDF-8抗體係以顯著高於包含VH1之抗GDF-8抗體之程度由細胞表現。舉例而言，在實例1中所述之一個非限制性實施例中，令人驚訝地顯示，包含VH0及VL0之完整免疫球蛋白(即，OGD1.0.0)係以包含VH1及VL1之類似抗體(即，OGD1.1.1) 12倍之程度瞬時表現。穩定表現程度亦顯著較高，如實例2中所論述。有趣的是，如在實例3中所探究，發現增強之表現歸因於VH0之存在，此乃因不論VH0係與VL0配對或與VL1配對皆出現增強之表現，且僅在VL0與VH0而非VH1配對時才出現。

在某些實施例中，本發明抗體係包含全長重鏈及輕鏈之完整異型四聚Ig分子，其中可變重鏈區係VH0且可變輕鏈區係VL0 (OGD1.0.0)或VL1 (OGD1.0.1)，而在其他實施例中，抗體係該等全長抗體之GDF-8特異性結合片段或衍生物。

根據一些實施例，本發明抗體之VH區包含三個存於胺基酸序列SEQ ID NO:44或其小鼠對應體SEQ ID NO:3中之重鏈CDR (即CDRH1、CDRH2及CDRH3)，且其中在Kabat位置108之胺基酸係白胺酸。在其他實施例中，VH區包含胺基酸序列SEQ ID NO:44 (即，VH0)。在其他實施例中，本發明抗體之VL區包含三個存於胺基酸序列SEQ ID NO:46或其小鼠對應體SEQ ID NO:5中之輕鏈CDR (即CDRL1、CDRL2及CDRL3)，且其中在Kabat位置100之胺基酸係甘胺酸或係麩醯胺酸。在其他實施例中，VL區包含胺基酸序列SEQ ID NO:46 (即，VL0)或SEQ ID NO:48 (即，VL1)。

在本發明抗體中，抗體重鏈同種型可為任一人類Ig同種型或亞型，即IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。抗體輕鏈同種型可為 κ 或 λ 。在特定非限制性實施例中，抗體恆定重鏈係胺基酸序列SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:57，該二者皆係IgG1亞型。

SEQ ID NO:19在鉸鏈區中含有兩個阻止結合免疫細胞上之Fc受體之取代突變，而SEQ ID NO:57含有另一具有類似表現型之鉸鏈區突變(總計三個突變)。在另一特定非限制性實施例中，輕鏈CH區係胺基酸序列SEQ ID NO:17，其係 κ 同種型。

在本發明之特定非限制性實施例中，抗GDF-8抗體包含根據胺基酸序列SEQ ID NO:58之全長抗體重鏈及根據胺基酸序列SEQ ID NO:59之全長抗體輕鏈。前一序列包含VH0及胺基酸序列SEQ ID NO:57之重鏈恆定區，而後一序列包含VL0及胺基酸序列SEQ ID NO:17之輕鏈 κ 恆定區。根據另一實例性非限制性實施例，本發明抗GDF-8抗體包含由根據胺基酸序列SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59之兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之完整異型四聚抗體(即，OGD1.0.0)。

如上所述，在其他實施例中，本發明抗體包括包含VH0之抗GDF-8免疫球蛋白之抗原結合片段或衍生物。在該等片段或衍生物之某些實施例中，VH0可與VL0或VL1配對。本發明之非限制性實例片段或衍生物包括包含VH0之Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、scFv、dsFv、雙鏈抗體、三鏈抗體及單結構域抗體(例如鯊魚抗體或駱駝化抗體或奈米抗體)。其他片段或衍生物亦有可能。本發明Ig衍生物之特定非限制性實例包括SEQ ID NO:63，其係VL0串聯排列於VH0之胺基末端之scFv。另一非限制性實例係SEQ ID NO:65，其係V區顛倒且VH0串聯排列於VL0之胺基末端之scFv。

儘管本發明抗體例示為其中將鼠類抗GDF-8抗體之重鏈CDR接枝至人類生殖細胞系VH區DP47之免疫球蛋白，但本發明人類化抗GDF-8抗體並不限於僅使用該可變區。因此，例如，抗體亦包括完整免疫球蛋白及其片段或衍生物，其中將鼠類重鏈CDR(即，SEQ ID NO:10-12或20-22)接枝至不同於DP47之人類VH區，且經進一步修飾

以使得所得VH區多肽在Kabat位置108包括Leu (L)。其他人類生殖細胞系VH區之序列可藉由搜索基因庫或各種可公開存取之網際網路數據庫 (包括 VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 或 VBASE2 (<http://www.vbase2.org/>))來發現。

如在實例10中進一步闡述，解析分別結合GDF-8之OGD1.0.0及包含SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:5之鼠類VH及VL區之嵌合抗GDF-8抗體之共晶體結構且用於鑑別抗體中負責抗原結合之接觸殘基。使用此資訊且如實例11中進一步解釋，VH及VL區係藉由使CDR中之非接觸殘基突變以匹配存於人類生殖細胞系可變序列中相同位置之殘基來進一步人類化。如圖1A中所示，進一步人類化可變重鏈區稱作VH2、VH3、VH4及VH5。且如圖1B中所示，進一步人類化可變輕鏈區稱作VL2、VL3、VL4及VL5。

在本發明抗體之某些實施例中，任一人類化VH區可與任一人類化VL區配對以生成完整抗GDF-8抗體或其抗原結合片段或衍生物。舉例而言，在某些實施例中，VH0可與VL區VL0、VL1、VL2、VL3、VL4或VL5中之任一者配對。在其他實施例中，VH1可與VL區VL0、VL1、VL2、VL3、VL4或VL5中之任一者配對。在其他實施例中，VH2可與VL區VL0、VL1、VL2、VL3、VL4或VL5中之任一者配對。在其他實施例中，VH3可與VL區VL0、VL1、VL2、VL3、VL4或VL5中之任一者配對。在其他實施例中，VH4可與VL區VL0、VL1、VL2、VL3、VL4或VL5中之任一者配對。且在某些其他實施例中，VH5可與VL區VL0、VL1、VL2、VL3、VL4或VL5中之任一者配對。

如上文所解釋，預期CDR及框架區內非接觸殘基之突變對GDF-8結合特異性及/或親和性影響極小，而預期接觸殘基之突變具有較大效應。儘管突變、尤其接觸殘基之突變可降低結合特異性及/或親和性，在一些情形中，將觀察到突變提高對GDF-8之特異性及/或親和

性。任何具體突變對特異性或親和性之實際效應可使用熟習此項技術者熟悉之技術(例如表面電漿共振或其他技術)來測定。

根據上述原則，在某些實施例中，本發明抗體之一或多個VH及/或VL CDR或框架區內之一個、兩個、三個或更多個非接觸殘基可經不同胺基酸殘基保守或非保守取代，並保留對GDF-8之顯著特異性及結合親和性。在其他實施例中，一或多個VH及/或VL CDR內之一個、兩個、三個或更多個接觸殘基可經保守取代並保留顯著GDF-8特異性及結合親和性。在其他實施例中，非接觸殘基或接觸殘基之突變改良對GDF-8之特異性及/或親和性。

在本發明抗體之其他實施例中，VH及/或VL區之胺基酸序列可與本文明確列舉之序列相差不同百分比，並保留顯著或甚至改良的對GDF-8之特異性及/或親和性。因此，在某些實施例中，本發明抗GDF-8抗體之VH區可與VH0、VH1、VH2、VH3、VH4或VH5之胺基酸序列相差80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在其他實施例中，本發明抗GDF-8抗體之VL區可與VL0、VH1、VH2、VH3、VH4或VH5之胺基酸序列相差80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。且在其他實施例中，抗GDF-8抗體之VH及VL區可與本文明確列舉之彼等相差類似百分比，同時保留顯著或甚至改良之GDF-8特異性及/或結合親和性。

本發明抗體亦可經衍生、經共價修飾或偶聯至其他分子以改變其性質或改良其功能。舉例而言，但並不限制，衍生抗體包括已藉由(例如)以下方式修飾之抗體：糖基化、岩藻糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、甲醯化、經已知保護/阻隔基團衍生、連接至細胞配體或其他蛋白質等。

在一些實施例中，可裂解並移除本發明抗GDF-8抗體重鏈之C末

端離胺酸。因此，例如，在本發明之某些實施例中，抗GDF-8抗體包含缺少C末端離胺酸之SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:57之重鏈恆定區或可包含缺少C末端離胺酸之SEQ ID NO:58之抗體重鏈。

對抗GDF-8抗體結構之某些修飾可因產生其之細胞之類型以天然方式發生。在非限制性實例中，抗體在哺乳動物細胞(例如CHO細胞)中之合成可在抗體鏈中之一或多個胺基酸處引起糖基化。在抗GDF-8抗體之實例性非限制性實施例中，重鏈中之胺基酸N296經糖基化。其他位點亦有可能糖基化。如熟習此項技術者可瞭解，抗體在一些其他類型之細胞(例如細菌細胞)中之產生可產生非糖基化抗體鏈。其他類型的抗體修飾可經由在抗體純化期間或之後進行之化學或酶促修飾以天然方式或非天然方式發生。

或者，可改變可變區或恆定區中之特定胺基酸以改變或改良功能。在一非限制性實例中，可改變抗體Fc區中之胺基酸殘基以藉由增強其與FcRn之結合來延長抗體之血清半衰期。例如，參見WO 2000/009560，其係以引用方式併入本文中。在其他非限制性實例中，可改變抗體胺基酸以降低與一或多種介導Ig生物效應子功能之Fc受體、補體或其他免疫受體之結合。在另一非限制性實例中，可改變CDR、框架區或恆定區中之胺基酸以提高GDF-8結合親和性或降低免疫原性。在特定非限制性實例中，可將本發明抗體VH或VL區之某些人類框架殘基分別改變回如胺基酸序列SEQ ID NO:26及SEQ ID NO:27中之其鼠類對應體。

在其他實施例中，可根據熟習此項技術者熟習之方法用可檢測部分標記抗體且可根據熟習此項技術者熟習之方法來檢測。該等標記可直接或間接偶聯至本發明抗體。標記可為自身可直接檢測(例如，放射性核素或螢光標記)或可藉由其生成可檢測分子之能力而間接檢測(例如，催化受質產生可直接檢測之產物之酶標記)。可檢測標記之

實例包括酶(例如，辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶等)、輔基(例如，生物素等)、螢光染料或部分(例如，FITC、玫瑰紅(rhodamine)、鐳系磷光體)、發光部分、生物發光部分、放射性核素(例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等)、正電子發射原子或離子、磁原子或離子、順磁金屬原子或離子或可由其他抗體特異性結合之肽表位。在一些實施例中，標記可使用不同長度之間隔體附接以減小或防止與抗原結合位點之潛在位阻。

本發明抗體可在培養物中或在動物中自能持續表現哺乳動物蛋白質之任何細胞類型表現。非限制性實例包括人類細胞、小鼠、大鼠或其他齧齒動物細胞、其他哺乳動物細胞、CHO細胞、酵母細胞或其他真菌細胞、植物細胞或細菌細胞。可用於將編碼Ig分子或其片段或衍生物之DNA選殖至表現載體中及隨後用該等載體瞬時或穩定轉染細胞之技術為業內所熟知。可改變培養條件以使抗體表現程度最大化。亦可使用熟習此項技術者熟悉之技術在動物中表現抗體，且然後自乳液或其他體液純化。抗體亦可係完全或部分合成。

本發明抗體以高親和性結合GDF-8，例如平衡解離常數(K_D)為至少約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 或更高。抗GDF-8抗體對GDF-8之 K_D 可根據熟習此項技術者熟悉之各種方法來測定。該等技術之非限制性實例包括表面電漿共振(SPR)及ELISA。如熟習此項技術者將熟悉，由於親合力效應，具有兩個或更多個抗原結合位點之抗GDF-8抗體之表觀結合親和性可大於具有單價抗原結合位點之抗體片段。

儘管本發明抗體對GDF-8具有特異性，但該等抗體可端視所識別表位亦能以高親和性結合密切相關之稱為GDF-11之生長及分化因子。因此，GDF-8特異性抗體不需要排除能結合GDF-11分子之抗體。

如本文所用，中和性抗GDF-8抗體係與非特異性對照抗體或其他

適宜對照相比降低GDF-8生物活性之抗體。不期望受限於任何具體操作理論，一種至少抗GDF-8抗體可中和由GDF-8介導之生物功能之方式係防止成熟GDF-8結合其高親和性受體(例如ActRIIB)或一或多種其低親和性受體。然而，抗GDF-8中和抗體可干擾GDF-8生物活性之其他機制係可能的。

可藉由本發明中和抗體降低之由GDF-8介導之多種生物活性為業內已知。非限制性實例包括GDF-8與ActRIIB之結合，其可使用(例如)基於ELISA之分析來量測。另一實例包括藉由GDF-8活化其細胞信號傳導路徑，其可使用(例如)包括所謂CAGA元件之經轉染報導基因來檢測。例如，參見Lee等人，Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors, PNAS (2005) 102:18117-18122；及Thies等人，GDF-8 Propeptide Binds to GDF-8 and Antagonizes Biological Activity by Inhibiting GDF-8 Receptor Binding, Growth Factors (2001) 18:251-59，其係以引用方式併入。另一實例包括負責將GDF-8介導之信號傳導自細胞表面之GDF-8受體傳送至核中之SMAD蛋白質之磷酸化。例如，參見Philip等人，Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK, Cellular Signalling (2005) 17:365-375，其係以引用方式併入。SMAD蛋白質之磷酸化可以(例如)定量西方墨點法(Western blotting)使用抗磷酸-SMAD抗體來檢測。亦可檢測通常藉由GDF-8活化或抑制之基因之下游基因表現之調節。可使用本發明中和抗體降低之GDF-8介導活性之另一實例係對肌肉質量或強度之負向調節。其他活性亦有可能。

本發明中和抗體可端視熟習此項技術者熟悉之變量(例如抗體及抗原濃度及結合親和性，以及其他變量)將由GDF-8介導之生物活性降低至不同程度。由結合GDF-8之抗體引起之GDF-8介導生物活性之實例性非限制性降低百分比包括與適宜對照相比降低至少約10%、

20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。

抗GDF-8抗體對GDF-8介導生物活性之抑制可方便地表示為該等抗體在所選任何分析條件下能抑制50%生物活性之濃度。此濃度亦稱作 IC_{50} 。在某些實施例中，本發明抗GDF-8抗體之 IC_{50} 值等於或小於約500 nM、250 nM、100 nM、75 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM或更小。

分泌前導序列

根據某些實施例，編碼抗體重鏈及輕鏈之基因可提供有編碼胺基末端分泌前導肽之序列，該前導肽將剛合成之蛋白質引導至分泌區室。然後翻譯後處理移除前導肽，之後自細胞分泌成熟抗體。在本發明抗體之特定非限制性實施例中，VH0、VH1、VL0及VL1區提供有長19個胺基酸之分泌前導肽。該等包括前導序列之V區被指定為以下序列標識編號：VH0 (SEQ ID NO:50)；VL0 (SEQ ID NO:52)；VH1 (SEQ ID NO:54)；及VL1 (SEQ ID NO:56)。亦可使用其他分泌前導序列。非限制性實例包括鼠類VH區及其前導序列(SEQ ID NO:29)之最初19個胺基酸以及鼠類VL區及其前導序列(SEQ ID NO:31)之最初20個胺基酸。

抗GDF-8抗體表現

如實例中更詳細地解釋，OGD1.0.0係以顯著高於OGD1.1.1之程度在哺乳動物細胞中表現。舉例而言，當在瞬時轉染COS細胞中表現OGD1.0.0及OGD1.1.1時，OGD1.0.0係以OGD1.1.1約12倍之程度表現。類似地，當在穩定轉染CHO細胞中表現該等抗體時，OGD1.0.0係以OGD1.1.1約6倍之程度表現。如實例中所解釋，表現程度之差異似乎主要歸因於抗體中VH0而非VH1之存在。

因此，當在類似條件下表現時，包含VH0之本發明抗體展現高於

包含VH1之類似抗體之表現。舉例而言，在某些實施例中，包含VH0之抗體之表現程度比在類似條件下表現之含有VH1之類似抗體高至少約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍、30倍或更多倍之量。抗體表現程度之間之差異程度可取決於(例如)用於表現該等抗體之宿主細胞之類型(例如，COS細胞或CHO細胞)或宿主細胞係經瞬時轉染抑或經穩定轉染。含有VH0或VH1可變重鏈區之抗體之比較表現程度可隨其他生長條件之變化而改變且可使用熟習此項技術者熟悉之方法來測定。

在其他實施例中，VH0抗體之表現程度比在類似條件下表現之含有VH1之類似抗體高至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、1100%、1200%、1300%、1400%、1500%、1600%、1700%、1800%、1900%、2000%、3000%、4000%、5000%或更大之量。表現程度之其他差異(例如介於本文所列舉百分比之間之差異)亦有可能。

抗體表現程度可使用熟習此項技術者熟悉之技術來量測。在一非限制性實例中，抗體表現程度可使用定量ELISA分析來量測。亦可根據熟習此項技術者之知識使用其他定量分析。

編碼抗GDF-8抗體之核酸分子

本發明亦提供編碼抗GDF-8抗體之核酸分子或多核苷酸。核酸可包含DNA或其中U替代DNA核鹼基序列中之T之RNA。核酸亦可含有修飾，例如非標準核鹼基(例如，5甲基胞嘧啶)或經修飾主鏈(例如，硫代磷酸酯)。其他修飾係可能的。核酸可為單股或雙股。核酸可來自天然來源，例如細胞或全生物體。天然來源核酸之非限制性實例包括基因組DNA、擴增質粒DNA或mRNA。或者，核酸可係合成核酸。合成核酸之非限制性實例包括cDNA、PCR產物或在核酸合成機上合

成之核酸。

在某些實施例中，本發明核酸編碼包含VH0之抗體重鏈或其片段或衍生物之胺基酸序列。在其他實施例中，核酸編碼包含VL0之抗體輕鏈或其衍生物或片段之胺基酸序列。在其他實施例中，編碼VH0及VL區(例如VL0或VL1)之核酸序列存於不同或相同分離多核苷酸中。

儘管本發明提供編碼抗GDF-8抗體或其片段或衍生物之特定核酸序列，熟習此項技術者將瞭解，由於遺傳密碼之簡併性，該等序列僅具實例性且不應視為限制性。因此，編碼鼠類抗GDF-8抗體之VH及VL區之實例性核酸序列分別係SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:4。編碼VH1之實例性核酸序列係SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:47。編碼VL1之實例性核酸序列係SEQ ID NO:8及SEQ ID NO:48。編碼VH0之實例性核酸序列係SEQ ID NO:43。編碼VL0之實例性核酸序列係SEQ ID NO:45。編碼包含含有兩個鉸鏈區突變之IgG1之CH區之胺基酸序列SEQ ID NO:19之實例性核酸序列係SEQ ID NO:18。編碼包含人類κCL區之胺基酸序列SEQ ID NO:17之實例性核酸序列係SEQ ID NO:16。編碼鼠類抗GDF-8抗體之在前導序列之後的VH及VL區之實例性核酸序列分別係SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:30。編碼在前導序列之後的VH0、VL0、VH1及VL1區之胺基酸序列之實例性核酸序列分別係SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53及SEQ ID NO:55。

根據某些實施例，核酸分子包含編碼以下SEQ ID NO中之任一者之胺基酸之核酸序列：7、9、10、11、12、13、14、15、17、19、20、21、22、23、24、25、26、27、36、38、40、42、44、46、50、52、54、56、57、58、59、63或65。在其他實施例中，核酸分子包含編碼與以下SEQ ID NO至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列之核酸序列：7、9、10、11、12、13、14、15、17、19、20、21、22、23、24、25、26、

27、36、38、40、42、44、46、50、52、54、56、57、58、59、63或65。在其他實施例中，核酸分子包含編碼與VH0 (SEQ ID NO:44)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致且其中Kabat位置108係白胺酸之胺基酸序列之核酸序列。

根據某些實施例，核酸分子包含以下SEQ ID NO中之任一者之核酸序列：6、8、16、18、35、37、39、41、43、45、47、48、49、51、53、55、62或64。在其他實施例中，核酸分子包含與以下核酸序列SEQ ID NO至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之核酸序列：6、8、16、18、35、37、39、41、43、45、47、48、49、51、53、55、62或64。在其他實施例中，核酸分子包含在高嚴格性條件下與以下核酸序列SEQ ID NO雜交之核酸序列：6、8、16、18、35、37、39、41、43、45、47、48、49、51、53、55、62或64。

高嚴格性雜交條件之非限制性實例係培育在1× SSC中在65℃下或在1× SSC及50%甲醯胺中在42℃下雜交，之後在0.3× SSC中在65℃下洗滌之核酸。嚴格條件之其他實例提供於 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第9及11章，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)中，其係以引用方式併入本文中。

如熟習此項技術者可瞭解，某些本發明核酸可框內連接在一起以產生複合核酸序列。舉例而言，編碼VH0之核酸可與編碼CH區之核酸框內連接以產生編碼完整重鏈之複合核酸。在非限制性實例中，編碼VH0之核酸序列SEQ ID NO:43可與編碼胺基酸序列SEQ ID NO:57 (含有三個影響效應子功能之突變之人類IgG1重鏈之恆定部分)之核酸序列框內連接。產生輕鏈的類似連接係可能的，產生本文所述核酸之其他複合物之其他連接也係可能的。

載體

可使用熟習此項技術者熟知之技術將本發明核酸納入載體中。在某些實施例中，載體一般包括質粒、細菌質粒、真核游離體、酵母人工染色體及病毒基因組。實例性非限制性病毒包括反轉錄病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒(AAV)及植物病毒(例如花椰菜嵌紋病毒及煙草嵌紋病毒)。其他類型之載體係可能的。在一些實施例中，載體能在適宜宿主中自主複製。在其他實施例中，載體係以染色體外形式維持於宿主中，或可將其整合至宿主基因組中以使得載體可與宿主基因組一起複製。包含基因及足以維持該基因之轉錄及翻譯之控制序列之載體稱作表現載體。本發明載體可根據熟習此項技術者之知識經選擇或設計以在能支持表現Ig基因之任何細胞類型中發揮功能，該細胞類型包括細菌細胞、其他原核細胞、酵母細胞、其他真菌細胞、植物細胞、動物細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞、CHO細胞及人類細胞或其他細胞。

載體可視情況含有一或多種控制序列。某些控制序列允許複製，例如複製起點。其他控制序列控制或調節轉錄，例如啟動子、增強子及轉錄終止位點。啟動子或增強子之非限制性實例係彼等衍生自以下者：反轉錄病毒LTR、細胞巨大病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如，腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))或多瘤病毒。其他實例包括組織特異性啟動子及增強子、組成型活性啟動子及增強子、誘導型啟動子及增強子、Ig基因啟動子及增強子及肌動蛋白啟動子及增強子。其他啟動子及增強子亦有可能。

某些控制序列控制或調節轉錄後RNA處理，例如剪接及多腺苷酸化信號或提高或降低mRNA穩定性之信號。其他控制序列控制或調節蛋白質翻譯(例如翻譯起始序列(例如，Kozak共有序列))、翻譯後處理(例如引導基因產物分泌出宿主細胞之信號肽序列)或蛋白質穩定

性。信號肽序列可衍生自免疫球蛋白或並非Ig超家族之一部分之分泌蛋白質。其他控制序列亦有可能。

載體亦可包括可選擇標記基因，其允許選擇已吸收該等載體之宿主細胞。非限制性實例包括產生抗藥性表現型之可選擇標記基因，例如二氫葉酸還原酶基因(DHFR) (用於dhfr⁻宿主細胞，允許使用胺甲蝶呤選擇)、neo基因(允許用G418或類似藥物選擇)、hph基因(允許用潮黴素(hygromycin) B選擇)及麩胺酸合成酶基因(允許用甲硫胺酸磺醯亞胺選擇)。

● 在一些實施例中，載體可包含編碼單一Ig重鏈或輕鏈或其抗原結合片段之核酸序列，但同一載體中不包含兩條鏈。通常，自該等載體表現完整抗體涉及將包含重鏈及輕鏈之單獨載體引入同一細胞中。在其他實施例中，載體可在同一載體中包含編碼重鏈及輕鏈Ig鏈或其抗原結合片段之核酸序列。

● 可將本發明核酸分子或包含該等核酸之載體引入一或多種類型之能支持抗體表現之宿主細胞中。用於將核酸或載體引入適宜宿主細胞中之方法為熟習此項技術者所熟知。非限制性實例包括對靶宿主細胞之瞬時及穩定轉染、轉化、轉導及病毒感染。其他實例包括葡聚糖介導之轉染、磷酸鈣沈澱、聚凝胺介導之轉染、原生質體融合、電穿孔、將多核苷酸囊封於脂質體中及將DNA直接微注射至核中。實例性非限制性方法論述於(例如)美國專利第4,399,216號、第4,912,040號、第4,740,461號及第4,959,455號中，其係以引用方式併入。用於轉化植物細胞之方法亦為業內所熟知，包括(例如)農桿菌介導之轉化、生物彈道轉化、直接注射、電穿孔及病毒轉化。轉化細菌及酵母細胞之方法亦為業內所熟知。

宿主細胞

在某些實施例中，將編碼本發明抗體或其片段或衍生物之核酸

引入適宜宿主細胞中以達成表現目的。能表現抗體之細胞包括細菌、真菌、植物、動物及哺乳動物細胞。亦可根據熟習此項技術者之知識使用其他類型之細胞。

適合作為抗體表現宿主之哺乳動物細胞系為業內已知。實例性非限制性實例包括可自美國典型培養物保藏中心(ATCC)或其他來源獲得之某些永生細胞系，包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、非洲綠猴腎細胞(例如，COS、CV-1或Vero細胞)、人類肝細胞癌細胞(例如，HepG2)、A549細胞、A431細胞、HeLa細胞、L細胞、BHK21細胞、HL-60細胞、U937細胞、HaK細胞、Jurkat細胞及其他細胞。適合作為抗體表現宿主之其他動物、昆蟲或哺乳動物細胞係可能的。

在其他實施例中，可使用來自昆蟲、植物、細菌或真菌之細胞系。實例性非限制性昆蟲細胞包括Sf9或Sf21細胞，其通常結合桿狀病毒載體表現系統來使用。實例性非限制性植物細胞包括來自煙草、擬南芥、浮萍、玉米、小麥及馬鈴薯之彼等。實例性非限制性細菌包括大腸桿菌(*Escherichia coli*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、鼠傷寒沙氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)菌株。實例性非限制性真菌包括裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)、啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)、克魯維氏酵母屬(*Kluyveromyces*)酵母菌株及念珠菌屬(*Candida*)酵母菌株。其他昆蟲、植物、細菌及真菌細胞係可能的。

在有助於抗體表現之條件下生長及維持不同類型之宿主細胞之方法為業內所熟知。在抗體表現發生後，然後可根據熟習此項技術者之知識自宿主細胞純化如此表現之抗體。舉例而言，可自生長宿主細胞之培養基純化分泌抗體。或者，在一些實施例中，尤其在宿主細胞

具有細胞壁時，可以機械方式、化學方式或酶促方式破開宿主細胞以釋放隔絕於細胞內之所表現抗體。抗體純化之實例性非限制性方法包括離子交換層析、鹽沈澱及凝膠過濾。在其他實施例中，可使用親和層析。舉例而言，可將識別人類恆定區序列之小鼠抗體固定至純化管柱。或者，抗體可經表現融合至表位標籤或較大親和性標籤(例如麥芽糖結合蛋白質、谷胱甘肽S轉移酶及硫氧還蛋白)，以用緊密結合親和性標籤之特定抗體或其他分子來純化。此後，可使用熟習此項技術者熟悉之技術裂解表位標籤或親和性標籤並使用其他技術(例如本文所揭示之彼等)純化抗體。自培養基及宿主細胞純化抗體之其他技術亦有可能。根據良好作業規範或其他法規要求，抗體亦可視情況經受其他處理步驟以進一步純化抗體。適宜純化及其實施步驟為熟習此項技術者所習知。

轉基因動物及植物

本發明抗體亦可在經遺傳修飾之非人類動物或植物中產生。抗體在該等生物體中之表現可係組成型或誘導型。然後可使用熟習此項技術者已知之技術來分離在該等生物體中表現之抗體。用於在轉基因非人類生物體中表現抗體及其抗原結合片段之方法為業內所熟知。在非限制性實例中，本發明抗體可在山羊、牛或其他非人類哺乳動物之乳液中產生並自其回收。例如，參見美國專利第5,827,690號、第5,756,687號、第5,750,172號及第5,741,957號，其係以引用方式併入本文中。其中可表現抗體之轉基因哺乳動物之其他非限制性實例係小鼠、大鼠、綿羊、豬或馬。可自其分離抗體之體液之另一非限制性實例係血液。其他體液亦有可能。本發明抗體亦可在植物中產生並自其回收。例如，參見美國專利第6,417,429號、第6,046,037號及第5,959,177，其係以引用方式併入本文中。

醫藥組合物

對於在本發明治療及預防方法中之使用，可將本文所揭示抗體調配為組合物。視情況，組合物可包含一或多種在治療上或預防上有效對抗GDF-8介導病症之其他藥劑，包括與本文所揭示之彼等抗體結合不同GDF-8表位之抗體。組合物通常將作為通常將包括醫藥上可接受之載劑之無菌醫藥組合物之一部分來供應。此組合物可端視將其投與患者之所需方法呈任一適宜形式。

可藉由多種途徑(通常非經腸，例如，經由皮下、靜脈內、腹膜內或肌內注射)將本發明抗體投與個體。投與可以一或多次推注注射或以一或多次輸注來實現。根據熟習此項技術者之知識，其他投與途徑亦係可能的。在任一給定情形中最適宜之投與途徑可取決於欲投與之具體組合物及個體之特徵，例如欲治療之病症、年齡或性別。

醫藥組合物可方便地存於每劑量含有預定量抗體之單位劑型中。此一單位可含有(例如，但不限於) 5 mg至5 g、10 mg至1 g或20至50 mg。用於本發明之醫藥上可接受之載劑可端視(例如)投與途徑呈眾多種形式。

本發明醫藥組合物可藉由將具有所需純度之抗體與可選的業內通常採用之醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(其在本文中皆稱作「載劑」，即緩衝劑、穩定劑、防腐劑、等滲劑、非離子型去污劑、抗氧化劑及其他各種添加劑)混合製備為凍乾調配物或水溶液以供儲存。參見Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版(Osol編輯1980)。該等添加劑在所採用劑量及濃度下必須對接受者無毒。

緩衝劑有助於將pH保持在接近生理條件之範圍內。其可以介於約2 mM至約50 mM範圍內之濃度存在。適用於本發明之緩衝劑包括有機酸及無機酸二者及其鹽，例如檸檬酸鹽緩衝液(例如，檸檬酸單鈉-檸檬酸二鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸單鈉混合物等)，琥珀酸鹽緩衝液(例如，琥珀酸-琥珀酸單鈉混合物、琥

珀酸-氫氧化鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸二鈉混合物等)，酒石酸鹽緩衝液(例如，酒石酸-酒石酸鈉混合物、酒石酸-酒石酸鉀混合物、酒石酸-氫氧化鈉混合物等)，富馬酸鹽緩衝液(例如，富馬酸-富馬酸單鈉混合物、富馬酸-富馬酸二鈉混合物、富馬酸單鈉-富馬酸二鈉混合物等)，葡萄糖酸鹽緩衝液(例如，葡萄糖酸-葡萄糖酸鈉混合物、葡萄糖酸-氫氧化鈉混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸鉀混合物等)，草酸鹽緩衝液(例如，草酸-草酸鈉混合物、草酸-氫氧化鈉混合物、草酸-草酸鉀混合物等)，乳酸鹽緩衝液(例如，乳酸-乳酸鈉混合物、乳酸-氫氧化鈉混合物、乳酸-乳酸鉀混合物等)及乙酸鹽緩衝液(例如，乙酸-乙酸鈉混合物、乙酸-氫氧化鈉混合物等)。另外，可使用磷酸鹽緩衝液、組胺酸緩衝液及三甲胺鹽(例如Tris)。

可添加防腐劑以減緩微生物生長，且其可以介於0.2%-4% (w/v) 範圍內之量添加。適用於本發明之防腐劑包括酚、苧醇、間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苧基氯化銨、苯紫鹵銨(benzalconium halide，例如，苯紫氯銨、苯紫溴銨及苯紫碘銨)、氯化六甲雙銨及對羥基苯甲酸烷基酯(例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯)、兒茶酚、間苯二酚、環己醇及3-戊醇。可添加有時稱為「穩定劑」之等滲劑以確保本發明液體組合物之等滲性，且其包括多元糖醇，例如三元糖醇或高級糖醇，例如甘油、赤蘚醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇及甘露糖醇。穩定劑係指一大類賦形劑，其功能可在自增積劑至可溶解治療劑或有助於防止變性或防止黏附至容器壁之添加劑範圍內。典型穩定劑可為多元糖醇(上文所列舉)；胺基酸，例如精胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等；有機糖或糖醇，例如乳糖、海藻糖、水蘇糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、內消旋肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、甘

油及諸如此類，包括環多醇，例如肌醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，例如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巰基乙酸鈉、硫代甘油、 α -單硫代甘油及硫代硫酸鈉；低分子量多肽(例如，10個殘基或更小之肽)；蛋白質，例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯酮單糖，例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；二糖，例如乳糖、麥芽糖、蔗糖；以及三糖，例如棉子糖；及多糖，例如葡聚糖。穩定劑可以0.1重量份數/重量份數活性蛋白質至10,000重量份數/重量份數之範圍存在。

可添加非離子型表面活性劑或去污劑(亦稱作「潤濕劑」)以對抗攪動誘導之聚集來幫助溶解抗體及可包括之任何其他治療劑，其亦允許組合物暴露於剪切表面應力中而不引起蛋白質變性。適宜非離子型表面活性劑包括聚山梨醇酯(20、80等)、泊洛沙姆(polyoxamer)(184、188等)、普盧蘭尼克多元醇(Pluronic polyol)、聚氧乙烯去水山梨醇單醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)。非離子型表面活性劑可以約0.05 mg/ml至約1.0 mg/ml、例如約0.07 mg/ml至約0.2 mg/ml之範圍存在。

其他各種賦形劑可包括螯合劑(例如，EDTA)、抗氧化劑(例如，抗壞血酸、甲硫胺酸、維生素E)及共溶劑。

在實例性非限制性實施例中，將本發明抗體調配於包含20 mM L-組胺酸、85 mg/ml蔗糖、0.2 mg/ml PS-80、0.05 mg/ml EDTA之溶液(pH 5.8)中。在其他實施例中，抗體在此調配物中之濃度為100 mg/ml。且在其他實施例中，此調配物中之抗體經凍乾。

醫藥套組

在某些實施例中，本發明提供供臨床醫師或其他人員使用之醫藥套組。醫藥套組係包含本發明抗GDF-8抗體(例如，呈凍乾形式或呈水溶液形式)及以下中之一或多者之包裝：至少一種如本發明中其他地方所述之第二治療劑；用於投與抗體之裝置，例如針及/或注射

器；及若抗體呈凍乾或濃縮形式用於再懸浮或稀釋抗體之醫藥級水或緩衝液。套組亦可包括用於製備抗體組合物及/或將組合物投與患者之說明書。

每一單位劑量之抗GDF-8抗體組合物可單獨包裝，且套組可含有一或多個單位劑量(例如，2個單位劑量、3個單位劑量、4個單位劑量、5個單位劑量、7個單位劑量、8個單位劑量、10個單位劑量或更多)。在一個實施例中，一或多個單位劑量各自容納於注射器中，且在另一實施例中，一或多個單位劑量各自含於袋或適於連接至靜脈內管線之類似容器中。

治療及預防方法

本發明提供治療及預防其中降低GDF-8活性直接或間接產生治療益處之病況及病症之方法。該等方法包含向個體投與有效量之包含抗GDF-8抗體之組合物。在某些該等實施例中，抗體係OGD1.0.0或其GDF-8結合片段、部位、部分或衍生物。

可向其投與抗GDF-8抗體組合物之個體可為哺乳動物，例如非靈長類動物(例如，牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等)或靈長類動物(例如，猴子、黑猩猩、猿或人類)。個體可為人類，例如成年患者或兒科患者。

可使用本發明抗體組合物治療之病況及病症係彼等至少部分由GDF-8介導或存在科學原理表明降低個體之GDF-8活性會產生治療益處者。

儘管治療益處至少部分取決於具體病況或病症，但在降低個體之GDF-8活性導致病況或病症之症狀、體徵或嚴重性出現任何改善或停止或減慢該等症狀、體徵或嚴重性之逐漸惡化時，存在治療益處。若降低GDF-8活性延長個體之預期壽命、提高舒適性或生活品質，則進一步存在治療益處。若降低GDF-8活性改良或停止或減慢個體之一

或多種機體或生理功能或個體在反映該等功能之測試中之表現之劣化，則亦存在治療益處。

治療益處可藉由以下方式來推斷：觀察個體執行某些任務，詢問個體關於其感覺之問題，或在床邊對個體進行一或多種測試，或在實驗室中對自個體獲得之樣品進行一或多種測試。治療益處亦可藉由GDF-8抑制之標記來證明。例如，但不限於，可對所治療個體之肌肉進行生檢並測試與藉由GDF-8刺激之信號轉導路徑之下調相關之標記(例如磷酸化SMAD2或SMAD3蛋白質含量之降低)存在或不存在。適於檢測用包含本發明抗體之組合物治療之個體之治療益處的其他測試為熟習此項技術者所習知。儘管期望所治療或預防之病況或病症完全癒合或逆轉，但其並非治療益處存在所需要的。

在某些實施例中，可使用包含本發明抗體之組合物來治療或預防特徵為骨骼肌質量及/或強度損失或其中增加該肌肉質量及/或強度產生治療益處之病況或病症。在某些該等實施例中，抗體係OGD1.0.0或其GDF-8結合片段或衍生物。

可藉由投與本文所揭示抗體來治療或預防之與肌肉質量及/或強度減少有關之病況或病症包括(但不限於)年齡相關性肌肉質量或強度損失、衰弱症、肌少症及由肌萎縮、固定或失用(例如損傷後、去神經或持續暴露於零重力環境)引起之肌肉質量或強度損失。在其他實施例中，可治療或預防之病況或病症包括骨折，尤其在老人或其他易發生骨折(例如髖部骨折或其他骨之骨折)或對穩定關節置換敏感者中。在一些其他實施例中，可治療或預防之病況或病症係肌肉耗損症候群，包括彼等歸因於原發性疾病過程者。肌肉耗損症候群之非限制性實例包括惡病質，例如由癌症、厭食或其他類型之營養不良引起者；及由以下引起之肌肉耗損：AIDS、敗血症、燒傷、慢性腎衰竭、鬱血性心臟衰竭(CHF)及慢性阻塞性肺病(COPD)。

例如，但不限於，投與包含本發明抗體之組合物之個體之治療益處可經由一般性或特定肌肉之肌肉質量或強度之增加來顯示。其質量及/或強度可藉由用抗GDF-8抗體治療來增加之肌肉之非限制性實例包括骨骼肌及心肌。其他實例包括控制呼吸之肌肉，包括膈膜肌及肋間肌；以及吸氣之輔助肌肉，包括胸鎖乳頭肌、斜角肌及其他肌肉。骨骼肌之其他實例包括腓腸肌、脛骨後肌、比目魚肌、脛骨前肌、長肌、短肌、臀大肌、股二頭肌、半腱肌、半膜肌、髂腰肌、股四頭肌、髖部內收肌、提肩胛肌、斜方肌、腹直肌、腹橫肌、腹外斜肌、腹內斜肌、豎脊肌、胸大肌、肱二頭肌、肱三頭肌、肱肌、圓旋前肌、肱橈肌、菱形肌、三角肌及背闊肌。其質量及/或強度可藉由用本發明抗GDF-8抗體治療來增加之其他骨骼肌亦有可能。

肌肉質量或強度之增加可藉由(例如)觀察個體抵抗一力或舉起一重量之能力直接評價，或藉由(例如)使用MRI、CT或雙能X射線吸光測定法(DEXA)掃描個體身體間接評價。其他技術亦有可能。

或者，治療益處可自原本會逐漸惡化之症狀的嚴重性之降低來推斷。益處亦可使用肌肉功能之生理學測試(例如肌電描記術)、所生檢肌肉結構之組織病理學測試及生物化學測試(例如血清肌酸激酶(受損肌肉釋放之酶)之存在)來顯示。可用於檢測治療益處之肌肉結構及功能之其他測試亦有可能。

在與肌肉質量及/或強度有關之其他實施例中，本發明提供藉由向需要治療或預防肌營養不良(「MD」)之患者投與包含抗GDF-8抗體之組合物來治療及預防該等疾病之方法。在該等方法之一些實施例中，抗體係OGD1.0.0或其抗GDF-8結合片段或衍生物。根據某些實施例，個體係患有肌營養不良之人類兒科患者，且在其他實施例中，個體係患有肌營養不良之人類成年患者。

如業內已知，存在不同類型之肌營養不良，其引起疾病之遺傳

傷害之性質不同，且潛在遺傳缺陷產生之表現型不同。可藉由投與包含本發明抗體之組合物治療或預防之肌營養不良類型之非限制性實例包括杜興氏肌營養不良(DMD) (亦稱作假肥大性MD)、貝克氏肌營養不良(Becker Muscular Dystrophy, BMD)、埃-德二氏肌營養不良(Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, EDMD)、肢-帶型肌營養不良(LGMD)、顏面肩胛肱骨型肌營養不良(FSH或FSHD) (亦稱作蘭-德二氏MD (Landouzy-Dejerine MD))、肌強直性營養不良(MMD) (亦稱作DM或斯坦納特病(Steinert Disease))、眼咽型肌營養不良(OPMD)、遠端型肌營養不良(DD) (亦稱作三吉MD (Miyoshi MD))及先天性肌營養不良(CMD)。

除了上文所述彼等用於評價肌肉質量及/或強度之改良之技術以外，將包含本發明抗體之組合物投與患有MD之個體之治療益處可使用6分鐘步行測試(「6MWT」)來量化。例如，參見McDonald等人，The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy, *Muscle Nerve* (2010) 41:500-510，其係以引用方式併入本文中。

在6MWT中，測試個體以測定其能在6分鐘內沿預設路線步行多遠。通常，將在開始治療之前測試個體以建立基線，且然後隨著治療進展以一定間隔進行測試。在MD個體在6MWT中之表現隨著治療保持恆定或實際上改良時，或另一選擇為，在個體之表現下降地慢於一般未治療個體時，觀察到治療益處。在6MWT中之表現之實例性非限制性改良包括與未治療或經安慰劑治療之對照相比約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更大之改良百分比。6MWT亦可用於檢測針對除了MD以外影響下床活動之病況或病症進行治療之個體之治療益處。

在其他實施例中，本發明提供藉由向需要治療或預防運動神經元疾病之患者投與包含抗GDF-8抗體之組合物來治療及預防該等疾病之方法。在該等方法之一些實施例中，抗體係OGD1.0.0或其抗GDF-8結合片段或衍生物。可藉由投與包含本發明抗體之組合物治療或預防之運動神經元疾病類型之非限制性實例包括肌萎縮側索硬化症(ALS) (亦稱作路格裏克氏病(Lou Gehrig's Disease))、1型脊髓性肌萎縮(SMA1) (亦稱作韋-霍二氏病(Werdnig-Hoffmann Disease))、2型脊髓性肌萎縮(SMA2)、3型脊髓性肌萎縮(SMA3) (亦稱作庫-韋二氏病(Kugelberg-Welander Disease))及脊髓延髓肌肉萎縮(SBMA) (亦稱作甘迺迪氏病(Kennedy Disease))。

在先前工作中已顯示，鼠類抗GDF-8抗體可有效增加SOD1小鼠及大鼠(其係人類ALS之小型動物模型)之肌肉質量及強度。參見WO 2007/024535 及 Holzbauer 等人，Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiology of Disease* (2006) 23:697-707，其係以引用方式併入本文中。如所報導，與PBS治療對照相比，用鼠類抗體治療增加SOD1小鼠及大鼠之膈膜及骨骼肌之肌肉質量。類似地，與接受PBS之對照相比，抗體治療降低SOD1小鼠之腓腸肌及膈膜之肌萎縮。抗體治療之營養效應主要在疾病過程之早期階段而非末期階段期間顯現，但對膈膜萎縮之抑制在兩個時期皆顯現。與僅經媒劑治療之對照動物相比，亦觀察到抗體治療可增加SOD1小鼠及大鼠之肢體肌肉強度以及總體重，但抗體不延長存活。因為本發明人類化抗GDF-8抗體(例如OGD1.0.0)與上文所論述鼠類抗體共享相同抗原結合決定子，故預期其亦可有效治療或預防人類之ALS。

肌肉、中樞神經系統及周圍神經系統之影響肌肉質量、功能及/或強度之其他先天性或獲得性疾病及病症亦可藉由向有需要之個體投

與包含本發明抗體之組合物來治療或預防。

本發明亦提供藉由向需要治療代謝性病徵之患者投與包含抗GDF-8抗體之組合物來治療及預防代謝性病徵之方法。在某些該等實施例中，抗體係OGD1.0.0或其GDF-8結合片段或衍生物。

可藉由投與本發明抗體治療或預防之代謝性病徵之非限制性實例包括2型糖尿病、代謝症候群(例如症候群X)、胰島素抗性及葡萄糖耐受不良。

在其他實施例中，本發明提供藉由向需要治療脂肪組織病徵之患者投與包含抗GDF-8抗體之組合物來治療及預防該等病徵之方法。在某些該等實施例中，抗體係OGD1.0.0或其GDF-8結合片段或衍生物。

可藉由投與本發明抗體治療或預防之脂肪組織病徵之非限制性實例包括肥胖症及對於具體個體之性別、年齡及身高高於正常身體質量指數(BMI)。

在其他實施例中，本發明提供藉由向需要治療骨損失病徵之患者投與包含抗GDF-8抗體之組合物來治療及預防該等病徵之方法。在某些該等實施例中，抗體係OGD1.0.0或其GDF-8結合片段或衍生物。

可藉由投與本發明抗體治療或預防之骨損失病徵之非限制性實例包括骨質疏鬆、激素相關性骨質疏鬆、骨量減少、骨關節炎及骨質疏鬆相關性骨折。

組合療法

根據本發明方法之某些實施例，抗GDF-8抗體可在組合物中作為單一療法或作為與至少一種第二治療劑之組合療法來投與。通常，但並非在所有情形中，第二治療劑經選擇以治療或預防抗GDF-8抗體所靶向之相同病況或病徵。然而，在其他實施例中，第二藥劑可經選擇以治療或預防不同病況或病徵。用於組合療法中之抗體及第二治療劑

之劑量係根據熟習此項技術者之知識經選擇以使效力最大化且使副作用最小化。

本發明抗GDF-8抗體組合物可使用與第二治療劑相同或不同之投與模式來投與個體。端視抗GDF-8抗體及第二治療劑之化學及物理特徵，可將其組合至同一組合物中。在替代性實施例中，其係作為單獨組合物來投與。抗體與第二治療劑之組合物可方便地包括在本發明套組中。

若作為組合療法來投與，則抗體及第二治療劑可同時、相繼或單獨投與。

當在相同時間投與兩種或更多種藥劑時，即使各別投與重疊，但在不同時間開始或結束，亦進行同時投與。當在同一天(例如在同一次臨床就診期間)但並非同時將兩種或更多種藥劑投與個體時，進行相繼投與。

相繼投與可間隔1、2、3、4、5、6、7、8小時或更長時間進行。可首先投與抗GDF-8抗體組合物，之後投與第二藥劑，或反之亦然。

當在不同日期將藥劑投與個體時，進行單獨投與。單獨投與藥劑之實例性間隔可為1天、2天、3天、4天、5天、6天、1週、2週、3週或1個月或更長時間。如同相繼投與一般，可在單獨投與第二藥劑之前或之後投與抗GDF-8抗體組合物。

在本發明之某些其他實施例中，不論係相繼或單獨投與，抗GDF-8抗體組合物及第二治療劑可以交替模式重複投與。

在用於治療或預防代謝性病徵之方法中，本發明抗GDF-8抗體可與有效治療或預防該等病徵之第二藥劑組合。有效達成此目的之第二藥劑之非限制性實例包括美弗明(metformin)、磺醯脲、胰島素、普蘭林肽(pramlintide)、噻唑啉二酮(例如羅格列酮(rosiglitazone)及皮利酮

(pioglitazone))、GLP-1類似物(例如艾塞那肽(exenitide))及DPP-IV抑制劑(例如維達列汀(vildagliptin))。

在用於治療或預防骨損失病症之方法中，本發明抗GDF-8抗體可與有效治療或預防該等病症之第二藥劑組合。有效達成此目的之第二藥劑之非限制性實例包括雙磷酸鹽(例如阿侖膦酸鹽(alendronate)及利塞膦酸鹽(risedronate))、降鈣素(calcitonin)、雷洛昔芬(raloxifene)及激素類藥劑(例如雌激素或副甲狀腺素(PTH))。

在用於治療或預防肌營養不良之方法中，本發明抗GDF-8抗體可與有效治療或預防肌營養不良之第二藥劑(例如皮質類固醇)組合。有效治療或預防肌營養不良之其他藥劑為業內已知。有效治療肌營養不良之皮質類固醇之非限制性實例包括甲潑尼龍(methylprednisolone)、地夫可特(deflazacort)、倍他米松(betamethasone)、潑尼松龍(prednisolone)、氫化可的松(hydrocortisone)、可的松(cortisone)、倍氯米松(beclomethasone)、布地奈德(budesonide)、皮質醇、地塞米松(dexamethasone)、氟替卡松(fluticasone)、普賴松、莫米松(mometasone)、曲安西龍(triamcinolone)及其衍生物。在其他實施例中，抗GDF-8抗體可與用於治療在DMD患者、尤其老年DMD患者中經常發生之心肌病之藥劑一起投與。該等藥劑包括(但不必限於)β腎上腺素阻斷劑及血管緊縮素轉化酶抑制劑。

在用於治療或預防ALS之方法中，本發明抗GDF-8抗體可與有效治療或預防ALS之第二藥劑組合，該第二藥劑包括(但不必限於)利魯唑(riluzole)、他侖帕奈(talampanel)、格隆溴銨(glycopyrrolate)、苯紮托品(benzotropine)、東莨菪鹼(scopolamine)、阿托品(atropine)、鹽酸苯海索(trihexyphenidyl hydrochloride)、安米替林(amitriptyline)、氟伏沙明(flvoxamine)、貝可芬(baclofen)、替紮尼定(tizanidine)、丹曲林(dantrolene)、二氮平(diazepam)、奎寧(quinine)、苯妥英

(phenytoin)、苯二氮平(benzodiazepine)、加巴噴丁(gabapentin)、鎮痙劑、抗抑鬱藥及嗎啡(morphine)或其他止痛藥。

根據其他實施例，包含本發明抗GDF-8抗體之組合物可與並非基於藥物之療法協作投與，包括(例如，但不限於)運動、物理療法、呼吸療法、通氣支持、心臟病療法及營養補充。

有效劑量

如上文所述，可將包含本發明抗GDF-8抗體之組合物以有效地至少部分達成所需治療益處之劑量投與需要治療或預防某些病況或病症之個體。

達成治療效力並不一定需要結合所有GDF-8。相反，降低成熟活性GDF-8在體液(例如血液或血清)內或在身體組織(例如肌肉或其他身體組織或器官)內之濃度亦可有效。

根據熟習此項技術者之知識，抗GDF-8抗體組合物之劑量可在患者中逐步增加以在投與後之預定時間將活性GDF-8在所關注組織或體液中之濃度降低至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或約5%-10%、約10%-45%、約15%-20%、約20%-25%、約25%-30%、約30%-35%、約35%-40%、約40%-45%、約45%-50%、約50%-55%、約55%-60%、約60%-65%、約65%-70%、約70%-75%、約75%-80%、約80%-85%、約85%-90%、約90%-95%、約95%-99%，或活性GDF-8濃度之降低百分比介於任何上述值之間。

投與個體之抗GDF-8抗體之量將取決於多種因素，包括欲治療或預防之病況或病症、個體之大小及重量、投與形式、途徑及位點、治療方案(例如，是否使用第二治療劑)、具體個體之年齡及狀況、在開始治療之前在該個體之所關注組織或體液中檢測到之活性GDF-8之含量及個體對抗體組合物之效應之反應性或敏感性。適宜劑量可由熟習

此項技術者容易地確定。最後，臨床醫師或類似照護提供者將確定所使用之適宜劑量。此劑量可以適宜頻率重複投與。若出現副作用，則劑量之量及/或頻率可根據正常臨床實踐而改變或降低。可藉由使用熟習此項技術者已知之方法監測治療進展來確立適當劑量及治療方案。

有效劑量最初可根據活體外分析來估計。舉例而言，用於動物中之初始劑量可經調配以達成抗GDF-8抗體之等於或高於如在活體外所量測該抗體對GDF-8之結合親和性之循環血液或血清濃度。熟習此項技術者可熟練地在計算達成該等循環血液或血清濃度之劑量時慮及具體抗體之生物利用度。作為指導，向讀者提及Part 1: General Principles in 「Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics」，第11版，Hardman, J. G.等人編輯，McGraw-Hill Professional，及其中所引用之參考文獻。亦可自活體內數據(例如動物模型)來估計初始劑量。熟習此項技術者可以常規方式調整該資訊以確定適於人類投與之劑量。

在某些實施例中，可藉由在投與抗體組合物之前數天至數週中多次量測活性GDF-8在血清、肌肉或其他所關注體液或組織中之濃度以計算抗GDF-8抗體可飽和之量(即可足以結合基本上所有活性GDF-8之量)來確定用於個別個體之劑量。如熟習此項技術者可瞭解，對於血清、肌肉或其他位置中之給定量之GDF-8，任一特定抗體達成飽和所需之量將部分取決於具體抗體對GDF-8之親和性。用於計算特定抗GDF-8抗體之飽和量之方法(在需要時慮及具體抗體之藥物動力學性質及生物利用度)為業內所熟知。為確保飽和，可投與大於所計算飽和量之量，例如，可投與所計算飽和量之至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍之量。

端視上文所論述之因素(例如，欲治療或預防之病況或病症等)，

抗GDF-8抗體組合物之有效劑量可介於每單一(例如，推注)投與、多次投與或連續(例如，輸注)投與約0.01 mg/kg至約250 mg/kg範圍內或其中之任一有效範圍或值。

在某些實施例中，每一劑量可介於以下範圍內：約0.1 mg/kg至約0.5 mg/kg；約0.25 mg/kg至約0.75 mg/kg；約0.5 mg/kg至約1 mg/kg；約2 mg/kg；約1.5 mg/kg至約2.5 mg/kg；約2 mg/kg至約3 mg/kg；約2.5 mg/kg至約3.5 mg/kg；約3 mg/kg至約4 mg/kg；約3.5 mg/kg至約4.5 mg/kg；約4 mg/kg至約5 mg/kg；約5 mg/kg至約7 mg/kg；約6 mg/kg至約8 mg/kg；約7 mg/kg至約9 mg/kg；約8 mg/kg至約10 mg/kg；約10 mg/kg至約15 mg/kg；約12.5 mg/kg至約17.5 mg/kg；約15 mg/kg至約20 mg/kg；約17.5 mg/kg至約22.5 mg/kg；約20 mg/kg至約25 mg/kg；約22.5 mg/kg至約27.5 mg/kg；約25 mg/kg至約30 mg/kg；約30 mg/kg至約40 mg/kg；約35 mg/kg至約45 mg/kg；約40 mg/kg至約50 mg/kg；約45 mg/kg至約55 mg/kg；約50 mg/kg至約60 mg/kg；約55 mg/kg至約65 mg/kg；約60 mg/kg至約70 mg/kg；約65 mg/kg至約75 mg/kg；約70 mg/kg至約80 mg/kg；約75 mg/kg至約85 mg/kg；約80 mg/kg至約90 mg/kg；約85 mg/kg至約95 mg/kg；約90 mg/kg至約100 mg/kg；約95 mg/kg至約105 mg/kg；約100 mg/kg至約150 mg/kg；約125 mg/kg至約175 mg/kg；約150 mg/kg至約200 mg/kg；約175 mg/kg至約225 mg/kg；約200 mg/kg至約250 mg/kg。其他劑量範圍亦有可能。

投與之量、頻率及持續時間將取決於多種因素，例如個體之年齡、體重及疾病狀況。因此，在非限制性實例中，投與之治療方案可持續1天或更長時間、2天或更長時間、3天或更長時間、4天或更長時間、5天或更長時間、6天或更長時間、1週或更長時間、2週至不確定時間，持續2週至6個月、3個月至5年、6個月至1或2年、8個月至18個

月或諸如此類。視情況，治療方案提供重複投與，例如每天兩次、每天一次、每2天、3天、4天、5天、6天一次、每週一次、每兩週一次或每個月一次。可以相同劑量或以不同劑量重複投與。投與可重複1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次或更多次。抗GDF-8抗體組合物之治療有效量可作為單一劑量或在治療方案過程期間(例如在1週、2週、3週、1個月、3個月、6個月、1年或更長時間之過程期間)投與。在具體個體中構成抗GDF-8抗體組合物之有效劑量者可隨時間、隨個體狀況之變化或其他健康問題之出現而變化。

實例

實例1

OGD1.0.0及OGD1.1.1之瞬時表現分析

在COS-1 M6細胞中測試完整異型四聚OGD1.1.1及OGD1.0.0之瞬時表現，且顯示OGD1.0.0以顯著較高之程度表現。

簡言之，將編碼VH0及VH1之DNA (分別係SEQ ID NO:49及53)選殖至哺乳動物IgG表現載體中，以使得VH區各自與編碼包括三個消除效應子功能之突變之人類IgG1之恆定重鏈區(SEQ ID NO:57)之核酸序列框內接合，以表現包括VH0或VH1之全長抗體重鏈。類似地，將編碼VL0及VL1之DNA (分別係SEQ ID NO:51及55)選殖至哺乳動物IgG表現載體中，以使得VL區各自與編碼人類κ恆定輕鏈區SEQ ID NO:17之核酸序列框內接合，以表現包括VL0或VL1之全長抗體輕鏈。

在產生表現載體後，使用標準技術製備maxiprep DNA。將細胞平鋪至100 mm組織培養皿上且隨後用重鏈及輕鏈表現載體瞬時共轉染(即，在一個板中組合VH0及VL0且在另一板中組合VH1及VL1)。在室溫下將TransIT (Mirus MIR2306)轉染試劑(40 µl)添加至2 ml OptiMEM生長培養基加麩醯胺酸(2 mM終濃度)中，藉由渦旋混合且然後在室溫下培育15分鐘。將Maxiprep DNA (重鏈及輕鏈DNA各自8

μg)添加至混合物中且在室溫下培育15分鐘。然後將轉染溶液添加至含有8 ml生長培養基(DMEM、HIFBS、pen、strep、麩醯胺酸)之組織培養皿中。在37°C、10% CO₂下培育24小時後，用R1CD1無血清生長培養基洗滌細胞且然後使其在37°C、10% CO₂下於10 ml R1CD1 (添加有pen、strep、麩醯胺酸)中生長48小時。自細胞移除條件化培養基，進行離心以沈澱任何碎片，且將上清液移至新管中。

藉由瞬時轉染COS-1細胞產生之抗體之濃度係使用總人類IgG-Fc特異性ELISA來定量。簡言之，藉由將100 μl於PBS中之抗體(1 μg/ml)添加至每孔並在室溫下培育過夜來用山羊抗人類IgG (Pierce 31125)塗佈平底ELISA板。在室溫下用100 μl/孔之0.02%酪蛋白PBS溶液將板封阻3至24小時且然後洗滌。將標準品及樣品在分析緩衝液(0.5% BSA、0.02% Tween-20於PBS中)中連續稀釋，將其分配至ELISA板(100 μl/孔)並在室溫下培育3至24小時。在洗滌後，分配(100 μl/孔)在分析緩衝液中以1:5000稀釋之山羊抗人類IgG (Pierce 31413)且然後將板在室溫下培育15分鐘。在洗滌後，藉由添加BioFX TMB (TMBW-0100-01) (100 μl/孔)使板顯影。在用0.18 N H₂SO₄ (100 μl/孔)停止反應後，在450 nm下使用Molecular Devices vMax讀板器讀取板。使用自標準品之稀釋系列測定之曲線之線性範圍來計算樣品濃度。

瞬時轉染實驗之結果顯示於下表中，其中POI代表在蛋白質A純化後藉由大小排阻層析(SEC)之所關注峰。POI代表細胞所表現完整全長抗體之比例，與高分子量聚集物或降解產物相對。

意外的是，在瞬時轉染後在相同條件下OGD1.0.0抗體以顯著高於OGD1.1.1抗體之程度(即，超過10倍)表現。重要的是，如POI值所指示，所觀察到的顯著提高之表現程度幾乎完全與完整全長抗體而非高分子量複合體或降解產物相關。鑒於以下事實，此表現差異甚至更加驚人：如在OGD1.0.0與OGD1.1.1之間，僅有在VH區之Kabat位置

108處之一個胺基酸差異(即，SEQ ID NO:44及7之殘基編號111)及在VL區之Kabat位置100處之一個胺基酸差異(即，SEQ ID NO:46及9之殘基編號100)。參見圖1A及圖1B。

如上文所解釋，該等結構及功能差異歸因於在VH0及VL0中與VH1及VL1相比分別使用不同J區段。如下文所解釋，最重要差異似乎係VH區之變化。值得注意的是，人們相信此係用於構築人類化抗體之J區段之選擇可全面影響抗體表現程度之第一證明，更不必說此處所觀察到之顯著提高之程度。此發現尤其重要，因為預期其可顯著降低生產OGD1.0.0所需之商品成本。若無此發現，將無法經濟地以使其上市所需之量生產此抗體，從而對可受益於用該抗體治療之患者群體不利。

表3： 在COS細胞中瞬時表現之OGD1.0.0及OGD1.1.1之比較。

抗體	COS-1細胞中之瞬時表現	POI
OGD1.0.0	28.45 µg/ml	>99%
OGD1.1.1	2.35 µg/ml	>99%

實例2

OGD1.0.0及OGD1.1.1之穩定表現分析

在CHO-DUKX細胞中測試OGD1.0.0及OGD1.1.1之穩定表現。簡言之，使細胞生長至80%全滿且然後使用lipofectamine轉染試劑用各自25 µg之前一實例中所述之重鏈及輕鏈表現載體(總計50 µg)共轉染(即，VH0及VL0用於一組細胞，且VH1及VL1用於另一組細胞)。在轉染後，每3至4天用新鮮R1CD1培養基加10% FBS更換用過的培養基，同時建立穩定池(stable pool)。

在建立穩定轉染體後，測試細胞在作為附著細胞於無血清R5CD1培養基中生長時表現抗GDF-8抗體之能力。在該等條件下，表現OGD1.0.0之細胞在生長96小時後表現47.3 mg/L抗體，而表現

OGD1.1.1之細胞在生長72小時後表現41 mg/L抗體。使用1 mL蛋白質A管柱純化抗體且然後使用HPLC量化濃度。

在使附著細胞適應在無血清培養基中之懸浮生長後，再次測定OGD1.0.0及OGD1.1.1抗體之表現。在AS1無血清培養基中接種 3.0×10^5 個活細胞/mL並在37°C下培育。在第4天，將pH調節至7.3，添加濃縮進料，且將培育溫度降低至31°C以供再生長3天。使OGD1.0.0表現細胞在100 L培養體積中生長，而使OGD1.1.1表現細胞在50 mL培養體積中生長。細胞之間所有其他生長條件皆相同。在第7天，表現OGD1.0.0之細胞表現66.12 mg/L抗體，而表現OGD1.1.1之細胞表現10.6 mg/L抗體，如藉由蛋白質A純化及HPLC量化所測定。在藉由使細胞在100 L培養中生長9天(包括在31°C下5天)來重複使用OGD1.0.0細胞之實驗時，抗體濃度增加至207.2 mg/L。在使OGD1.0.0表現細胞在25 L培養中生長11天(包括在31°C下7天)之另一實驗中，抗體濃度係145 mg/L。在使OGD1.1.1表現細胞於50 mL培養中在無血清R5CD1培養基中生長7天(包括在31°C下3天)之單獨實驗中，抗體濃度係39.3 mg/L。

穩定轉染實驗之結果顯示於下表中，其中POI代表在蛋白質A純化後藉由大小排阻層析(SEC)之所關注峰。與在瞬時轉染COS-1細胞中表現OGD1.0.0及OGD1.1.1時獲得之結果一致，在類似條件下，在穩定轉染CHO細胞中OGD1.0.0抗體之表現程度顯著高於OGD1.1.1之表現。此驚人結果與在上文瞬時轉染實驗中觀察到之表現程度之提高一致。此結果亦表明，培養表現細胞之方式(附著或懸浮)及細胞類型皆不顯著影響OGD1.0.0抗體之表現相對於OGD1.1.1之提高。

表4： 在CHO細胞中穩定表現之OGD1.0.0及OGD1.1.1之表現程度之比較。

抗體	CHO穩定池
----	--------

OGD1.0.0	66.1 mg/L
OGD1.1.1	10.6 mg/L

實例3

OGD1.0.1及OGD1.1.0之瞬時表現分析

因為重鏈及輕鏈可變區中每一者之J區段皆發生變化，不明確是否單獨之變化即可足以引起所觀察到OGD1.0.0之顯著較高之表現程度，或可能兩個變化皆有助於提高抗體表現。

為研究此問題，申請者重複上述瞬時轉染實驗，但另外在一個板中組合VH0及VL1構築體，且在另一板中組合VH1及VL0構築體，且然後使用ELISA量化抗體表現程度。實驗結果顯示於下表中，其表明在VH區中用JH4取代JH3 J區段足以產生申請者所觀察到之顯著提高之抗體表現。相反，改變κJ區段(即，用JK4取代JK1)似乎不顯著影響表現程度。

表5： 組合VH1與VL0及組合VH0與VL1對抗體表現之效應

抗體	表現
OGD1.0.0	28.5 µg/ml
OGD1.0.1	27.6 µg/ml
OGD1.1.0	1.9 µg/ml
OGD1.1.1	2.4 µg/ml

實例4

抗GDF-8抗體之GDF-8結合

使用定量ELISA及表面電漿共振(SPR)分析親代鼠類抗體、嵌合小鼠-人類抗體(鼠類可變結構域及人類恆定結構域)及人類化抗體OGD1.0.0及OGD1.1.1之GDF-8結合。在ELISA實驗中，藉由計算IC₅₀值來確定抗體抑制GDF-8結合其同源高親和性受體ActRIIB之能力。使用SPR分析來計算表觀K_D值。結果顯示於表6中。

對於ELISA，將ActRIIB-Fc融合蛋白質(1 µg/ml，於0.2 M碳酸鈉

緩衝液中)塗佈於96孔平底分析板上，並在4°C下過夜。然後用於PBS 0.1% Tween中之1 mg/ml BSA (200 µl/孔)將經塗佈板在室溫下封阻1小時或在4°C下封阻過夜且然後洗滌。將不同濃度之抗體與10 ng/ml偶聯至生物素之GDF-8組合並在室溫下培育45分鐘。在培育後，將測試溶液添加至經封阻ELISA板(100 µl/孔)且在室溫下再培育1小時。在洗滌各孔後，相對於對照用抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化物酶(培育30分鐘)及TMB檢測GDF-8結合至固定ActRIIB-Fc之量。在微量讀板器中記錄在450 nm下之比色量測。將使用鼠類抗體及嵌合抗體之實驗各自重複四次並取平均值。

在25°C下使用BIAcore 3000 (GE Healthcare)機器實施SPR。鼠類抗體係使用抗小鼠IgG抗體來捕獲，而人類化抗體係使用蛋白質A來捕獲。使用胺偶合化學法將蛋白質A固定在CM5感測晶片之所有四種流動室上。藉由經7分鐘注射0.2 M N-乙基-N-二甲基-胺基-丙基-碳二亞胺(EDC)及50 mM N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)之溶液來活化表面。將蛋白質A在10 mM乙酸鈉緩衝液(pH 5.0)中稀釋至50 µg/ml並經3分鐘以10 µl/分鐘之流速注射。然後用1 M乙醇胺(ETH)將表面封阻7分鐘。蛋白質A之最終固定含量介於1000-1200反應單位(RU)之間。在固定程序後用運行緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20)洗滌若干次以平衡表面。將抗體在HBS-EP緩衝液中稀釋至0.25 µg/ml。將每一抗體之溶液(5 µl)以10 µl/min之速率注射經過經蛋白質A塗佈之流動室2、3或4，從而產生約200 RU之捕獲抗體。在0.01 M乙酸鈉(pH 5.0, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20)中製備GDF-8滴定系列(自4.0 nM至0.125 nM之2倍稀釋物)。該乙酸鈉溶液亦用作運行緩衝液。經2分鐘以50 µl/min之流速將GDF-8溶液注射經過經捕獲抗體且使其解離30 min。在每一注射及捕獲循環後，用30 µl 10 mM NaPO₄, 0.5 M NaCl (pH 2.5)以50 µl/min之流速使感測晶

片表面再生。使用BIA評估軟體(4.1.1版，GE Healthcare)進行數據分析。藉由減去緩衝液及參照表面貢獻之信號來對數據進行雙重參照。使用Langmuir 1:1模型整體擬合感測圖數據並計算 K_D 值。將使用OGD1.0.0之實驗各自重複三次並取平均值。

在所測試抗體形式之間，使用ELISA測定之 IC_{50} 值相當。在更精確的SPR分析中，OGD1.0.0與OGD1.1.1相比對GDF-8具有顯著較大之結合親和性。

表6：抗GDF-8抗體之GDF-8結合

抗體	藉由ELISA獲得之 IC_{50} (nM)	藉由Biacore獲得之 K_D
鼠類抗體	0.165 nM	21.83 pM
嵌合抗體	0.165 nM	2.99 pM
OGD1.0.0	0.140 nM	2.59 pM
OGD1.1.1	0.140 nM	7.25 pM

實例5

OGD1.0.0抗體之GDF-8中和能力

使用報導基因分析來確認抗GDF-8抗體中和GDF-8介導之信號傳導之能力。稱作pGL3(CAGA)₁₂之報導基因構築體係藉由在螢光素酶報導基因載體pGL3 (Promega)中將12個CAGA盒置於來自腺病毒主要晚期啟動子之TATA盒及轉錄起始位點上游來構築。在PAI-1基因啟動子中發現之CAGA盒係亦對GDF-8反應之TGF β 反應元件。用pGL3(CAGA)₁₂瞬時轉染人類橫紋肌肉瘤細胞系A204 (ATCC HTB-82)且在96孔板中在補加有2 mM麩醯胺酸、100 U/ml鏈黴素、100 μ g/ml青黴素及10%胎牛血清之McCoy's 5A培養基中培養16 hr。在室溫下將抗體與GDF-8 (10 ng/ml)在補加有1 mg/ml BSA之培養基中一起預培育1 hr。然後在37°C下用測試樣品及不包括GDF-8及包括GDF-8 (10

ng/ml)但不添加抗體之對照將細胞處理6 hr。使用螢光素酶分析系統(Promega)量測螢光素酶活性。將使用鼠類抗體及嵌合抗體之實驗各自重複兩次並取平均值，而將使用OGD1.0.0之實驗重複三次並取平均值。在所測試抗體形式之間，使用報導基因分析測定之EC₅₀值相當。

表7： 抗GDF-8抗體之GDF-8中和活性

抗體	CAGA EC50 nM
鼠類抗體	33.50 nM
嵌合抗體	24.25 nM
OGD1.0.0	27.30 nM
OGD1.1.1	26.00 nM

實例6

OGD1.0.0抗體增加小鼠之肌肉質量、肌力及瘦肉質量

經兩週每週一次腹腔內(IP)給予8週齡雄性C57Bl/6小鼠OGD1.0.0 (10 mg/kg)或媒劑對照(PBS)。每組使用總計8只小鼠。在第14天，藉由小型動物NMR成像測定全身瘦肉質量。在測定瘦肉質量後，將動物安樂死且解剖腓腸肌、四頭肌及趾長伸肌(EDL)並稱重。亦測試EDL肌肉離體產生力之能力。

在治療兩週後，對照動物之瘦肉質量增加 1.66 ± 0.56 g，而經OGD1.0.0治療之動物之瘦肉質量增加 3.36 ± 0.62 g，此代表相對於對照增加102%。

如圖2A及圖2B中所示，在經OGD1.0.0抗體治療之動物中，四頭肌質量相對於對照增加14.8%，腓腸肌質量相對於對照增加10.3%，且EDL肌肉質量相對於對照增加10.8%。如圖3中所示，在經OGD1.0.0抗體治療之動物中，EDL肌肉施加之總強直性張力相對於經媒劑對照治療之小鼠之EDL肌肉產生之力增加14.8%。數據顯示為平均值

±SEM。

亦測定全身瘦肉質量及四頭肌及腓腸肌之肌肉質量因應OGD1.0.0治療之劑量反應性。在該等實驗中，將12週齡雌性C57B1/6小鼠分爲數組(n=6)且經4週每週以0.3、1、3、10或30 mg/kg經媒劑或OGD1.0.0治療。在治療階段之7、14、21及28天時，使用NMR成像測定瘦肉質量。在研究階段結束時，在將測試動物安樂死後，解剖四頭肌及腓腸肌並稱重。如圖4A及圖4B中所示，四頭肌及腓腸肌之肌肉質量隨抗體劑量升高而增加，直至抗體劑量爲約10 mg/kg。類似地，如圖5A及圖5B中所示，全身瘦肉質量隨抗體劑量升高而增加直至抗體劑量爲約10 mg/kg。數據顯示爲平均值± SEM。

實例7

OGD1.0.0抗體增加mdx小鼠之肌肉質量及瘦肉質量

在C57BL/10ScSn小鼠中自發出現X-連接肌肉萎縮蛋白基因(Dmd)之mdx突變且在基因位置3185處之外顯子內引起點突變，從而將麩醯胺酸密碼子轉化爲終止密碼子且導致肌肉萎縮蛋白之提前終止。因此，mdx小鼠缺少功能性肌肉萎縮蛋白並用作人類杜興氏肌營養不良之小型動物模型。在約3週時開始出現肌肉壞死且伴隨某種明顯的肌肉無力。儘管肢體骨骼肌之特徵在於持續進行性之變性及壞死，但此可藉由衛星細胞活化之再生性反應及肌肉肥大來補償。mdx突變體之肌肉彈性整體降低，從而使其更易因延長活化而受傷。突變體小鼠之腿部肌肉最初正常發育，但再生肌管分化爲快纖維及慢纖維類型受到顯著抑制。mdx小鼠之比較溫和之表現型可部分歸因於肌肉萎縮蛋白相關蛋白質尤拓芬(utrophin)之補償功能，該蛋白質在成年mdx突變體之再生肌肉纖維中顯著上調。與肢體肌肉相比，mdx小鼠之膈膜肌肉不經歷顯著再生期，從而使得連續的營養不良隨著年齡減弱該等肌肉。在mdx突變體膈膜中，比顫搐張力、比強直性張力及最大功率皆

有所降低。

經8週每週一次腹膜內(IP)給予8週齡雄性mdx及對照C57Bl/6小鼠OGD1.0.0 (10 mg/kg)或媒劑對照(PBS)。在該等實驗中，10只mdx小鼠經抗體治療，向8只小鼠投與媒劑對照，且6只C57Bl/6小鼠各自經抗體或PBS治療。在治療階段結束時，量測全身瘦肉質量、握力及肌肉質量。全身瘦肉質量係藉由小型動物NMR成像來測定。握力係藉由以下方式來測試：將測試動物置於線網格上，使其用所有肢體抓握網目，且然後牽拉尾部並量測在動物鬆開抓握時之最大峰值力。對每只動物之數據自3-5次試驗取平均值。在量測身體瘦肉質量及握力後，將小鼠安樂死且解剖四頭肌及腓腸肌並稱重。

如圖6A中所示，與經PBS治療之mdx小鼠之平均 4.83 ± 0.4 g相比，經OGD1.0.0抗體治療使mdx小鼠之瘦肉質量增加平均 7.28 ± 0.4 g。差異在統計學上顯著($p < 0.05$)。因此，在8週研究中，相對於媒劑治療對照，mdx小鼠之瘦肉質量增加 $50\% \pm 8.2\%$ 。如圖6B中所示，與媒劑治療對照相比，抗體治療亦增加mdx小鼠之握力。差異在統計學上顯著($p < 0.05$)。

如圖7A中所示，與經PBS治療之相同類型之小鼠相比，抗體治療增加mdx小鼠及C57Bl/6小鼠之腓腸肌及四頭肌之質量。該等增加在統計學上顯著(分別對於mdx四頭肌及腓腸肌， $p=0.005$ 且 $p=0.002$ ；且分別對於C57Bl/6四頭肌及腓腸肌， $p=0.001$ 且 $p=0.003$)。如圖7B中所示，與媒劑治療對照小鼠相比，來自抗體治療mdx小鼠之腓腸肌及四頭肌之質量分別增加12.2%及12.1%。在經抗體治療後，與媒劑治療對照相比(未顯示)，來自C57Bl/6小鼠之相同類型之肌肉之質量亦增加15.2%及12.8%。

實例8

OGD1.0.0抗體增加非人類靈長類動物之肌肉體積及瘦肉質量

設計並實施兩個研究來調查在食蟹猴中投與OGD1.0.0抗體對身體瘦肉質量及肌肉體積之效應。

每一研究持續8週，其中每週藉由靜脈內投與給予動物抗體且提供過量食物以確保正氮平衡。在第一研究中，以3.0 mg/kg、10 mg/kg及30 mg/kg之劑量向三隻雄性及三隻雌性個體中之每一者投與PBS媒劑或OGD1.0.0抗體。在第一次治療之前且隨後在第4週及第8週時，麻醉動物且隨後使用雙能X射線吸光測定法(DEXA)、電腦化x射線斷層掃描(CT)及磁共振成像(MRI)來成像以檢測並量測身體組成，包括瘦肉質量及脂肪含量。然後將研究1之個體動物安樂死並進行屍檢。在第二研究中，僅使用雄性個體且其僅以10 mg/kg及30 mg/kg之劑量(分別地，n=5個個體且n=3個個體)接受媒劑(n=5)或OGD1.0.0抗體。在8週時如第一研究中一般將個體動物成像。此後，用補充飲食維持動物且在12、17及26週時再次成像。

組合並分析藉由DEXA自兩個研究量測之身體瘦肉質量之8週數據。結果顯示於圖8中，其顯示在用OGD1.0.0抗體治療8週後，全身瘦肉質量及腿部瘦肉質量出現劑量反應性增加。數據表示為平均值±SEM。研究中包括之個體數目為(對於僅投與媒劑) n=11、(對於3 mg/kg抗體) n=6、(對於10 mg/kg) n=10及(對於30 mg/kg) n=8。在所測試所有抗體劑量下，全身瘦肉質量及腿部瘦肉質量相對於媒劑治療對照之增加皆在統計學上顯著($p<0.05$)。此外，發現經30 mg/kg治療之個體之腿部瘦肉質量相對於10 mg/kg之增加亦具有統計學顯著性($p<0.05$)。

有趣的是，如圖9中所示，在第二研究中經10 mg/kg及30 mg/kg OGD1.0.0抗體治療個個體之間，身體瘦肉質量之增加在第7周最後一次抗體劑量後仍持續數周時間。數據顯示為在每一時間點與PBS媒劑相比之差異。在所顯示所有週數時，在較高劑量下相對於對照之增加

皆在統計學上顯著($p < 0.05$)。在第4週及第8週時，在較低劑量下之增加在統計學上顯著($p < 0.09$)。

藉由CT掃描來量測OGD1.0.0抗體治療對位於腰椎L3-L5之脊柱背側之軸上肌體積之效應。如圖10A及圖10B中所示，與投與PBS之對照相比，在經10 mg/kg ($n=5$)及30 mg/kg ($n=3$) OGD1.0.0抗體治療8週之個體動物中，軸上肌體積顯著增加。肌肉體積之增加在統計學上顯著($p < 0.05$)。

圖11係在經30 mg/kg OGD1.0.0抗體治療4週後來自實例性測試個體之軸上肌之3D呈像。與基線(左圖)相比，所得肌肉體積增加22%，其在視覺上明顯(右圖)。

實例9

OGD1.0.0抗體缺少Fc結構域效應子功能

使用表面電漿共振測試在Fc區中包括三個突變之OGD1.0.0抗體之結合，已知該等突變可消除Fc γ 受體(Fc γ R)與一組Fc γ 受體之結合。所有實驗皆係使用Biacore T200儀器(GE HealthCare)來實施。簡言之，在感測晶片-SA上經由捕獲有約100 RU之OGD1.0.0抗體之生物素標籤捕獲100 RU之GDF-8，之後流過在0-21 μ M (對於CD32a-131H、CD16a-158V、CD32b)及0-270 nM (對於CD64)濃度範圍內之Fc γ R。對於每一Fc γ R結合實驗，使用單循環動力學模式連續實施注射。結合及解離期各自持續120 s。在解離期結束時，在最後一次注射後，使用0.1% TFA溶液之20s脈衝使含有GDF-8之表面再生。

觀察到未與CD16、CD32a及CD64結合。與之相比，觀察到與CD32b之結合，但僅在所測試最高濃度(21 μ M)下觀察到。由於缺少21 μ M以上之數據點，未測定準確Kd，但可假定其高於21 μ M，此與野生型IgG1分子之Kd (即，2-4 μ M)相比視為極弱。該等結果指示，OGD1.0.0抗體將不具有或具有顯著降低之誘導效應子功能之能力。

實例10

與GDF-8結合之抗GDF-8抗體之晶體結構

如此實例中所解釋，解析與人類GDF-8結合之嵌合小鼠及人類化抗GDF-8抗體之晶體結構並使用其來確定抗體及GDF-8內彼此接觸之胺基酸之身份。

自含有與人類IgG1恆定區接合之鼠類VH及VL區(分別係SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:5)之嵌合抗GDF-8抗體製備Fab片段。然後將Fab片段與人類GDF-8蛋白質混合以形成結合複合體。在50 mM tris鹽酸鹽(pH 7.5)及100 mM氯化鈉中將蛋白質複合體濃縮至10.75 mg/mL。使用在18°C下針對含有20% PEG MME 5000及100 mM雙tris (pH 6.5)之溶液平衡之懸滴法來形成晶體。以類似方式製備含有自人類化抗GDF-8抗體OGD1.0.0製備之Fab及GDF-8之晶體，只是針對含有20% PEG 3350及200 mM氯化鈉之無緩衝溶液平衡蛋白質溶液。

在 SER-CAT, Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory之ID光束線上收集每一晶體之單波長(1.0Å)數據。每一數據集使用冷卻至-180°C之單晶。使用DENZO及Scalepack處理數據(Z. Otwinowski 及 W. Minor, 「Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode」, Methods in Enzymology, 第276卷: Macromolecular Crystallography, 部分A, 第307-326頁, 1997, C.W. Carter, Jr.及R. M. Sweet編輯, Academic Press (New York)) (以引用方式併入)。藉由分子置換使用程式AMORE來解析與GDF-8複合之嵌合抗體之結構(Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 57, 1367-1372) (以引用方式併入)。用於分子置換搜索中之探針係PDB條目1HZH。在精修之前，隨機選擇5%之數據並命名為R_{自由}測試集以監測精修進展。然後在Coot內利用一系列約缺圖重新構建每一複合體之

結構(Emsley, P.及Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 60, 2126–2132) (以引用方式併入)。精修統計學列示於表8中。以類似方式解析與GDF-8複合之人類化OGD1.0.0之結構，只是所用探針係嵌合抗體之結構。

表8： 抗體:GDF-8共晶體結構之精修統計學

模型精修	嵌合抗體-GDF-8 複合體	人類化抗體-GDF-8複合體
最大解析度(Å)	1.76	2.70
R _{工作} (%)	17.9	21.4
R _{自由} (%)	20.6	30.4
平均B值(Å ²)	27.4	25.7
來自理想幾何結構之Rms偏差 鍵(Å)	0.010	0.009
角度(°)	1.08	1.32
水分子	1047	0
離子	5個甘油	0

基於共晶體結構推斷之抗體及GDF-8中彼此接觸之殘基列示於表9中，其中在來自VH鏈之抗體殘基之前具有「H」且參照SEQ ID NO:3進行編號。來自VL鏈之殘基位於「L」之後且參照SEQ ID NO:5來編號。來自成熟人類GDF-8之編號係參照SEQ ID NO:1進行編號。若殘基含有至少一對接觸原子，則將該等殘基定義為彼此接觸。若原子之接觸比 $C < 1.3$ ，則將該等原子定義為接觸原子，其中 $C = D_{12} \div (R_1 + R_2)$ ， D_{12} 係原子之間之距離， R_1 係原子1之vdW半徑且 R_2 係原子2之vdW半徑。在實踐中，接觸原子之間之平均距離係約4.7 Å，但在任一具體情形中，實際距離根據所論述原子之類型而變化。

表9： 在共晶體結構中觀察到之抗體與GDF-8之間之殘基接觸

抗體殘基	GDF-8殘基
H30(SER)	25(GLU)
H31(SER)	25(GLU) 、 36(LYS)
H32(TYR)	36(LYS)
H33(ALA)	33(ILE)
H47(TRP)	93(ILE)
H50(THR)	33(ILE) 、 87(PHE) 、 93(ILE)
H51(ILE)	87(PHE)
H52(SER)	29(TRP) 、 30(ASP) 、 87(PHE)
H52A(SER)	25(GLU) 、 29(TRP) 、 30(ASP)
H53(GLY)	30(ASP)
H54(GLY)	30(ASP)
H55(SER)	30(ASP)
H56(TYR)	30(ASP) 、 31(TRP)
H56(TYR)	87(PHE)
H57(THR)	87(PHE) 、 90(LYS) 、 91(GLU)
H58(SER)	87(PHE) 、 91(GLU) 、 92(GLN) 、 93(ILE)
H64(LYS)	91(GLU)
H95(GLN)	33(ILE) 、 85(LEU)
H96(ASP)	33(ILE) 、 34(ALA) 、 36(LYS) 、 85(LEU)
H97(TYR)	33(ILE) 、 35(PRO) 、 83(ASN) 、 84(MET) 、 85(LEU) 、 95(TYR)
L30(SER)	95(TYR)
L31(THR)	83(ASN) 、 95(TYR)
L32(ALA)	95(TYR)
L50(SER)	95(TYR)
L91(HIS)	85(LEU) 、 95(TYR)
L92(TYR)	93(ILE) 、 94(ILE) 、 95(TYR)
L93(SER)	93(ILE) 、 94(ILE)
L94(THR)	91(GLU) 、 92(GLN) 、 93(ILE)
L96(TRP)	33(ILE) 、 85(LEU) 、 93(ILE)

實例11

抗體VH及VL區之進一步人類化

基於與GDF-8共結晶之抗GDF-8抗體之序列分析及結構，修飾抗體VH及VL區以嘗試使其序列進一步人類化。進一步人類化VH區之序列比對顯示於圖1A中。進一步人類化VL區之序列比對顯示於圖1B中。在產生含有新VH及VL區之表現構築體後，在瞬時轉染COS-1細胞中產生抗體並使用標準技術來純化。然後如本文所述來測試抗體對GDF-8之結合親和性及中和活性。結果報告於表10中。

● 將來自人類化VH0及VL0區(其源自鼠類抗體)之CDR2胺基酸序列分別與來自人類生殖細胞系VH區DP-47及VL區DPK-9之CDR2序列進行比較。將VH0及VL0 CDR2序列中所有不同於人類序列之殘基皆變為人類殘基。將新VH及VL區分別命名為VH2 (SEQ ID NO:66)及VL2 (SEQ ID NO:67)。在競爭性ELISA實驗中測試使用VH2與VL0區以及VH0與VL2區產生之完整抗體與GDF-8之結合。結果顯示，完全人類化之VH CDR2顯著降低GDF-8結合，而完全人類化之VL CDR2不降低抗原結合。

● VH及VL區之進一步人類化係基於共晶體結構。在此處，VH及VL區之CDR中之小鼠源殘基僅在共晶體結構中觀察到其接觸GDF-8殘基時才予以保留。否則，所有VH及VL CDR殘基皆分別變為DP-47及DPK9中之相應的人類殘基，以生成VH3 (SEQ ID NO:68)及VL3 (SEQ ID NO:69)。在競爭性ELISA實驗中，包含VH3及VL0之抗體(即，OGD1.3.0)顯示活性顯著損失，而包含VH0及VL3之抗體(即，OGD1.0.3)似乎保留全部活性。

基於VL2中CDR2之序列，VL3之位置50經丙胺酸取代(即，S50A)以產生VL4 (SEQ ID NO:71)。使用此VL區製備之包含VH0及VL4之抗體(即，OGD1.0.4)保留實質活性。將不同突變W96L引入VL3

之CDR3中以產生VL5 (SEQ ID NO:73)。然而，使用此VL區製備之包含VH0及VL5之抗體(即，OGD1.0.5)顯示與OGD1.0.0相比降低之活性。

亦將新突變引入重鏈可變區中。將兩個取代(即M99F及N101D)引入CDR3中，以形成VH4 (SEQ ID NO:70)。使用此VH區製備之包含VH4及VL0之抗體(即，OGD1.4.0)具有顯著降低之活性，此與降低之對GDF-8之結合親和性相關。在CDR2中，實施G53S取代以產生VH5 (SEQ ID NO:72)。使用此VH區製備之包含VH5及VL0之抗體(即，OGD1.5.0)保留實質活性。

表10：進一步人類化抗體VH及VL區之表現及活性

抗體形式	與 OGD1.0.0 相比之表現	在蛋白 質A之後 之所關 注峰 (POI)	與 OGD1.0.0 相比之藉由 ELISA獲得 之IC ₅₀	藉由SPR 獲得之對 GDF-8之 結合親和 性(K _D)	與OGD1.0.0 相比之藉由 報導基因分 析獲得之 IC ₅₀
OGD1.0.0	1X	>99%	1X	2.59 pM	1X
OGD1.0.2	0.9X, 1.2X	98.60%	0.91X	1.46 pM	1.03X
OGD1.0.3	0.8X	98.60%	0.96X	3.17 pM	0.85X
OGD1.0.4	1.3X	>99%	0.61X	2.46 pM	1.54X
OGD1.0.5	1.4X	>99%	5.94X	57 pM	無活性
OGD1.2.0	0.5X	N/A	N/A	N/A	N/A
OGD1.3.0	0.5X	N/A	N/A	N/A	N/A
OGD1.4.0	0.4X	>99%	1.71X	284 pM	7.5X
OGD1.5.0	0.4X	>99%	0.88X	9.24 pM	1.3X

出於所有目的，本申請案中所引用之所有出版物、專利、專利申請案及其他文件皆係全文以引用方式併入本文中，併入程度如同個別指示每一個別出版物、專利、專利申請案或其他文件皆出於所有目的以引用方式併入一般。

儘管已闡釋並描述多個特定實施例，但應瞭解，可在不背離本發明精神及範疇之情形下作出各種改變。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商輝瑞大藥廠
米歇爾 M 麥德
凱文 D 派瑞斯
詹姆士 R 艾波葛
<120> 經改良之對抗 GDF-8 的拮抗劑抗體及其用途
<130> PC071914
<150> 61/660,232
<151> 2012-06-15
<160> 73
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人
<400> 1

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

<210> 2
<211> 348
<212> DNA
<213> 小家鼠
<400> 2
gaagtgca gc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc a tgtcttgggt tcgccagact 120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gttgtagtta cacctcctat 180
ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagctcag gctcaggac acggccatgt attactgtgc aagacaagac 300
tatgcta tga actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcttca 348
<210> 3
<211> 116
<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 321

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 4

gacattgaga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
atcacctgca aggccagtica ggatgtgagt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca	120
ggacaatctc ctaaactact gctttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat	180
cggttcactg gcagtgatc tgggacggat ttacatttca ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcgggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 6
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段

<400> 6
gaggiccaac tattagaatc gggaggcggc ctggttcagc caggagggag tctcaggctt 60
agttgcgctg cgtcgggatt caccctttca agttacgcaa tgtcatgggt tcgtcaggca 120
ccggggaaaag gcttagagtg ggtgtcaact attagctctg gcggtagcta tacgtcgtat 180
cctgactctg tgaagggacg atttacaata agccgggaca attctaaaaa cactttgtac 240
ctacagatga attccttgag agccgaagat accgccgict actattgtgc gaagcaagat 300
tacgctatga actattgggg tcaagggaca atggtaacgg tatcctcc 348

<210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段

<400> 7

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段

<400> 8
gacattcaaa tgacccaaag cccttcctcc ttaagcgcat cagtaggtga ccgagttaca 60
ataacgigta aagcgagcca agaigtgagt acigcagtag cgiggatatca gcaaaagcca 120
gggaaggctc cgaaactatt gatttactcc gcctcttaca gatatacggg cgttccgat 180
aggtttagtg gaagigggtc gggtacggac ttaccctga ctatacgtc acttcagcca 240
gaggattttg ctacctacta ttgccaacag cattattcaa caccgiggac attcggccag 300
ggaactaagg tcgaaataaa a 321

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段

<400> 9

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 11

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 12

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr
1 5

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 13

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 14

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 15

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 16
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 16
cgaaccgtag cggcaccgtc agtattcata ttccctccat cggacgagca attgaaaagt 60
gggacagctt cggtcgtgtg tctcttgaat aacttttacc ccagagaagc taaggccag 120
tggaaagtig acaatgcgtt acagagcgga aattctcaag aatccgttac tgaacaggat 180
agtaaggatt ctacgtattc acttagcagt actctgaccc tatcaaaggc agattatgaa 240
aaacacaagg tatacgccgt cgaggtagcg catcaaggct tatccagccc agttacaaaa 300

tcitttaaca ggggtgagtg t 321

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

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

<210> 18
<211> 990
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有取代突變之人類序列

<400> 18
gcctccacaa aaggaccatc tgtttttccc ttggcgccat caagtaaatic tacttccgga 60
ggtagcgctg cgcttggctg cctcgtgaaa gactatttcc cagaacctgt cacagtctcg 120
tggaatagtg gtgctttaac ctccggcgta catacttttc ctgctgtact tcaatcaagc 180
ggactgtact cattatcgtc tglagtcacg gtcccgagtt cttcactcgg aacacagact 240
tataatgca acgttaatca laagcctagc aacaccaagg ttgacaaaaa ggtggaacca 300
aatcgtgcg ataagacgca cacatgtcca ccctgtcctg caccagaagc tctgggcgcg 360
ccatcggttt tcttgttccc acccaaacct aaggacacgt taatgataag tgaacgccca 420
gaggtagcat gtgtttagt ggatgtgagc cacgaagatc cggaagtaaa attcaattgg 480
tatglagatg gtgttgaagt ccataacgca aaaactaagc cgagggaaga gcagtacaac 540
tctacttata gggtagtctc cgtactaact gtcctgcacc aagattggct aaatgggaag 600
gaatalaaat gtaaggtttc aaataaggca ctaccagccc cgatagagaa gacaataagc 660
aaagcgaagg ggcaaccaag agagcccaa gigtacacct tgcctccgag cagagaggaa 720
atgacaaaaa atcaagtatc ccttacgtgt ctggtaaagg gattttatcc aagtgacata 780
gcagtgagtg gggagagtaa cggccagcca gaaaacaatt acaaaaccac tcccccggtt 840

ttagatagcg atgggagttt cttttgtac tcaaagtga ccgttgacaa gtcacgatgg 900
cagcaaggta atgtatttag ttgttcgtt atgcatgagg ccctacataa tcactacacg 960
cagaaatctc tctccttaag ccccggaag 990

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有取代突變之人類 CH 區

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 21

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 22

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr
1 5

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 26

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 VL，鼠類 CDR

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 405
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 28
atgaactttg tgctcagctt gattttcctt gccctcattt taaaagggtg ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtcigg gggaggctta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgccatgt cttgggttcg ccagactccg 180
gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctccatcca 240
gacagltga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acaagactat 360
gctatgaact actggggica aggaacctca gtcaccgtct cctca 405

<210> 29
<211> 135
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 29

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met

100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 30
<211> 381
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 30
atggagtcac agattcaggt ctttgtattc ggttttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
gacattgaga tgaccagtc tcacaaattc algtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtc ggaigagagt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca 180
ggacaatctc cttaaactact gctttactcg gcattctacc ggtacactgg agtcctgat 240
cggttcactg gcagtggtac tgggacggat ttactttica ccatcagcag tgtgcaggct 300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcggigga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

<210> 31
<211> 127
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 31
Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

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

Lys Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
100 105 110

Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 32
<211> 95
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

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

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

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

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

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

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

<210> 33

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成蛋白質序列

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 35
<211> 45
<212> DNA
<213> 智人

<400> 35
gccttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgict ctcca 45

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36
Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 37
<211> 46
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
tacttttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgict cctcag 46

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 39
<211> 37
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac 37

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> 智人

<400> 41
ctcactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaac 37

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 43
gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tccigtgcag cccttggatt cacccttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggcttcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctcctat 180
ccagacagtg tgaagggtcg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacaagac 300
tatgctatga actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgcctccc 348

<210> 44
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段

<400> 44
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 VL，鼠類 CDR

<400> 45

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc	60
atcacctgca aggccagica ggatgtgagt actgctgtgg cctggatca gcagaagcct	120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcatcctacc gglacacigg cgtgccctcc	180
cggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttacccctga ccatctcttc cctgcagcct	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcaa cattatagta ctccatggac ctttggcggc	300
ggaacaaagg tggaaatcaa a	321

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala	
20 25 30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Thr Pro Trp	
85 90 95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 47

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 47

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc tigggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggcctggagt ggctcaacc attagtagtg gtggtagtta caccctctat	180
ccagacagtg tgaagggtcg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgcigtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacaagac	300
tatgctatga actactgggg ccagggcacc atgggcaccg tgcctccc	348

<210> 48
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VL，鼠類 CDR

<400> 48
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtgg cctgggtatca gcagaagcct 120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcatcctacc ggtacactgg cgtgccttcc 180
cggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccciga ccatctcctc cctgcagcct 240
gaggacttgc ccacctacia ctgccagcaa cattatagta ctccatggac ctttggccaa 300
ggaacaaagg tggaaatcaa a 321

<210> 49
<211> 405
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 49
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgag 60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctlttagcagc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctccatcca 240
gacagtgtga agggtcgggt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa acaagactat 360
gctatgaact actggggcca gggcaccttg gtcaccgtgt cctcc 405

<210> 50
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 50
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro

[illegible]

$\langle 210 \rangle$	51
$\langle 211 \rangle$	378
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	人工序列

<220>
<223> 人類 VL，鼠類 CDR

[illegible]

$\langle 210 \rangle$	52
$\langle 211 \rangle$	126
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工序列

<220>
<223> 人類 VL，鼠類 CDR

<400> 52

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
35 40 45

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

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
100 105 110

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 53
<211> 405
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 53
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgag 60
gtgcagctgt tggagtcctg gggaggcctg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctcctatcca 240
gacagtgtga agggtcggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa acaagactat 360
gctatgaact actggggcca gggcaccatg gtcaccgtgt cctcc 405

<210> 54
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VH，鼠類 CDR

<400> 54

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 55
<211> 378
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VL，鼠類 CDR

<400> 55
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgac 60
atccagatga cccagtcgcc ctcttccctg tccgcctccg tgggcgacag agtgaccatc 120
acctgcaagg ccagtcagga tgtgagtact gctgtggcct ggtatcagca gaagcctggc 180
aaggccccccta agctgctgat ctactccgca tcttaccggt aacttggcgt gccttcccg 240
ttctccggct ccggctcttg caccgacttc acctgacca tctctccct gcagcctgag 300
gacttcgcca cctactactg ccagcaaat tatagtactc catggacctt tggccaagga 360
acaaagggtgg aaatcaaa 378

<210> 56
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 VL，鼠類 CDR

<400> 56

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
35 40 45

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

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
100 105 110

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 57
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 具有取代突變之人類 CH 區

<400> 57

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 58
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH 及 J 區段：具有取代突變之人類 CH 區

<400> 58

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn 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 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 Lys Val	Glu Pro Lys Ser Cys	Asp Lys Thr His Thr
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Ala Ala Gly	Ala Pro Ser Val Phe
225	230	235
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
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
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> 59		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 小鼠 CDR 及人類 VH · J 區段及 CH		
<400> 59		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1	5	10

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly 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> 60
<211> 1476
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> scFv

<400> 60	
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgac	60
attgagatga cccagtcica caaatlcatg tccacatcag taggagacag ggtcagcatc	120
acctgcaagg ccagtcagga tgtgagtact gctgtagcct ggtatcaaca gaaaccagga	180
caatctccta aactactgct ttactcggca tcctaccggt acactggagt ccttgatcgg	240
ttcactggca gtggatctgg gacggatttc actttcacca tcagcagtgt gcaggctgaa	300
gacctggcag ttattactg tcagcaacat tatagtactc cgtggacgtt tggcggtgga	360

```

acaaaggtgg aaatcaaagg aggcggcggg tcaggcggag gggctcttgg cggtagcgga 420
agctccgaag tgcagctggg ggagcttgg ggaggcttag tgaagcctgg agggctccctg 480
aaactctcct gtcagccctc tggattcact ttcagtagct atgccatgtc ttgggttcgc 540
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcaaccatta gtagtgggtg tagttacacc 600
tcctatccag acagtgtgaa gggtcgaltc accatctcca gagacaatgc caagaacacc 660
ctgtaccctg aaatgagcag tctgaggctt gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaaga 720
caagactatg ctatgaacta ctggggccag ggcacccctg tcaccgtgtc ctctgatcag 780
gagcccaaat ctctgacaa aactcacaca tggccaccgt gcccagcacc tgaagccgct 840
ggggcaccgt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 900
acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggc gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1200
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtaggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtccccg ggtaaa 1476

```

<210> 61
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> scFv

<400> 61

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
 35 40 45

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

Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
 65 70 75 80

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
 100 105 110

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val
130 135 140

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu
145 150 155 160

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
165 170 175

Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr
180 185 190

Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
195 200 205

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
210 215 220

Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

	405		410		415
Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	420	425	430		
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser				
	435	440	445		
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln					
	450	455	460		
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His					
	465	470	475	480	
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	485	490			

<210> 62
 <211> 1476
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> scFv

<400> 62	
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgag	60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtagagcctg ggggggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac cttagcagc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca	180
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctctatcca	240
gacagtgtga agggctcggt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gccagagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa acaagactat	360
gctatgaact actggggcca gggcaccttg gtcaccgtgt cctctggagg cggcgggtca	420
ggcggagggt gctctggcgg tggcggagc tccgacatcc agatgacca gtccccctcc	480
tccctgtccg cctccgtggg cgacagagtg accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg	540
agtactgctg tggcctggta tcagcagaag cctggcaagg cccctaagct gctgatctac	600
tccgcatcct accggtagac tggcgtgcct tcccggttct cggctccgg ctctggcacc	660
gacttcaccc tgaccatctc ctccctgcag cctgaggact tcgccacctt ctactgccag	720
caacattata gtactccatg gacctttggc ggtggaacaa aggtggaaat caaagatcag	780
gagcccaaat ctctgacaa aactcacaca tgcaccacct gccagcacc tgaagccgct	840
ggggcacctg cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acacctcat gatctccgg	900
acctctgagg tcacatgcgt ggtgggtggc gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	960
aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1140
atctccaaag ccaaaaggca gccccgaga ccacaggtgt acacctgtcc cccatcccg	1200
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc	1260
gacatcgccg tggagtgga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1320

cccgtgctgg actccgacgg ctccctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
agggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgaigc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtccccg ggtaaa 1476

<210> 63
<211> 492
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> scFv

<400> 63

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
145 150 155 160

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala
165 170 175

Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
180 185 190

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
195 200 205

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
210 215 220

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

225	230	235	240
Gln His Tyr Ser Thr	Pro Trp Thr Phe	Gly Gly Gly Thr Lys	Val Glu
	245	250	255
Ile Lys Asp Gln Glu	Pro Lys Ser Ser	Asp Lys Thr His	Thr Cys Pro
	260	265	270
Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Ala Ala	Gly Ala Pro Ser	Val Phe Leu Phe
	275	280	285
Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val
	290	295	300
Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His	Glu Asp Pro Glu	Val Lys Phe
	305	310	315
Asn Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro
	325	330	335
Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val Ser	Val Leu Thr
	340	345	350
Val Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys	Cys Lys Val
	355	360	365
Ser Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile	Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala
	370	375	380
Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro	Ser Arg
	385	390	395
Glu Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly
	405	410	415
Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro
	420	425	430
Glu Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser	Asp Gly Ser
	435	440	445
Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg	Trp Gln Gln
	450	455	460
Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu	His Asn His
	465	470	475
Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys	
	485	490	

<210> 64
 <211> 1476
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> scFv

```

<400> 64
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgac    60
atccagaatga cccagtcgcc ctctctccctg tccgcctccg tgggcgacag agtgaccatc    120
acctgcaagg ccagtcagga tgtgagtact gctgtggcct ggtatcagca gaagcctggc    180
aaggcccccta agctgctgat ctactccgca tcctaccggt acactggcgt gccttcccgg    240
ttctccggct cgggccttgg caccgacttc accctgacca tctctccct gcagcctgag    300
gacttcgcca cctactactg ccagcaacat tatagtactc catggacctt tggcggtgga    360
acaaaggctgg aaatcaaagg aggcggcggt tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcgga    420
agctccgagg tgcagctgtt ggagcttggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg    480
agactctcct gtcagcctc tggattcacc tttagcagct atgcatgag ctgggtccgc    540
caggctccag ggaaggggct ggagtggttc tcaaccatta gtagtggtgg tagttacacc    600
tcctatccag acagtgtgaa gggtcgggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg    660
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa    720
caagactatg ctatgaacta ctggggccag ggcacccctg tcaccgtgtc ctctgatcag    780
gagcccaaat ctctgacaa aactcacaca tggccaccgt gccagcacc tgaagccgct    840
ggggcaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg    900
acccttgagg tcacatgcgt ggtgggtggc gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc    960
aactggtagc tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag   1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgttcc tgcaccagga ctggctgaat   1080
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc   1140
atctccaaag ccaaagggca gcccggagaa ccacagggtg acaccctgcc ccatcccg    1200
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc   1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct   1320
cccgtgtctg actccgacgg ctcttcttct ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc   1380
agggtggcagc aggggaacgt ctctctatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac   1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtccccg ggtaaa                                1476

```

```

<210> 65
<211> 492
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> scFv

```

<400> 65

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10          15

```

```

Ala His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20          25          30

```

```

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
35          40          45

```

```

Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

```

50	55	60
Leu 65	Leu 70	Ile 75
Tyr 75	Ser 80	Arg 85
Phe 90	Ser 95	Gly 100
Leu 105	Gln 110	Pro 115
Thr 120	Lys 125	Val 130
Gly 135	Ser 140	Glu 145
Gln 150	Leu 155	Val 160
Arg 165	Ser 170	Tyr 175
Ser 180	Gly 185	Leu 190
Ile 195	Ser 200	Thr 205
Arg 210	Asn 215	Thr 220
Met 225	Ala 230	Tyr 235
Gln 240	Thr 245	Val 250
Ser 255	Pro 260	Lys 265
Pro 270	Ala 275	Val 280
Pro 285	Thr 290	Arg 295
Thr 300	Val 305	Lys 310
Asn 315	Thr 320	Pro 325
Arg 330	Val 335	Leu 340
Thr 345	Val 350	Leu 355

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 66
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人类

<400> 66

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 67

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 68

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

<210> 70
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 70

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

<210> 72
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 72

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有小鼠 CDR 之人類

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

申請專利範圍

1. 一種特異性結合GDF-8之抗體或其抗原結合片段，該抗體或片段包含：

抗體可變重鏈(VH)區，其包含來自由胺基酸序列SEQ ID NO:44定義之該VH區之第一、第二及第三互補決定區(CDR)；及

抗體可變輕鏈(VL)區，其包含來自由胺基酸序列SEQ ID NO:46定義之該VL區之第一、第二及第三互補決定區(CDR)；

其中該VH區在對應於SEQ ID NO:44之殘基編號111 (Kabat位置108)之胺基酸位置處包含白胺酸。

2. 如請求項1之抗體或片段，其中VH CDR1包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:20，VH CDR2包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:21，VH CDR3包含SEQ ID NO:12，VL CDR1包含SEQ ID NO:13，VL CDR2包含SEQ ID NO:14且VL CDR3包含SEQ ID NO:15。
3. 如請求項2之抗體或片段，其中在每一CDR內最多三個非接觸胺基酸殘基經保守取代。
4. 如請求項1之抗體或片段，其中該VH區之第四框架區(FR4)包含SEQ ID NO:44之胺基酸106至116。
5. 如請求項1之抗體或片段，其中該VL區在對應於SEQ ID NO:46之殘基編號100 (Kabat位置100)之胺基酸位置處包含甘胺酸。
6. 如請求項1之抗體或片段，其中該VL區在對應於SEQ ID NO:46之殘基編號100 (Kabat位置100)之胺基酸位置處包含麩醯胺酸。
7. 如請求項5之抗體或片段，其中該VL區之第四框架區包含SEQ ID NO:46之胺基酸98至107。
8. 如請求項6之抗體或片段，其中該VL區之該第四框架區包含SEQ ID NO:9之胺基酸98至107。

9. 如請求項1之抗體或片段，其中該VH區包含胺基酸序列SEQ ID NO:44。
10. 如請求項9之抗體或片段，其中該VL區包含該胺基酸序列SEQ ID NO:46。
11. 如請求項9之抗體或片段，其中該VL區包含該胺基酸序列SEQ ID NO:9。
12. 如請求項1之抗體或片段，其進一步包含衍生自選自由以下組成之群之抗體亞型之抗體恆定重鏈(CH)區：IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。
13. 如請求項12之抗體或片段，其中該IgG亞型進一步選自由以下組成之群：IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。
14. 如請求項13之抗體或片段，其中該IgG亞型係IgG1。
15. 如請求項13之抗體或片段，其中該IgG亞型包含至少一個改變Fc結構域功能之突變。
16. 如請求項12之抗體或片段，其中該抗體或片段之重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO:57。
17. 如請求項1之抗體或片段，其進一步包含抗體恆定輕鏈(CL)區。
18. 如請求項17之抗體或片段，其中該CL區係 κ 或 λ CL區。
19. 如請求項17之抗體或片段，其中該抗體或片段之輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO:17。
20. 如請求項9之抗體或片段，其中該VH區係由核酸序列SEQ ID NO:43編碼。
21. 如請求項1之抗體或片段，其中該抗體或片段以至少 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M或 10^{-11} M之Kd結合GDF-8。
22. 如請求項1之抗體或片段，其中該抗體或片段係選自由以下組成之群：Fab、F(ab')₂、scFv、scFv-Fc、scFv-CH、scFab、scFv-拉

鏈、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、微型抗體、Fv及雙特異性抗體。

23. 如請求項1之抗體，其中該抗體由經轉染細胞產生之量大於在類似條件下產生之其中VH區在Kabat位置108處包含甲硫胺酸之其他方面皆相同之抗體之量。
24. 如請求項23之抗體，其中該抗體由經轉染細胞產生之該量超過在類似條件下產生之該其他方面皆相同之抗體之該量至少約選自由以下組成之群之量：至少約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍及14倍。
25. 一種特異性結合GDF-8之抗體或其抗原結合片段，該抗體或片段包含：與胺基酸序列SEQ ID NO:44至少95%一致之VH區，及與胺基酸序列SEQ ID NO:46至少95%一致之VL區，其中該VH區在Kabat位置108處包含白胺酸。
26. 一種特異性結合GDF-8之抗體，其包含由胺基酸序列SEQ ID NO:58定義之抗體重鏈及由胺基酸序列SEQ ID NO:59定義之抗體輕鏈。
27. 如請求項26之抗體，其中該抗體基本上由兩條各自由胺基酸序列SEQ ID NO:58定義之抗體重鏈及兩條各自由胺基酸序列SEQ ID NO:59定義之抗體輕鏈組成。
28. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1之抗體及醫藥上可接受之載劑。
29. 一種分離多核苷酸，其包含編碼特異性結合GDF-8之抗體或其片段之至少一條多肽鏈之核酸序列，該抗體或片段包含：

抗體可變重鏈(VH)區，其包含來自由胺基酸序列SEQ ID NO:44定義之該VH區之第一、第二及第三互補決定區(CDR)，

其中該VH區在對應於SEQ ID NO:44之殘基編號111 (Kabat位

置108)之胺基酸位置處包含白胺酸；及

抗體可變輕鏈(VL)區，其包含來自由胺基酸序列SEQ ID NO:46定義之該VL區之第一、第二及第三互補決定區(CDR)，

其中該VL區在對應於SEQ ID NO:46之殘基編號100 (Kabat位置100)之胺基酸位置處包含甘胺酸。

30. 如請求項29之分離多核苷酸，其中編碼該VH區之該核酸序列係核酸序列SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:49，且其中編碼該VL區之該核酸序列係核酸序列SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:51。
31. 如請求項29之分離多核苷酸，其進一步包含編碼人類抗體CH區之核酸序列。
32. 如請求項29之分離多核苷酸，其進一步包含編碼人類抗體CL區之核酸序列。
33. 如請求項32之分離多核苷酸，其中該CL區係由核酸序列SEQ ID NO:16編碼。
34. 一種表現載體，其包含如請求項29之多核苷酸。
35. 一種宿主細胞，其包含可操作連接至調節序列之如請求項29之多核苷酸。
36. 一種產生特異性結合GDF-8之抗體或其片段之方法，其包含培養如請求項35之宿主細胞及回收藉此產生之該抗體或片段之步驟。
37. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備增加哺乳動物之肌肉質量或強度之藥物的用途。
38. 如請求項37之用途，其中該肌肉係骨骼肌或心肌。
39. 如請求項37之用途，其中該骨骼肌在呼吸中發揮作用。
40. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備治療肌肉病症之藥物的用途。

41. 如請求項40之用途，其中該肌肉病症係選自由以下組成之群：
肌營養不良、肌萎縮、肌少症、惡病質、肌肉耗損症候群、年齡相關性肌肉質量或強度損失及衰弱症。
42. 如請求項41之用途，其中該肌肉病症係肌營養不良。
43. 如請求項42之用途，其中該肌營養不良係杜興氏肌營養不良
(Duchenne muscular dystrophy)。
44. 如請求項43之用途，其中治療係有效提高該個體在6分鐘步行測試中之表現。
45. 如請求項43之用途，其中將該抗體投與亦在用糖皮質素治療之個體。
46. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備預防肌肉病症之藥物的用途。
47. 如請求項46之用途，其中該肌肉病症係選自由以下組成之群：
肌營養不良、肌萎縮、肌少症、惡病質、肌肉耗損症候群、年齡相關性肌肉質量或強度損失及衰弱症。
48. 如請求項47之用途，其中該肌肉病症係肌營養不良。
49. 如請求項48之用途，其中該肌營養不良係杜興氏肌營養不良。
50. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備治療或預防神經肌肉病症之藥物的用途。
51. 如請求項50之用途，其中該神經肌肉病症係ALS。
52. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備治療或預防代謝性病變之藥物的用途。
53. 如請求項52之用途，其中該代謝性病變係選自由以下組成之群：2型糖尿病、代謝症候群、症候群X、胰島素抗性及葡萄糖耐受不良。
54. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備治療或預防脂

肪組織病症之藥物的用途。

55. 如請求項54之用途，其中該脂肪組織病症係肥胖症。
56. 一種如請求項1之抗體或其抗原結合片段用於製備治療或預防骨損失病症之藥物的用途。
57. 如請求項56之用途，其中該骨損失病症係選自由以下組成之群：骨質疏鬆、骨量減少、骨關節炎及骨質疏鬆相關性骨折。
58. 一種特異性結合GDF-8之抗體，其包含：
由SEQ ID NO:44組成之抗體VH區及由SEQ ID NO:46組成之抗體VL區，
其中該抗體在類似條件下之表現程度高於包含由SEQ ID NO:7組成之VH區及由SEQ ID NO:9組成之VL區之其他方面皆相同之另一抗體。
59. 如請求項58之抗體，其中該抗體之表現程度比該另一抗體高至少約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍或14倍之量。
60. 如請求項59之抗體，其中當在COS細胞中表現時，該抗體之表現係該另一抗體之約12倍。
61. 如請求項59之抗體，其中當在CHO細胞中表現時，該抗體之表現係該另一抗體之約6倍。

抗 GDF-8 抗體可變重鏈(VH)區胺基酸比對

鼠類 VH	1	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQT</u>	40	(SEQ ID NO: 3)
DP-47	1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 33)
人類化	VH0	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 44)
人類化	VH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 7)
人類化	VH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 66)
人類化	VH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 68)
人類化	VH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 70)
人類化	VH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	<u>SYAMSWVRQA</u>	40	(SEQ ID NO: 72)
鼠類 VH	41	PEKRLLEWVA	<u>TISGGG</u> SYTSYPD <u>SVKGRFTISRDN</u> AKNTLY	80	(SEQ ID NO: 3)
DP-47	41	PGKGLEWVSA	<u>ISGGG</u> STYYAD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 33)
人類化	VH0	PGKGLEWVST	<u>ISGGG</u> SYTSYPD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 44)
人類化	VH1	PGKGLEWVST	<u>ISGGG</u> SYTSYPD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 7)
人類化	VH2	PGKGLEWVSA	<u>ISGGG</u> STYYAD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 66)
人類化	VH3	PGKGLEWVSA	<u>ISGGG</u> STYYAD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 68)
人類化	VH4	PGKGLEWVST	<u>ISGGG</u> SYTSYPD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 70)
人類化	VH5	PGKGLEWVST	<u>ISGGG</u> SYTSYPD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLY	80	(SEQ ID NO: 72)
鼠類 VH	81	LQMSSLRSEDTAMYYCAR	<u>QDYAMN</u> YWGGQT <u>SVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 3)
DP-47	81	LQMNSLRAEDTAVYYCAK		98	(SEQ ID NO: 33)
人類化	VH0	LQMNSLRAEDTAVYYCAK	<u>QDYAMN</u> YWGGQT <u>LVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 44)
人類化	VH1	LQMNSLRAEDTAVYYCAK	<u>QDYAMN</u> YWGGQT <u>MTVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 7)
人類化	VH2	LQMNSLRAEDTAVYYCAK	<u>QDYAMN</u> YWGGQT <u>LVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 66)
人類化	VH3	LQMNSLRAEDTAVYYCAK	<u>QDYAMN</u> YWGGQT <u>LVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 68)
人類化	VH4	LQMNSLRAEDTAVYYCAK	<u>QDYAFD</u> YWGGQT <u>LVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 70)
人類化	VH5	LQMNSLRAEDTAVYYCAK	<u>QDYAMN</u> YWGGQT <u>LVTVSS</u>	116	(SEQ ID NO: 72)

*

圖 1A

圖式

抗體可變輕鏈(VL)區胺基酸比對

鼠類 VL	1	DIEMTQSHKFMSTSVGDRVSI	<u>TC</u>	<u>KASQDVSTAVAWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:5)
DPK-9	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>RASQSISSYLNWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:32)
人類化	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>KASQDVSTAVAWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:46)
人類化	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>KASQDVSTAVAWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:9)
人類化	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>KASQDVSTAVAWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:67)
人類化	VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>RASQSI</u> <u>STALNWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:69)
人類化	VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>RASQSI</u> <u>STALNWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:71)
人類化	VL5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	<u>TC</u>	<u>RASQSI</u> <u>STALNWYQQKP</u>	40	(SEQ ID NO:73)
鼠類 VL	41	GQSPKLLLY	<u>SASYRYT</u>	GVPDRFTGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:5)
DPK-9	41	GKAPKLLIY	<u>AASSLQSGVPSR</u>	FGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:32)
人類化	VL0	GKAPKLLIY	<u>SASYRYT</u>	GVPDRFGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:46)
人類化	VL1	GKAPKLLIY	<u>SASYRYT</u>	GVPDRFGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:9)
人類化	VL2	GKAPKLLIY	<u>AASSLQSGVPSR</u>	FGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:67)
人類化	VL3	GKAPKLLIY	<u>SASSLQSGVPSR</u>	FGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:69)
人類化	VL4	GKAPKLLIY	<u>AASSLQSGVPSR</u>	FGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:71)
人類化	VL5	GKAPKLLIY	<u>SASSLQSGVPSR</u>	FGSGSGTDF	80	(SEQ ID NO:73)
*						
鼠類 VL	81	EDLAVYCC	<u>QQHYSTPWT</u>	FGGGTKLEIK	107	(SEQ ID NO:5)
DPK-9	81	EDFATYYCC	<u>QQSYSTP</u>		95	(SEQ ID NO:32)
人類化	VL0	EDFATYYCC	<u>QQHYSTPWT</u>	FGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:46)
人類化	VL1	EDFATYYCC	<u>QQHYSTPWT</u>	FGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:9)
人類化	VL2	EDFATYYCC	<u>QQHYSTPWT</u>	FGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:67)
人類化	VL3	EDFATYYCC	<u>QQSYSTPWT</u>	FGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:69)
人類化	VL4	EDFATYYCC	<u>QQSYSTPWT</u>	FGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:71)
人類化	VL5	EDFATYYCC	<u>QQSYSTPLT</u>	FGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:73)

圖 1B

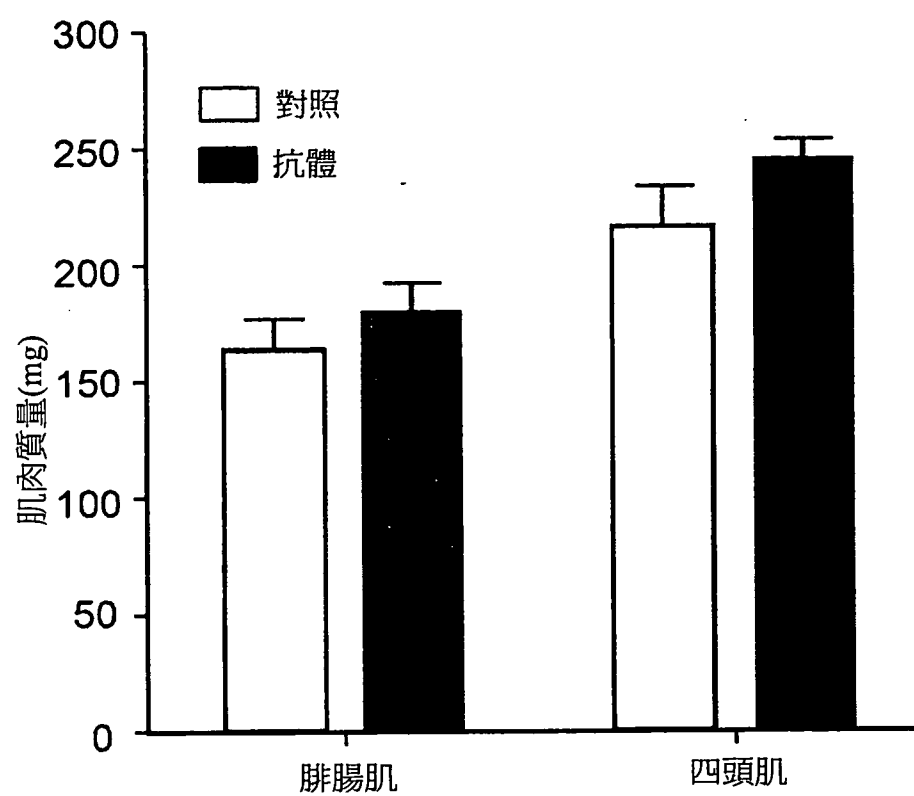


圖 2A

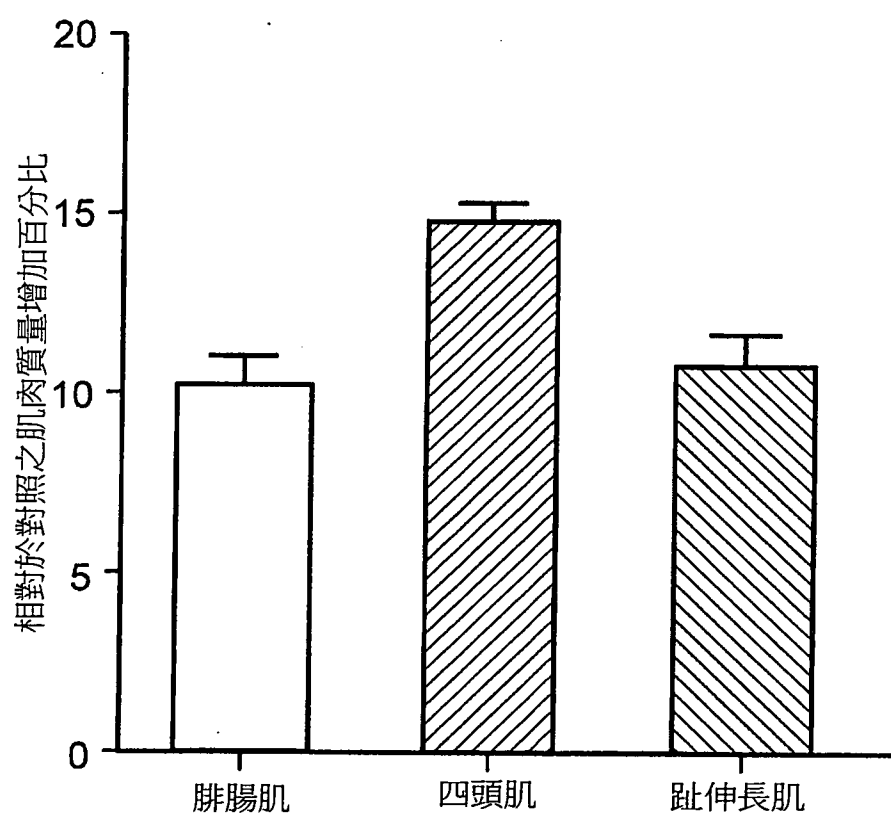


圖 2B

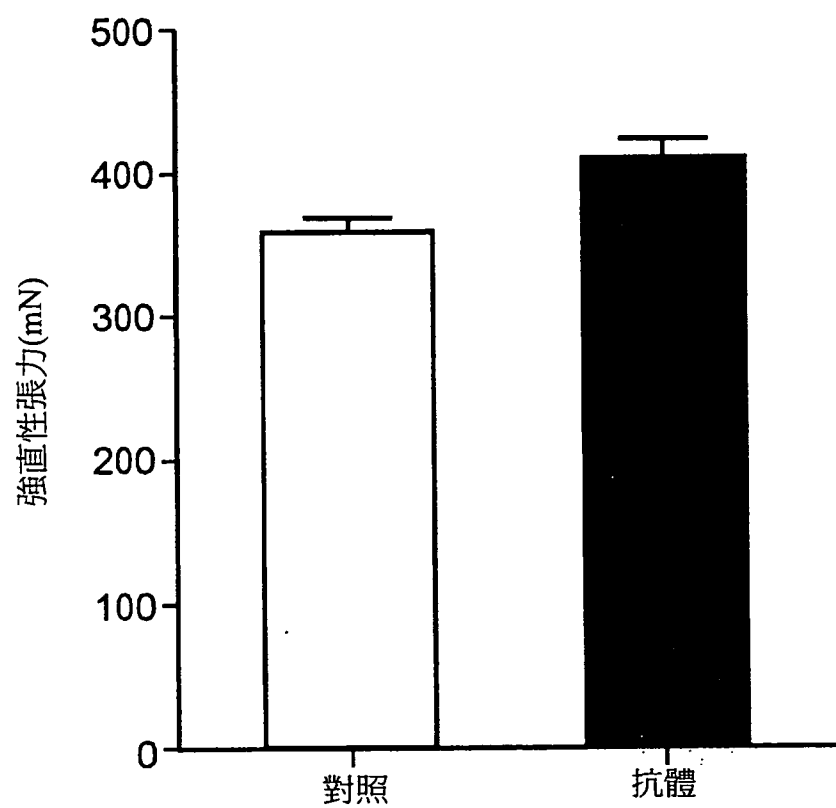


圖 3

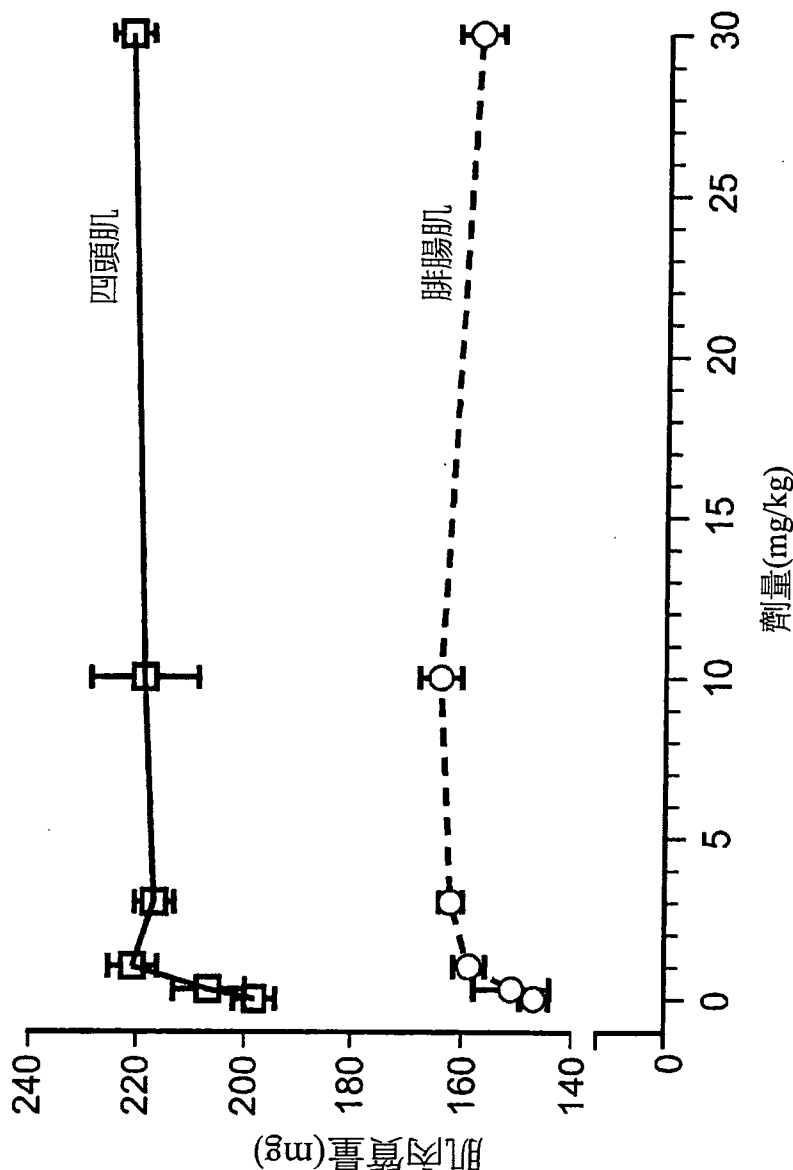


圖 4A

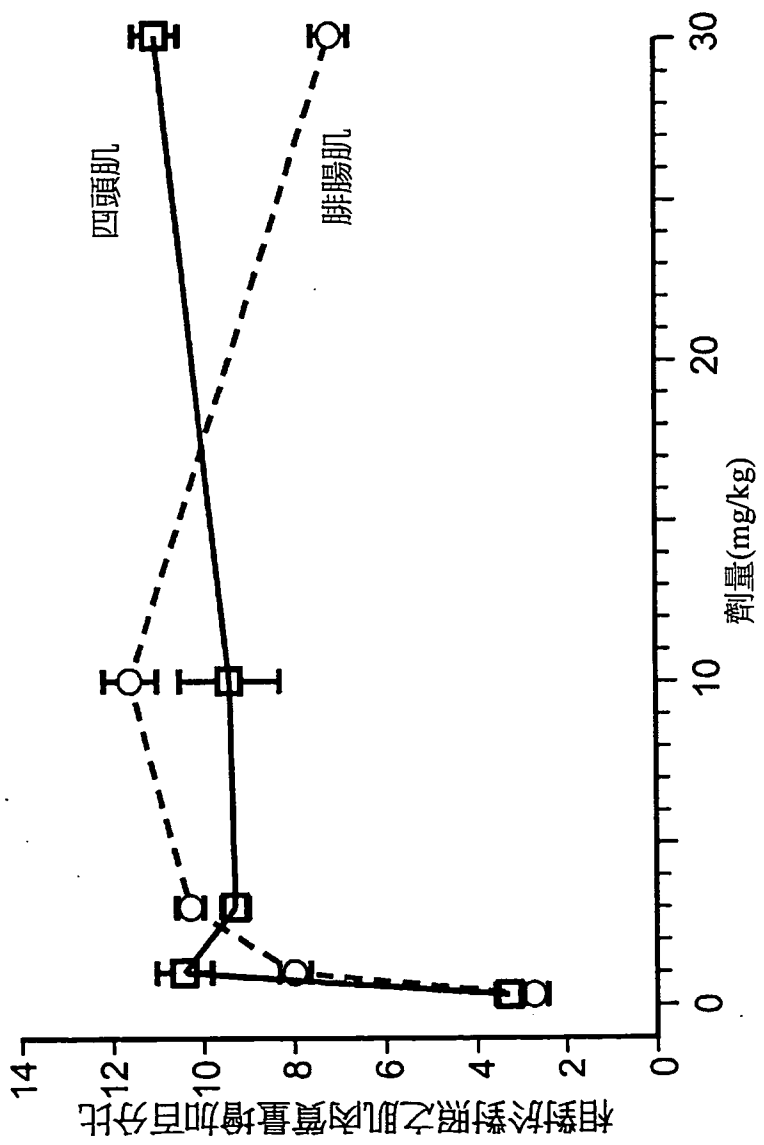


圖 4B

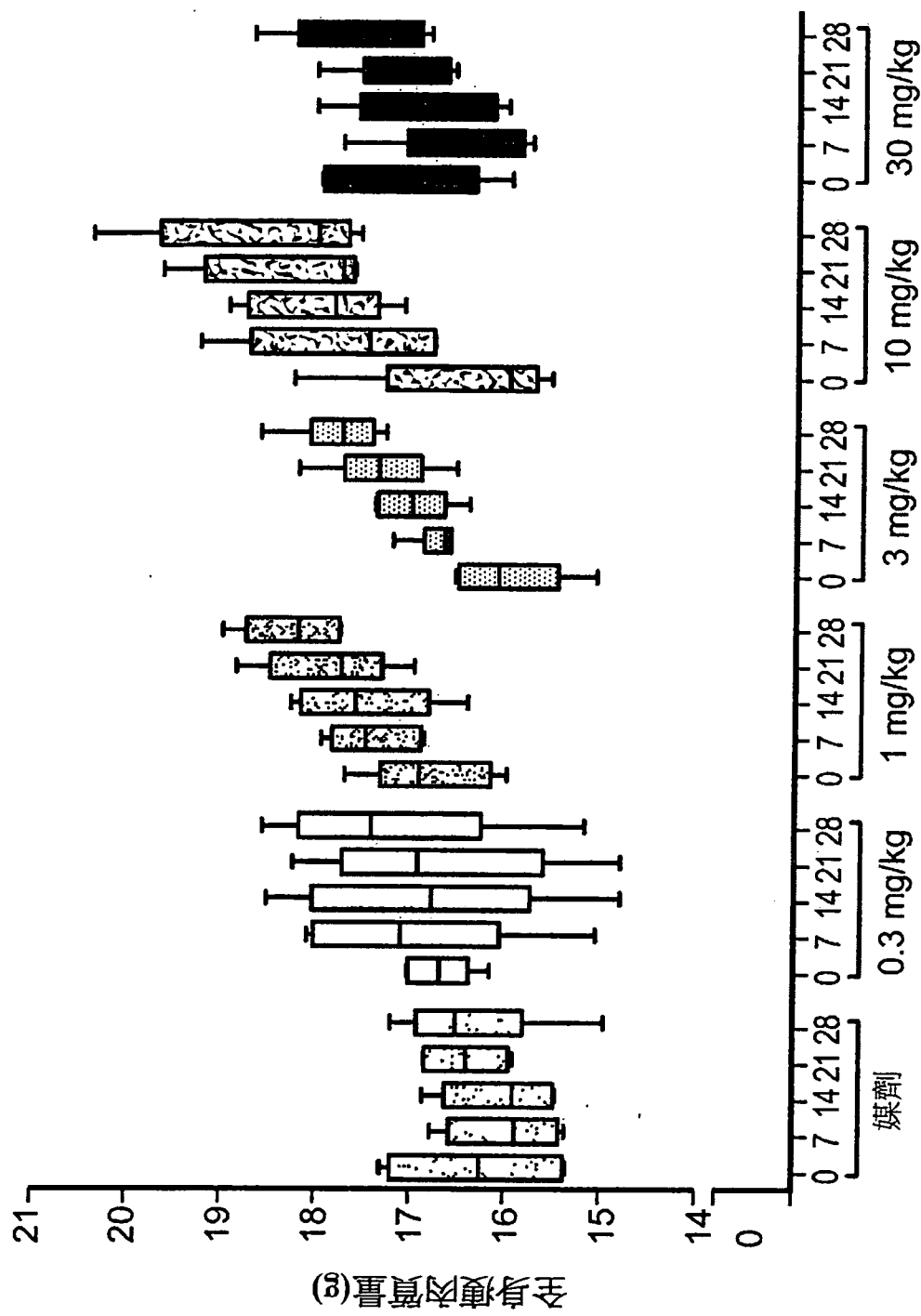


圖 5A

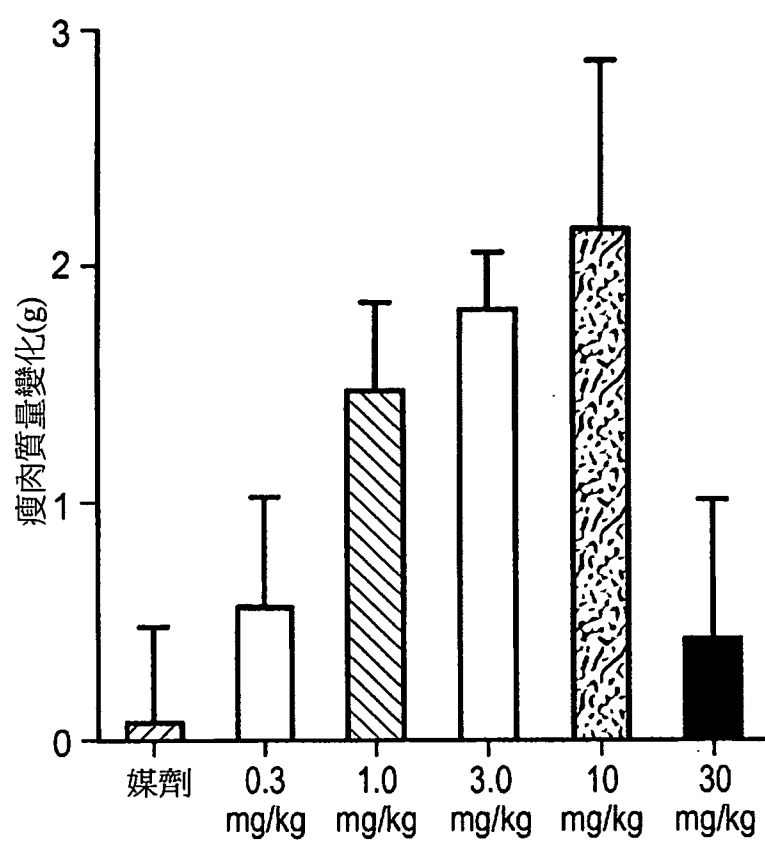


圖 5B

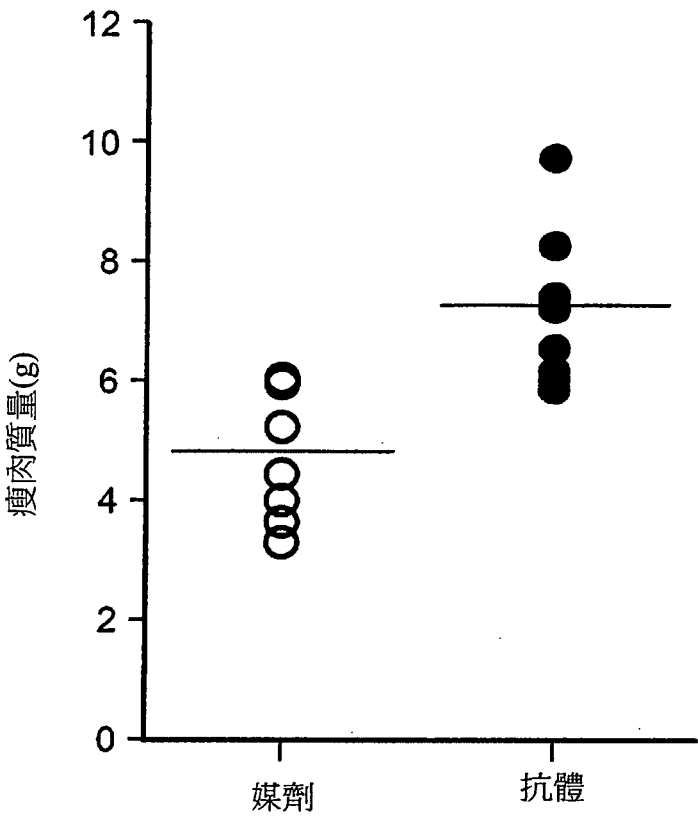


圖 6A

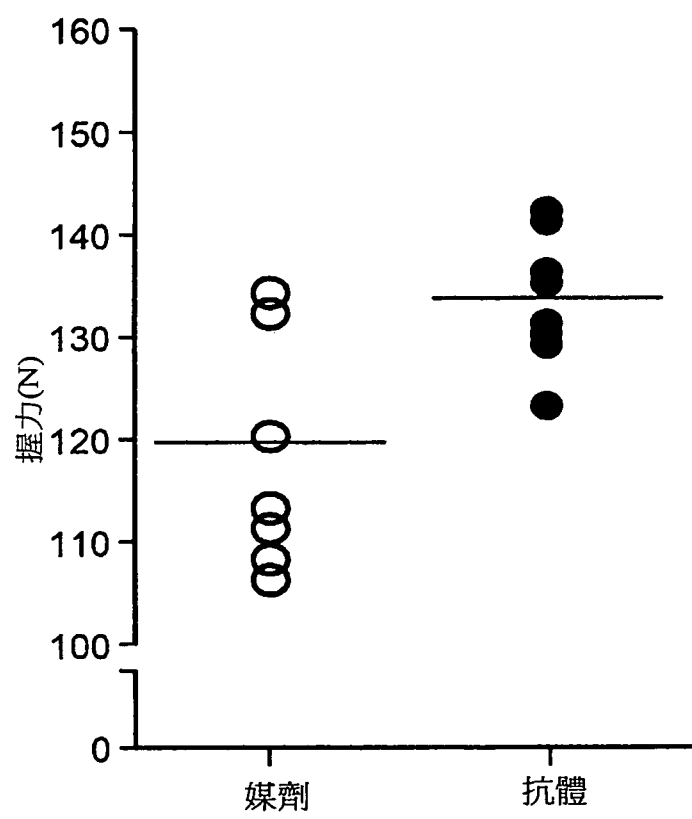


圖 6B

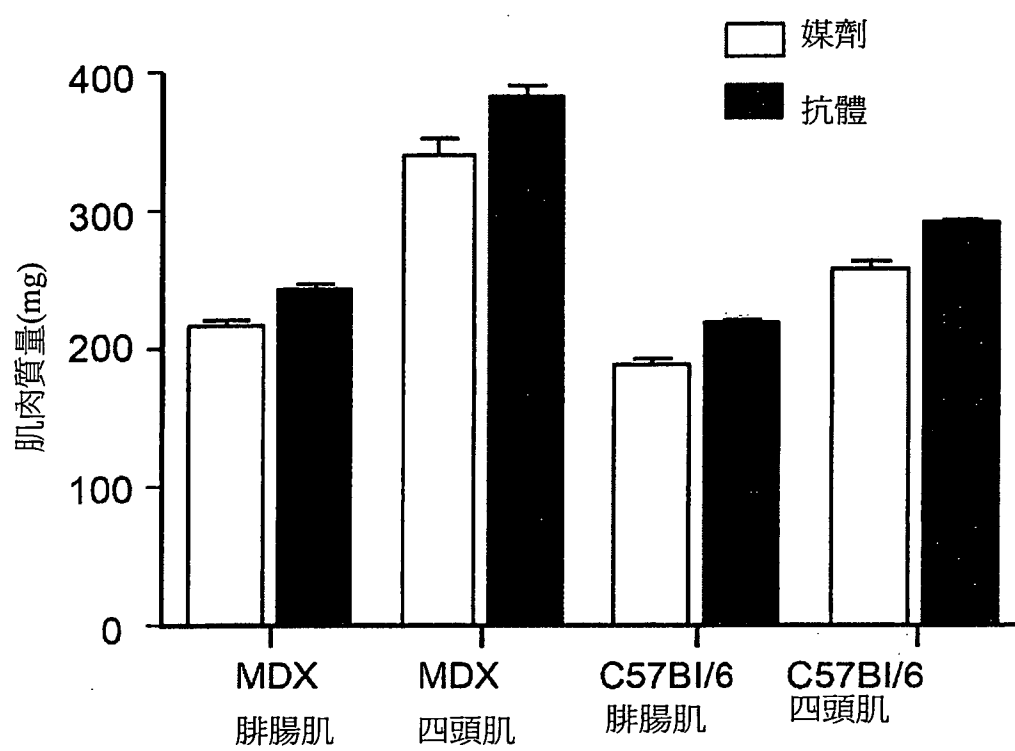


圖 7A

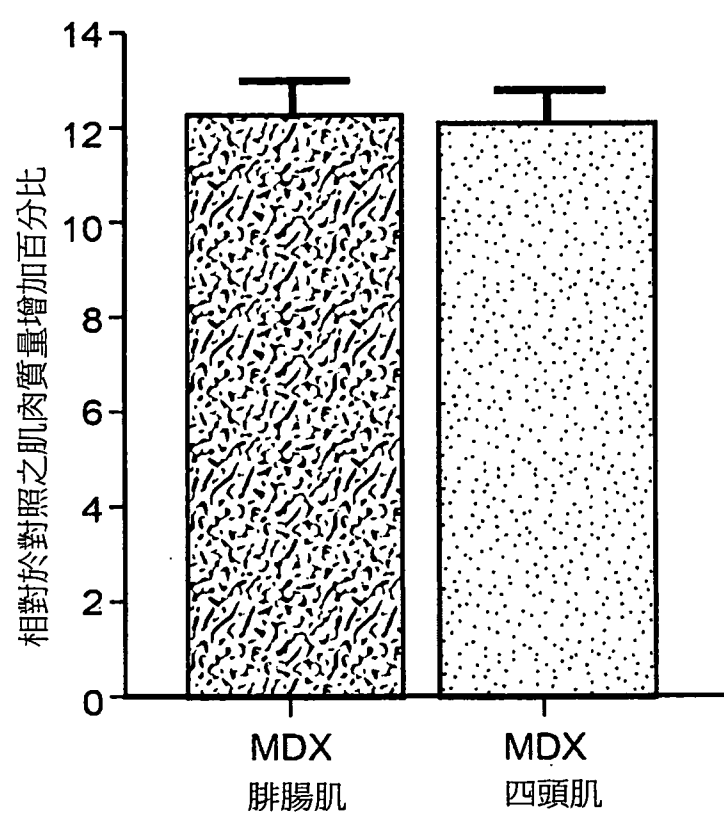


圖 7B

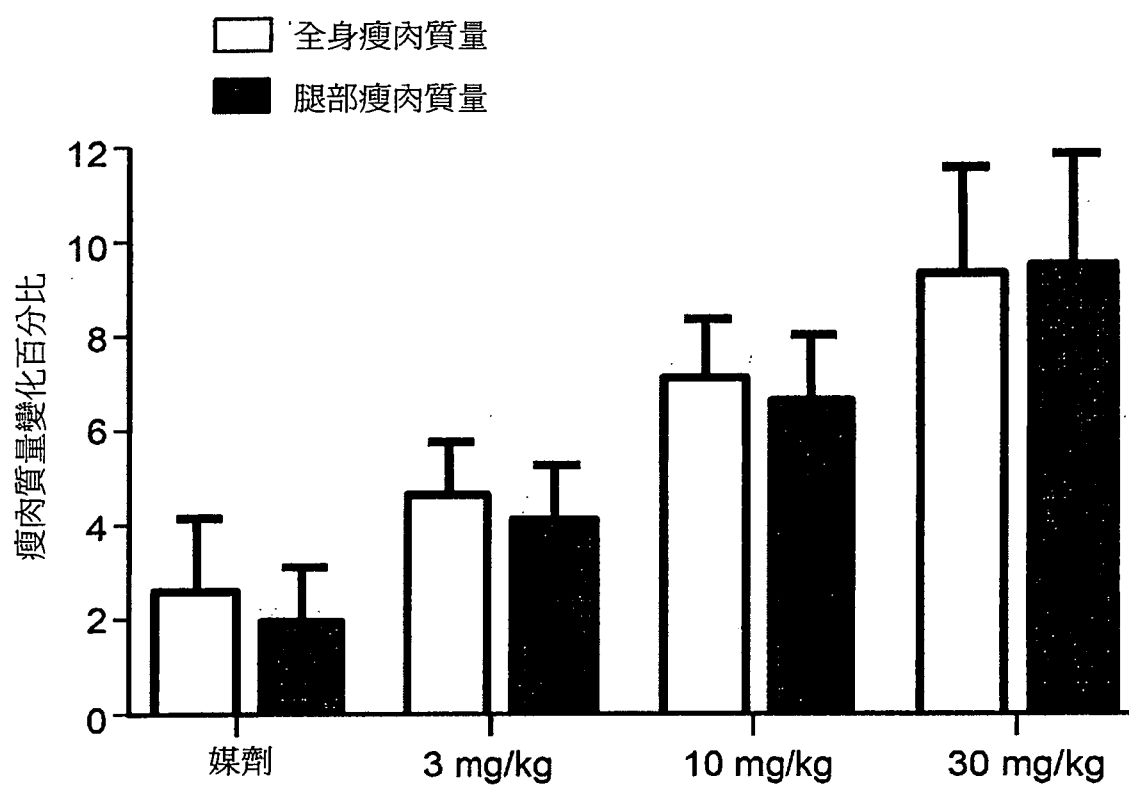


圖 8

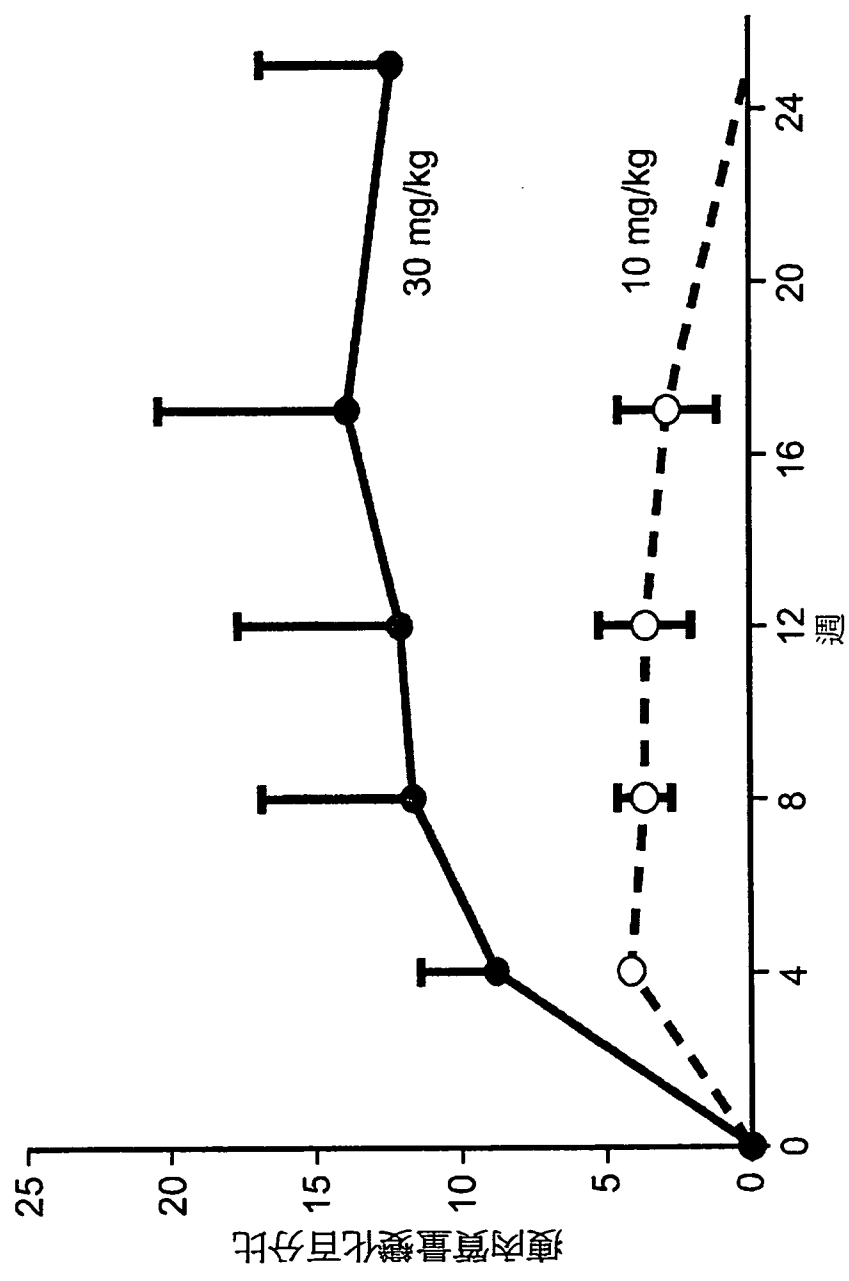


圖 9

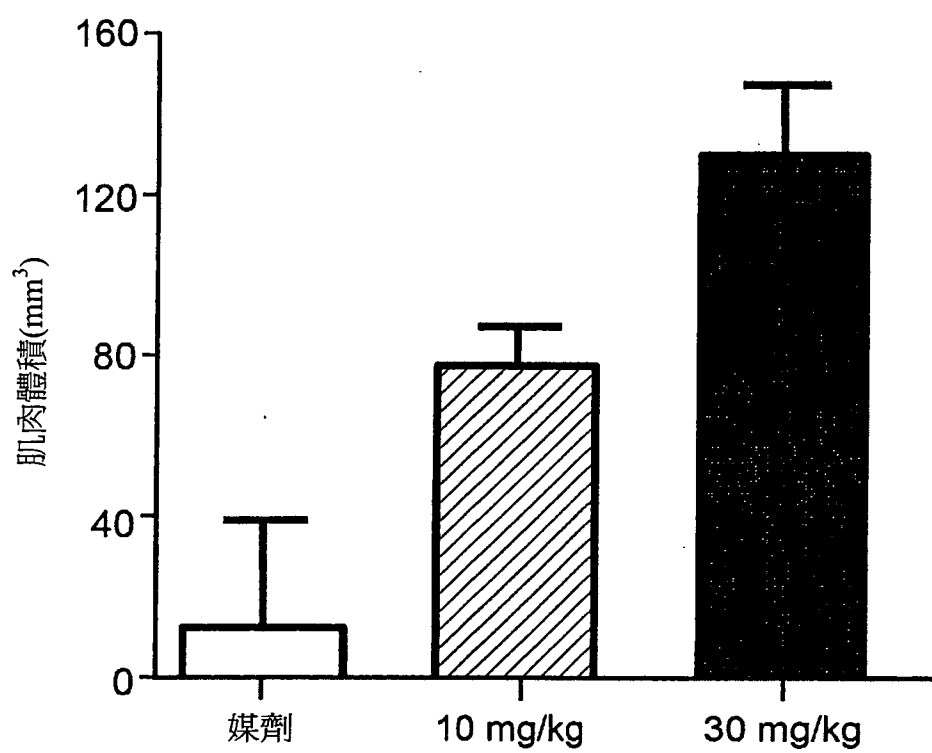


圖 10A

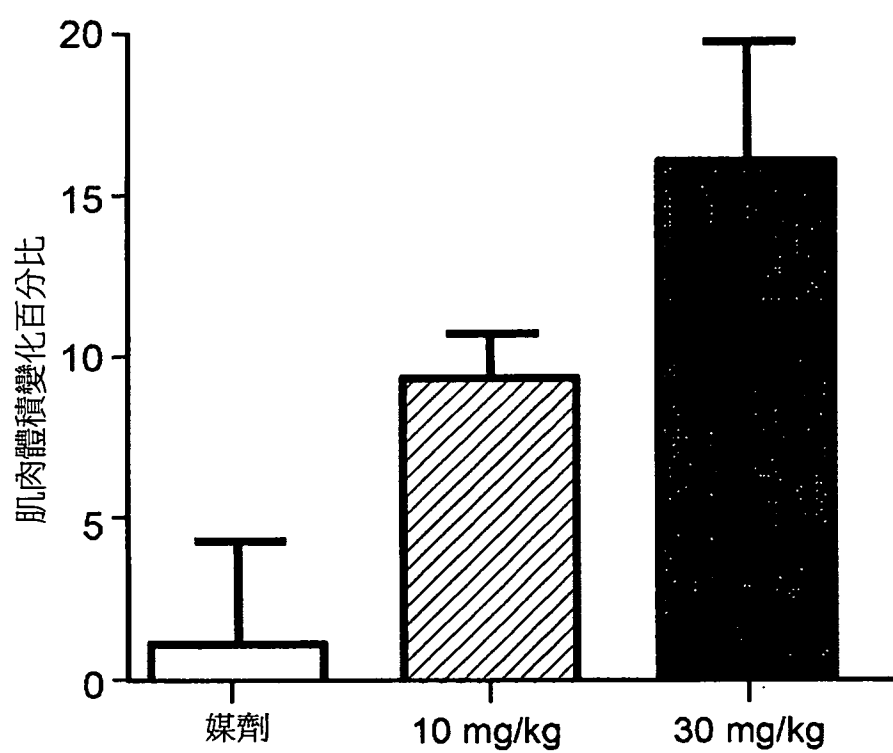
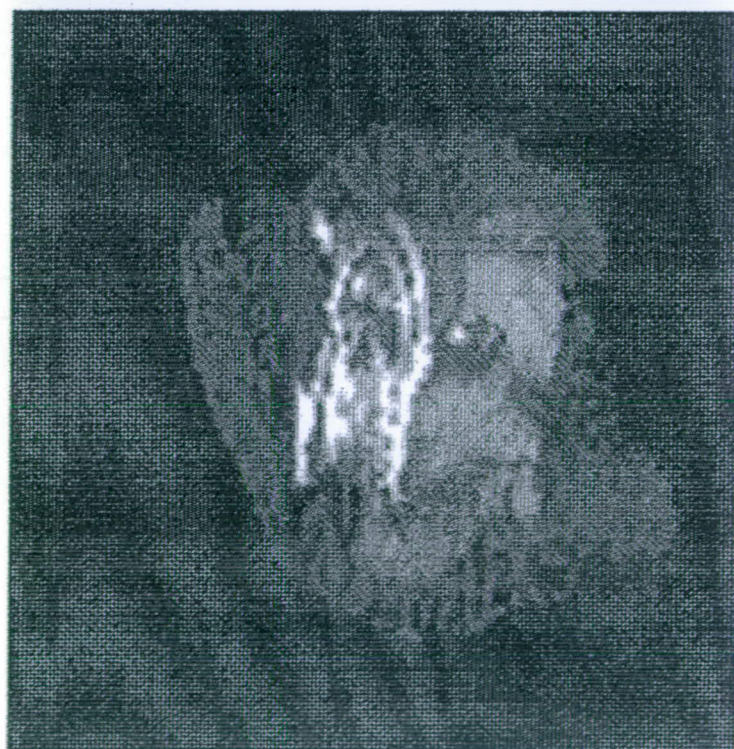


圖 10B



11

含有 VH0 VH 區之抗 GDF-8 抗體 OGD1.0.0 重鏈(SEQ ID NO:58)

```

EVQLLESGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVST ISSGGSYTSY 60
PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKQD YAMNYWGQGT LVTVSSASTK 120
GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180
LSSVTVTPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PEAAGAPSVF 240
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR 300
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 360
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPNENY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN 420
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
    
```

圖 12A

含有 VL0 VL 區之抗 GDF-8 抗體 OGD1.0.0 輕鏈(SEQ ID NO:59)

```

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS 60
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYQCQQ HYSTPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
    
```

圖 12B