



(21)申請案號：108107144

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 04 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/00 (2006.01)**C07K16/40 (2006.01)*

(30)優先權：2018/03/02

歐洲專利局

18305229.9

(71)申請人：法商迪亞庫雷特公司 (法國) DIACCURATE (FR)

法國

(72)發明人：泰馬里 布蘭奇 TAMARIT, BLANCHE (FR)；泰斯 賈克斯 THEZE, JACQUES

(FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：14 共 82 頁

(54)名稱

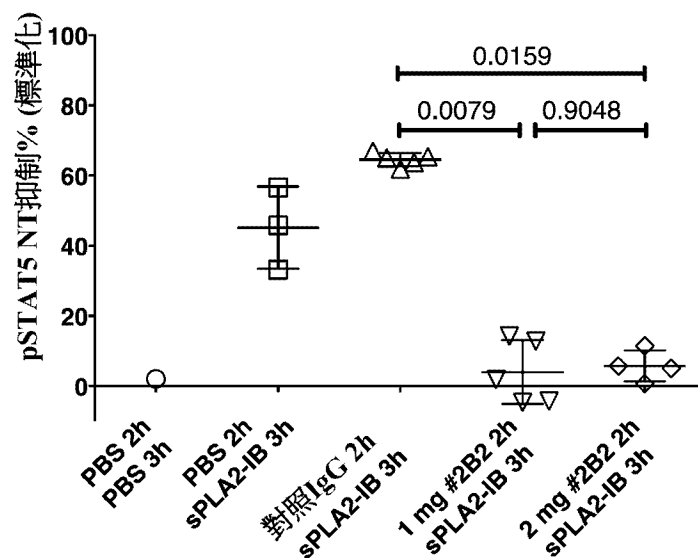
治療性抗 sPLA2-GIB 抗體及其用途

(57)摘要

本發明係關於結合 PLA2-GIB 之人類或人類化抗體、其產生及其用途。此等抗體展現尤其針對治療性及診斷性目的之有利特徵。

The present invention relates to human or humanized antibodies which bind PLA2-GIB, their production and the uses thereof. These antibodies exhibit advantageous characteristics, in particular for therapeutic and diagnostic purposes.

指定代表圖：



【圖14】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

治療性抗sPLA2-GIB抗體及其用途

【英文發明名稱】

THERAPEUTIC ANTI-sPLA2-GIB ANTIBODIES AND THE USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於結合PLA2-GIB之抗體、其產生及其用途。此等抗體展現尤其針對治療性及診斷性目的之有利特徵。

【先前技術】

【0002】 IB組胰腺磷脂酶A2 (group IB pancreatic secreted phospholipase A2, PLA2-GIB)為低分子量(14 kD)、高度穩定(7個二硫鍵)的分泌蛋白，其催化磷脂之sn-2脂肪醯基鍵的水解以釋放游離脂肪酸及溶血磷脂(Lambeau及Gelb 2008)。在人類中，*PLA2-GIB*基因主要表現於胰腺中，在十二指腸、空腸及胃中具有較弱表現量(Eskola等人1983a) (Nevalainen及Haapanen 1993)。已在諸如肺、眼部(Kolko等人2007)及睪丸之其他組織中描述邊緣表現。在人類胰腺中，PLA2-GIB主要合成於胰腺腺泡細胞之頂端酶原顆粒部分中(Eskola等人1983a)。亦已在胰島β細胞之胰島素分泌顆粒中偵測到sPLA2-GIB且其與來自葡萄糖刺激的胰島之胰島素共分泌(Ramanadham等人1998)。酶以非活性前形式釋放於胰液中且藉由前肽之蛋白質裂解活化以產生成熟分泌形式(sPLA2-GIB)。活體外實驗表明胰蛋白酶及纖維蛋白溶酶能夠以良好效力活化前-sPLA2-GIB (Nakano等人1994)。

【0003】除了在胃腸道中的作用以外，PLA2-GIB亦在人類血漿中循環((Nishijima等 人1983) (Eskola等 人1983b) (Sternby 1984) (Nevalainen等人1985) (Kitagawa等人1991))。近期，PLA2-GIB經鑑別在作為病毒血症HIV感染患者中之CD4 T淋巴球之無應答性的基礎的機制中起到關鍵作用。詳言之，經證實，sPLA2-IB為造成CD4 T淋巴球之長期不活化的蛋白質，其迫使CD4 T淋巴球進入異常活化分化狀態，使得CD4 T淋巴球難以對某些生理學信號(諸如藉由介白素-7傳送的彼等信號)作出反應(THEZE Jacques等人2015)。

【0004】因此需要允許抑制PLA2-GIB之酶活性的抗PLA2-GIB抗體。

【發明內容】

【0005】本發明提供抗PLA2-GIB抗體及其使用方法。更特定言之，本發明提供可中和sPLA2-GIB之酶活性的治療性抗人類sPLA2-GIB抗體。

【0006】本發明之目的更特定言之係關於結合人類sPLA2-GIB的人類或人類化抗體或其衍生物。

本發明之較佳人類或人類化抗體結合包含至少一個選自以下之胺基酸殘基的抗原決定基：人類sPLA2-GIB之W3、R6、K7、K10、C77、Y75、G79及S80。本發明之更佳抗體為中和抗體。此類抗體之特定實例為抗體#2B、#2B1及#2B2。

【0007】本發明之另一目的係關於一種編碼如上文所定義之抗體或衍生物，或其輕鏈或重鏈，或其可變域的核酸分子。

【0008】本發明亦係關於一種包含如上文所定義之核酸的載體以及

一種含有此載體或核酸分子的重組宿主細胞。

【0009】 本發明之另一目的為一種醫藥組合物，其包含：(i)如上文所定義之抗體或衍生物、核酸、載體或重組宿主細胞；及(ii)醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【0010】 本發明亦係關於一種如上文所定義之抗體或衍生物、核酸、載體、重組宿主細胞或組合物，其用作尤其用於治療有需要之個體之免疫病症的藥劑。

【0011】 本發明亦係關於一種用於治療有需要之個體之方法，該個體特定言之為患有免疫病症之個體，該方法包含向個體投與如上文所定義抗體或衍生物、核酸、載體、重組宿主細胞或組合物。

【0012】 本發明之另一目的係關於一種用於產生如上文所定義之抗體的方法，其包含在適合於表現抗體的條件下培養如上文所定義之細胞，且視情況回收該抗體。

【0013】 本發明之治療性抗體可用於有需要之任何哺乳動物，特定言之任何人類個體。其適合於抑制PLA2-GIB及矯正與該蛋白質之非所需活性相關的任何疾病。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖1：單株抗體14G9之特性。A：sPLA2-GIB酶活性之抑制。B：間接ELISA中之稀釋曲線。C：競爭性ELISA中之稀釋曲線。

圖2：單株抗體14G9對於自HIV-1感染患者分離之血漿對來自一個健康供體之CD4 T細胞中磷酸STAT5 (phosphoSTAT5)之核易位之抑制作用的抑制。使用同型對照mAb未觀測到作用。

圖3：10 μg 單株抗體14G9對於自HIV-1感染患者分離之血漿對來自5個不同健康供體之CD4 T細胞之磷酸STAT5之核易位之抑制作用的抑制。使用10 μg 同型對照mAb或非抑制性#6F7 mAb未觀測到作用。

圖4：1 mg單株抗體14G9對於100 μg sPLA2-GIB對自小鼠脾細胞分離之CD4 T細胞中磷酸STAT5之核易位之抑制作用的活體內抑制。在注射900 μg 同型對照mAb時未觀測到顯著作用。

圖5：藉由競爭性ELISA對14G9人類化變異體之親和力的估計。

圖6：人類化抗體#1A、#1B、#2A及#2B之標準化熱變性。

圖7：#2B之SEC分析。上部圖，#2B之SEC層析圖。中間圖，經縮放基線。下部圖，具有峰值指派的經縮放基線。

圖8：人類化抗體#2B1及#2B2之標準化熱變性。

圖9：人類化抗體#2B、#2B1及#2B2與人類Fc γ R之單體IgG結合的流動式細胞測量術分析。

圖10：#2B與人類Fc γ R之免疫複合體結合的流動式細胞測量術分析。

圖11：人類化抗體#2B、#2B1及#2B2之抗體致敏細胞上的抗原與人類Fc γ R之殘餘結合的流動式細胞測量術分析。

圖12：Fab#2B2/sPLA2-IB複合體之晶體結構。sPLA2-GIB主鏈以灰色及紫色描繪，#2B2 Fab輕鏈呈淺藍色及粉色，且#2B2 Fab重鏈呈綠色及黃色(A)。Fab#2B2/sPLA2-GIB複合體中之非共價鍵，sPLA2-GIB主鏈呈黃色，#2B2 Fab輕鏈呈淺藍色，且#2B2 Fab重鏈呈綠色(B)。

圖13：藉由14G9或#2B抑制sPLA2-GIB (A)或自HIV-1感染患者分離之血漿(B)對來自一個健康供體之CD4 T細胞中之磷酸STAT5之核易位的

抑制作用。

圖14：藉由1或2 mg #2B2活體內抑制100 μ g sPLA2-GIB對自小鼠脾細胞分離之CD4 T細胞中之磷酸STAT5之核易位的抑制作用。在注射1 mg 同型對照mAb時未觀測到顯著作用。

表1：小鼠V基因或其人類化型式與用作受體序列之可變人類生殖系之間的一致性百分比。

表2：人類化型式與其對應人類生殖系之間的跨V基因之序列差異之細節。

表3：藉由人類化抗體抑制sPLA2-GIB酶活性。結果表述為控制%。

表4：藉由競爭性ELISA所獲得之不同人類化抗體針對重組人類sPLA2-GIB及重組人類前-sPLA2-GIB之估計IC50。

表5：人類化抗體之差示掃描熱量測定。T_m為變性/熔融溫度。T_{onset}為伸展轉變開始的溫度。T1/2為在波峰之半高處的轉變之寬度。ΔH為量熱伸展焓且反映蛋白質之分子內相互作用之破壞。總面積為整體伸展焓(熱譜圖下之總面積)且反映熱力學穩定性。

表6：#1A、#1B、#2A及#2B人類化抗體之SEC-HPLC分析。

表7：藉由#2B、#2B1及#2B2人類化抗體之表面電漿子共振針對重組人類sPLA2-GIB及重組人類前-sPLA2-GIB判定K_d。

表8：#2B1及#2B2人類化抗體之差示掃描熱量測定。T_m為變性/熔融溫度。T_{onset}為伸展轉變開始的溫度。T1/2為在波峰之半高處的轉變之寬度。ΔH為量熱伸展焓且反映蛋白質之分子內相互作用之破壞。總面積為整體伸展焓(熱譜圖下之總面積)且反映熱力學穩定性。

表9：#2B1及#2B2人類化抗體之SEC-HPLC分析。

【0015】 表10：#2B、#2B1及#2B2人類化抗體之成像毛細管等電聚焦(icIEF)分析。樣本中存在之不同電荷變異體之平均表觀pI。

【實施方式】

【0016】

抗體

本發明係基於在治療方面可用於有效地及選擇性地調節人類個體之PLA2-GIB之活性的新穎人類及人類化抗體之產生。

【0017】 如本文所用，術語「PLA2-GIB」表示IB組胰腺磷脂酶A2。PLA2-GIB已自各種哺乳動物物種中鑑別出並選殖。人類PLA2-GIB蛋白揭示於例如Lambeau及Gelb (2008)中。序列可以Genbank編號NP_000919獲得。

【0018】 以下展示例示性人類PLA2-GIB之胺基酸序列(SEQ ID NO: 1)。

MKLLVLAVLL TVAAADSGIS PRAVWQFRKM IKCVIPGSDP
FLEYNNGCY CGLGSGTPV DELDKCCQTH DNCYDQAKKL DSCKFLLDNP
YTHTYSYSCS GSAITCSSKN KECEAFICNC DRNAAICFSK APYNKAHKNL
DTKKYCQS

【0019】 SEQ ID NO: 1之胺基酸1至15 (加底線)為信號序列，且SEQ ID NO: 1之胺基酸16至22 (加粗)為前肽序列。

【0020】 在本發明之情形內，術語「PLA2-GIB」較佳表示人類PLA2-GIB。

【0021】 人類PLA2-GIB蛋白可以兩個不同形式存在：非活性前形式(前-sPLA2-GIB)，其藉由前肽之蛋白質裂解活化，從而產生成熟分泌形式(sPLA2-GIB)。術語PLA2-GIB包括任何形式之蛋白質，諸如前形式及/或成熟形式。通常，成熟分泌形式包含SEQ ID NO: 1之胺基酸殘基23-

148之序列(SEQ ID NO: 14)或其任何天然變異體，諸如由多形現象或剪接產生之變異體。

SEQ ID NO: 14：

AVWQFRKMIK CVIPGSDPFL EYNNYGCYCG LGGSGTPVDE
LDKCCQTHDN CYDQAKKLDs CKFLLDNPYT HTYSYSCSGS AITCSSKNKE
CEAFICNCDR NAAICFSKAP YNKAHKNLDT KKYCQS

【0022】 術語「前-sPLA2-GIB」或「前PLA2-GIB」較佳表示包含SEQ ID NO: 1之胺基酸殘基16-148之序列或其任何天然變異體(諸如由多形現象或剪接產生之變異體)的蛋白質。

【0023】 申請人已產生若干抗sPLA2-GIB單株抗體。其已發現該等抗體中之一者，亦即抗體#14G9展現顯著中和活性且對sPLA2-GIB具選擇性。申請人進一步表徵此單株抗體、其可變區以及其抗原決定基。詳言之，如實驗部分中所示，抗體14G9結合參考SEQ ID NO: 14包含人類sPLA2-GIB之胺基酸殘基W3、R6、K7、K10、C77、Y75、G79及S80的抗原決定基。申請人亦能夠基於14G9產生人類化抗體且證明其顯著活體外及活體內活性。

【0024】 本發明因此係關於抗PLA2-GIB的經分離人類或人類化抗體。

【0025】 本發明更具體言之提供與人類PLA2-GIB選擇性結合且中和人類PLA2-GIB的人類或人類化抗體。

【0026】 非人類(例如，鼠類)抗體之「人類化」形式為嵌合抗體，其含有來源於接枝至人類骨架(例如，人類抗體鏈恆定域)中的非人類免疫球蛋白之最小序列。在極大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者的高變區殘基經來自諸如具有所需特異性、親

和力及能力之小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)的高變區殘基置換。此外，人類化抗體可包含在接受者抗體或供體抗體中未發現之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體包含至少一個及通常兩個可變域中的基本上全部可變域，其中全部或基本上全部高變區對應於非人類免疫球蛋白之彼等高變區，且全部或基本上全部FR為人類免疫球蛋白序列之彼等FR。人類化抗體視情況亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc) (通常為人類免疫球蛋白之恆定區)的至少一部分(Jones等 人，Nature 321:522-525 (1986)；Reichmann等 人，Nature 332:323.329 (1988)；及Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992))。

【0027】「人類抗體」為具有對應於人類產生抗體之胺基酸序列的胺基酸序列及/或使用用於製備如本文所揭示之人類抗體之技術中之任一者產生的抗體。人類抗體可使用此項技術中已知的各種技術產生，包括噬菌體呈現文庫(Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks等 人，J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。Cole等 人，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77頁 (1985)；Boerner等 人，J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)中描述之方法亦可用於製備人類單株抗體。亦參見van Dijk及van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)。人類抗體可藉由將抗原投與至轉殖基因動物來製備，該轉殖基因動物已經修飾以回應於抗原攻擊而產生此類抗體，但其內源基因座已失能(例如經免疫轉殖基因小鼠(xenomice)) (參見例如關於XENOMOUSE™技術之美國專利第6,075,181號及6,150,584號)且經人類基因座置換。亦參見例如，關於經由人類B細胞融合瘤技術產生的人類抗

體之Li等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)。

【0028】 本發明抗體可為多株抗體、單株抗體或其衍生物，其保持相同抗原特異性，諸如人類化奈米抗體或scFv。本發明抗體較佳為單株抗體，亦即，各自針對單一抗原位點的抗體。本發明之單株抗體可藉由此項技術中本身已知之方法製備，諸如藉由首先由Kohler等人, Nature 256:495 (1975)描述之融合瘤方法或藉由重組DNA方法製備。其亦可使用描述於例如Clackson等人, Nature 352:624-628 (1991)及Marks等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)中之技術自噬菌體抗體文庫分離。

【0029】 本發明特定言之提供與人類PLA2-GIB選擇性結合且中和人類PLA2-GIB的人類或人類化單株抗體。

【0030】 在較佳實施例中，本發明抗體為人類化單株抗體。

【0031】 在一更佳實施例中，本發明係關於結合人類sPLA2-GIB，較佳地結合包含至少一個選自人類sPLA2-GIB之W3、R6、K7、K10、C77、Y75、G79及S80之胺基酸殘基(參考SEQ ID NO: 14)的抗原決定基，更佳地結合包含至少2個或至少3個選自人類sPLA2-GIB之W3、R6、K7、K10、C77、Y75、G79及S80之胺基酸殘基的抗原決定基，進一步更佳地結合包含至少4個、至少5個、至少6個或至少7個選自人類sPLA2-GIB之W3、R6、K7、K10、C77、Y75、G79及S80之胺基酸殘基的抗原決定基的人類或人類化單株抗體。本發明展示結合此類殘基之抗體展現強中和活性且代表用於活體內抑制人類PLA2-GIB之寶貴治療劑。

【0032】 在一特定實施例中，本發明抗體或衍生物競爭性地抑制單株抗體14G9與人類sPLA2-GIB之結合，該單株抗體14G9包含：包含SEQ ID NO: 2之輕鏈可變區，及包含SEQ ID NO: 3之重鏈可變區。

【0033】 在另一特定實施例中，本發明抗體或衍生物競爭性地抑制單株抗體#2B與人類sPLA2-GIB之結合，該單株抗體#2B包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈，及包含SEQ ID NO: 5或由SEQ ID NO: 5組成之重鏈。

【0034】 在另一特定實施例中，本發明抗體或衍生物競爭性地抑制單株抗體#2B1與人類sPLA2-GIB之結合，該單株抗體#2B1包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈，及包含SEQ ID NO: 6或由SEQ ID NO: 6組成之重鏈。

【0035】 在另一特定實施例中，本發明抗體或衍生物競爭性地抑制單株抗體#2B2與人類sPLA2-GIB之結合，該單株抗體#2B2包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈，及包含SEQ ID NO: 7或由SEQ ID NO: 7組成之重鏈。

【0036】 術語「競爭性地抑制」指示抗體可減少或抑制或轉移參考抗體與sPLA2-GIB之結合。可使用諸如競爭性ELISA或其他結合分析之標準技術執行競爭分析。典型地，競爭性結合分析涉及通常結合至固體受質或細胞之經純化標靶抗原、未標記測試抗體及經標記參考抗體。競爭性抑制係藉由測定在測試抗體存在的情況下所結合之經標記抗體的量來量測。通常測試抗體過量存在，諸如為參考抗體之量的約5至500倍。典型地，對於ELISA，測試抗體100×過量，且對於酶促法，測試抗體10×過量。當過量存在之測試抗體抑制或轉移參考抗體與抗原之結合的至少70%時，其被視為競爭性地抑制該參考抗體。在一特定實施例中，當100×過量存在之測試抗體在ELISA中抑制或轉移參考抗體與抗原之結合的至少70%，更佳地至少80%時，其被視為競爭性地抑制該參考抗體。較佳競爭抗體結合

共用共同胺基酸殘基之抗原決定基。

【0037】 在一特定實施例中，本發明係關於一種單株抗體，其包含：

(i)包含CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3及FR-L之輕鏈可變區，其中CDR-L1、CDR-L2及/或CDR-L3分別由SEQ ID NO: 2之輕鏈可變區之CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3組成或基本上由以上各者組成，且其中FR-L屬於人類免疫球蛋白序列；及

(ii)包含CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3及FR-H之重鏈可變區，其中CDR-H1、CDR-H2及/或CDR-H3分別由SEQ ID NO: 3之重鏈可變區之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3組成或基本上由以上各者組成，且其中FR-H屬於人類免疫球蛋白序列。

【0038】 抗體之「可變區」係指含有抗原結合位點的重鏈或輕鏈之胺基端域(「VH」或「VL」)。輕鏈或重鏈可變區(VL或VH)一般由間雜有三個高變區之構架區(「FR」)組成，該等高變區被稱作「互補決定區」或「CDR」。構架區及CDR之範圍已由例如Kabat (參見「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, E. Kabat等人,U.S. Department of Health and Human Services, (1983))及Chothia精確限定。

【0039】 參考SEQ ID NO: 2，三個CDR區對應於以下胺基酸殘基：

- . CDR-L1：胺基酸殘基QDVSTA，
- . CDR-L2：胺基酸殘基WAS，
- . CDR-L3：胺基酸殘基QQDYSTPPT。

【0040】 參考SEQ ID NO: 3，三個CDR區對應於以下胺基酸殘

基：

- . CDR-H1：胺基酸殘基GYTFTNYW，
- . CDR-H2：胺基酸殘基IDPSDTRT，
- . CDR-H3：胺基酸殘基ARQTLYYEALDY。

【0041】 在一特定實施例中，本發明係關於一種單株抗體，其選自：

. 包含含有SEQ ID NO: 4、基本上由SEQ ID NO: 4組成或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及含有SEQ ID NO: 5、基本上由SEQ ID NO: 5組成或由SEQ ID NO: 5組成之重鏈的單株抗體(純系#2B)；

. 包含含有SEQ ID NO: 4、基本上由SEQ ID NO: 4組成或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及含有SEQ ID NO: 6、基本上由SEQ ID NO: 6組成或由SEQ ID NO: 6組成之重鏈的單株抗體(純系#2B1)；

. 包含含有SEQ ID NO: 4、基本上由SEQ ID NO: 4組成或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及含有SEQ ID NO: 7、基本上由SEQ ID NO: 7組成或由SEQ ID NO: 7組成之重鏈的單株抗體(純系#2B2)；及

. 其衍生物。

【0042】 如本文所用，術語「抗體衍生物」係指保持參考抗體之抗原特異性但其中一或多個胺基酸殘基(以化學方式或在生物學上)經修飾以改良其特性的抗體。

【0043】 此類化學修飾之實例包括例如烷基化、聚乙二醇化、醯化、酯或醯胺形成及類似者。詳言之，衍生物為經修飾以含有諸如水溶性聚合物之一或多個其他非蛋白質部分的如本文所揭示之抗體。水溶性聚合物之實例包括(但不限於)PEG、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚

葡萄糖及聚乙烯醇。

【0044】 亦可產生衍生物以增加或減少抗體糖基化之程度。向抗體中添加糖基化位點或使抗體缺失糖基化位點可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點來便利地實現。在抗體包含Fc區之情況下，可改變連接於其上之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含一般藉由N鍵連接至Fc區之CH2域之Asn297的分支鏈雙觸角寡糖(參見例如Wright等人, TIBTECH, 1997, 15:26-32)。寡糖可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接至雙觸寡糖結構之「主幹」中之GlcNAc的海藻糖。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡糖進行修飾以便產生具有某些改良特性之抗體變異體。

【0045】 在一個實施例中，衍生物具有經修飾Fc區以便改變ADCC(經由調節FcγRIII結合)。

【0046】 在一個實施例中，提供具有缺乏連接(直接或間接)至Fc區之海藻糖之碳水化合物結構的抗體變異體。舉例而言，此類抗體中之海藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%，或20%至40%。海藻糖之量係藉由相對於如藉由MALDI-TOF質譜所量測的連接至Asn 297之所有糖結構(例如，複雜、混合及高甘露糖結構)之總和計算Asn297處之糖鏈內的海藻糖之平均量來測定。Asn297係指位於Fc區中約位置297 (Fc區殘基之Eu編號)處的天冬醯胺殘餘物；然而，歸因於抗體之輕微序列變化，Asn297亦可位於位置297上游或下游約±3個胺基酸處，亦即位置294與300之間。與「去海藻糖基化(defucosylated)」或「海藻糖缺乏」抗體變異體相關之公開案之實例包括(但不限於)Okazaki等人 J. Mol. Biol. 336:

1239-1249 (2004)及Yamane-Ohnuki N, Satoh M. mAbs. 2009;1:230-236。能夠產生去海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括蛋白海藻糖基化中缺乏之Led 3 CHO細胞(Ripka等人Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986))及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因FUT8基因剔除CHO細胞(參見例如Yamane-Ohnuki等人Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006))。

【0047】在某些實施例中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基存在於抗體之可接近位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基藉此定位於抗體之可接近位點處且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生如本文中進一步描述之免疫結合物。在某些實施例中，以下殘基中之任一者或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)；重鏈之A118 (EU編號)；及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。可如例如美國專利第7,521,541號中所描述產生經半胱胺酸工程改造之抗體。

【0048】術語衍生物亦包括包含如上文所定義與一或多個異源分子(包括(但不限於)細胞毒性劑、諸如螢光部分之可偵測部分、診斷性放射性同位素或顯影劑)結合或與固體支撐物(諸如瓊脂糖珠粒或類似者)結合之抗sPLA2-GIB抗體的免疫結合物。細胞毒性劑之實例包括(但不限於)化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如，蛋白毒素，細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，或其片段)或放射性同位素。可使用熟習此項技術者熟知之多種雙官能蛋白偶合劑製備抗體與細胞毒性劑之結合物。連接子可為促進細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而

言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含有二硫鍵之連接子(Chari等人, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992))。衍生物亦可為雙特異性抗體。

【0049】 本發明抗體典型地「經分離」，例如已自其天然環境之至少一種組分分離。詳言之，抗體可經純化至更大純度，例如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%，如藉由例如電泳(例如，SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細電泳法)或層析(例如，離子交換或逆相HPLC)技術所測定。對用於評估抗體純度之方法的綜述參見例如Flatman等人, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

【0050】 如上文所論述，本發明抗體實質上為中和抗體，亦即，其能夠至少部分抑制PLA2-GIB之活性。

【0051】 sPLA2-GIB催化磷脂之sn-2脂肪醯基鍵之水解以釋放游離脂肪酸及溶血磷脂。本發明之特定抗體抑制sPLA2-GIB之酶活性，諸如磷脂之sn-2脂肪醯基鍵之水解。用於測試此特性之方法詳細揭示於實驗部分中。

【0052】 本發明之其他特定抗體抑制sPLA2-GIB與其受質之結合。

【0053】 本發明之其他特定抗體抑制sPLA2-GIB介導之對CD4 T細胞中IL-7誘發之磷酸STAT5核易位的抑制。用於測試此特性之方法詳細揭示於實驗部分中。

【0054】 抗體或衍生物之中和活性可使用例如結合或生物分析(諸如實驗部分中所描述之測試)活體外或活體內測定。抑制/中和可為完全或部分的。詳言之，抗體可抑制10%或更高之所測試活性，較佳地20%或更高、30%或更高、40%或更高、50%或更高。

【0055】 在較佳實施例中，抗體為IgG，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

【0056】 較佳抗體選擇性地結合sPLA2-GIB，亦即相較於其他分子展現與sPLA2-GIB之較佳結合。選擇性可藉由競爭性ELISA或Biacore分析測定。標誌著選擇性的親和力/親合力之差異可為任何可偵測優先選擇，諸如大於1:1.1或大於約1:5、1:10、1:100、1:1000或更大之比率。

【0057】 本發明抗體或衍生物可使用習知方法及培養基分離及保存。其可經凍乾。其亦可經冷凍。

【0058】

核酸、載體、宿主細胞及重組產物

在另一態樣中，本發明係關於編碼本發明抗體、或其輕鏈或重鏈、或其可變域的核酸分子，或與該編碼序列互補之核酸。較佳地，核酸為經分離或經純化核酸。

【0059】 核酸可為DNA (cDNA或gDNA)、RNA或其混合物。其可呈單股形式或呈雙螺旋形式或兩者之混合。其可包含經修飾之核苷酸，包含例如經修飾之鏈、經修飾之嘌呤或嘧啶鹼或經修飾之糖。其可藉由熟習此項技術者已知之任何方法製備，包括化學合成、重組及突變誘發。根據本發明之核酸可自根據本發明之抗體之序列推論，且密碼子使用可根據應轉錄核酸之宿主細胞來調適。此等步驟可根據熟習此項技術者熟知之方法進行且其中一些描述於參考手冊Sambrook等人(Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, Third Edition Cold Spring Harbor)中。

【0060】 本發明核酸可編碼包含抗體之輕鏈的胺基酸序列及/或包含

抗體之重鏈的胺基酸序列，或可與此類編碼序列互補。

【0061】 此類核酸序列之具體實例包括以SEQ ID NO: 10-13提供之序列。

【0062】 本發明進一步提供包含本發明核酸之載體。視情況，載體可包含若干本發明核酸。詳言之，載體可包含與調節區(亦即包含一或多個控制序列之區域)可操作地連接的本發明核酸。視情況，載體可包含與若干調節區可操作地連接之若干本發明核酸。

【0063】 術語「控制序列」意謂表現編碼區所需的核酸序列。控制序列可為內源性或異源性的。熟習此項技術者熟知且當前所使用之控制序列將為較佳的。此類控制序列包括(但不限於)啟動子、信號肽序列及轉錄終止子。

【0064】 術語「可操作地連接」意謂將控制序列相對於編碼序列置放於適當位置處，以此方式使得控制序列導引編碼區之表現。

【0065】 本發明進一步係關於根據本發明之核酸或載體用以轉型、轉染或轉導宿主細胞之用途。

【0066】 本發明亦提供一種宿主細胞，其包含一種或若干種本發明核酸及/或一種或若干種本發明載體。

【0067】 術語「宿主細胞」亦涵蓋親本宿主細胞的因複製期間發生之突變而與親本宿主細胞不一致之任何後代。

【0068】 適於選殖或表現抗體編碼載體之宿主細胞包括本文所描述之原核或真核細胞。

【0069】 舉例而言，抗體可於細菌中產生，在不需糖基化及Fc效應功能時尤其如此。對於細菌中抗體片段及多肽之表現，參見例如美國專

利案第5,648,237號、第5,789,199號及第5,840,523號(亦參見Charlton, Methods in Molecular Biology, 第248卷 (B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254頁, 其描述大腸桿菌中抗體片段之表現)。抗體在表現後可自可溶性溶離份中之細菌細胞溶菌液分離且可進一步經純化。

【0070】 除原核生物以外, 諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於抗體編碼載體的選殖或表現宿主, 包括糖基化路徑已經「人類化」, 從而使得所產生之抗體具有部分或完全人類糖基化型態的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004)及Li等人, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

【0071】 適用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用, 尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號。

【0072】 脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言, 適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40 (COS-7)轉型之猴腎CV1株; 人類胚腎細胞株(如例如在Graham等人, J. Gen Virol. 36:59 (1977)中所描述之293或293細胞); 幼倉鼠腎細胞(BHK); 小鼠塞特利氏細胞(mouse Sertoli cell) (如例如在Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)中所描述之TM4細胞); 猴腎細胞(CV1); 非洲綠猴腎細胞(VERO-76); 人類子宮頸癌細胞(HELA); 犬腎細胞(MDCK;

水牛鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；如例如在Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所描述之TRI細胞；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適合於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株的綜述，參見例如Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷 (B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁(2003)。

【0073】 本發明亦係關於一種用於產生本發明之抗體的方法，包含在適合於表現抗體的條件下培養包含如上文所提供之本發明核酸或本發明載體之宿主細胞，及視情況自宿主細胞或自宿主細胞培養基回收抗體。視情況，所回收抗體可進一步經純化或分離。合適的培養基、培養條件及產生方法為技術人員所熟知且可易於根據宿主細胞及待產生之抗體進行選擇。

【0074】

醫藥組合物

本發明進一步係關於醫藥組合物，其包含本發明之抗體、核酸、載體或宿主細胞。該組合物可包含一種或若干種本發明抗體、一種或若干種本發明核酸及/或一種或若干種本發明載體及/或一種或若干種本發明宿主細胞。較佳地，該醫藥組合物包含一種或若干種本發明抗體。

【0075】 包含本發明抗體之醫藥組合物可根據已知方法調配，以製備醫藥學上適用之組合物，其中將具有所需純度之抗體與視情況選用之生

理學上可接受載劑、賦形劑或穩定劑以水溶液、經凍乾調配物或以其他方式乾燥之調配物的形式混合(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第20版(2000))。

【0076】如本文所用，術語「醫藥調配物」或「醫藥組合物」係指一種製劑，其呈諸如允許活性成分之生物活性有效之形式，且其不含對將接受調配物投與之個體具有不可接受之毒性的其他組分。較佳地，此類調配物為無菌的，亦即無菌或不含任何活微生物及其孢子。

【0077】可接受載劑、賦形劑或穩定劑在所採用劑量及濃度下對接受者無毒性，且包括(但不限於)緩衝劑、穩定劑、防腐劑、等張劑、非離子清潔劑、抗氧化劑及其他各種添加劑。

【0078】緩衝劑有助於將pH維持在接近生理條件的範圍內。其較佳地以在約1 mM至約50 mM範圍內的濃度存在。適用於本發明之緩衝劑包括(但不限於)有機酸及無機酸兩者以及其鹽，諸如檸檬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽及乙酸鹽緩衝劑，以及磷酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑及三甲胺鹽，諸如Tris。

【0079】可以添加防腐劑以延緩微生物生長，且添加量可在0.2%至1% (w/v)範圍內。適用於本發明之防腐劑包括(但不限於)酚類；丁醇或苯甲醇；間甲苯酚；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；氯化十八烷基二甲基苯甲銨，鹵化烷基二甲基苯甲銨(例如，氯化物、溴化物、碘化物)；氯化六羥季銨或苜索氯銨；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；及3-戊醇。

【0080】可添加等張劑來確保本發明之液體組合物之等張性且等張劑包括多羥基糖醇，較佳三羥基糖醇或更多羥基的糖醇，諸如甘油、赤藻

糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇及甘露糖醇。

【0081】 穩定劑係指廣泛類別之賦形劑，其功能範圍可自增積劑至使治療劑溶解或有助於防止變性或黏附於容器壁上的添加劑。典型的穩定劑可以係多羟基糖醇(以上所列舉的)；胺基酸，諸如精胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等；有機糖或糖醇，諸如乳糖、海藻糖、水蘇糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌肉肌醇、半乳糖醇、丙三醇及其類似者，包括環醇，諸如肌醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，諸如脲、麩胱甘肽、硫辛酸、巰乙酸鈉、硫甘油、 α -單硫甘油及硫代硫酸鈉；低分子量多肽(亦即， <10 個殘基)；蛋白質，諸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮單醣，諸如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；雙醣，諸如乳糖、麥芽糖、蔗糖；及三醣，諸如棉子糖；以及多醣，諸如聚葡萄糖。每重量份治療劑可存在0.1至10,000重量範圍內的穩定劑。

【0082】 可添加非離子界面活性劑或清潔劑(亦稱為「濕潤劑」)以幫助溶解治療劑以及保護治療性蛋白質以免攪拌誘導之聚集。合適的非離子界面活性劑包括(但不限於)聚山梨醇酯(20、80等)、泊洛沙姆(polyoxamer；184、188等)、PLURONICS™、多元醇、聚氧乙烯山梨醇酐單醣(TWEENTM-20、TWEENTM-80等)。非離子界面活性劑可按約0.05 mg/ml至約1.0 mg/ml，較佳約0.07 mg/ml至約0.2 mg/ml之範圍存在。

【0083】 其他各種賦形劑包括(但不限於)增積劑(例如，澱粉)、螯合劑(例如，EDTA)、抗氧化劑(例如，抗壞血酸、甲硫胺酸、維生素E)及共溶劑。

【0084】亦可將活性成分截留於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備的微膠囊(例如分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊))中、截留於膠狀藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中或截留於巨乳液中。此類技術揭示於 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第20版(2000)中。

【0085】醫藥組合物之形成、投與途徑、劑量及方案視待治療之病狀、疾病之嚴重度、患者之年齡、重量及性別等而定。

【0086】用於投與之劑量可隨各種參數而調適，且詳言之隨所用投與模式、相關病理學或者所需治療持續時間而調適。

【0087】本發明之醫藥組合物可經調配用於局部、經口、非經腸、鼻內、靜脈內、肌肉內、皮下或眼內投與及其類似投與方式。

【0088】較佳地，醫藥調配物為能夠注射之調配物。此等調配物尤其可為等張的無菌鹽水溶液(磷酸單鈉或二鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣或氯化鎂及其類似物或此類鹽之混合物)，或乾燥、尤其冷凍乾燥之組合物，其在視情況而定添加例如滅菌水或生理鹽水時，允許製成可注射溶液。

【0089】無菌可注射溶液可藉由將所需量之活性化合物視需要與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中，隨後過濾滅菌來製備。在無菌粉末用於製備無菌可注射溶液之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其用先前無菌過濾溶液產生活性成分加任何其他所需成分之粉末。

【0090】除經調配用於非經腸投與(諸如靜脈內或肌肉內注射)之組合物以外，其他醫藥學上可接受之形式包括例如錠劑或用於經口投與之其

他固體；延時釋放膠囊；及目前使用之任何其他形式。

【0091】 本發明之醫藥組合物可包含一種或若干種本發明抗體。

【0092】 醫藥組合物可進一步包含一種或若干種其他活性化合物。其他活性化合物之實例包括(但不限於)化學治療藥物、抗生素、抗寄生蟲藥劑、抗真菌劑或抗病毒劑。

【0093】 將有效治療特定病症或病狀之本發明抗體之量將取決於該病症或病狀之性質且可藉由標準臨床技術測定。

【0094】 在一較佳實施例中，每一劑量的範圍可為每公斤體重約0.1 mg至約25 mg抗體或更佳為每公斤體重約1 mg至約10 mg抗體。

【0095】 用於投與之給藥時程可視多種臨床因素(包括疾病之類型、疾病之嚴重度及個體對治療劑之過敏性)而定在每月一次至每天一次之間變化。

【0096】

治療性應用

本發明進一步係關於一種本發明之抗體、核酸、載體、宿主細胞或醫藥組合物，其用作尤其預防或治療與sPLA2-GIB相關之疾病的藥劑。

【0097】 本發明亦係關於本發明之抗體、核酸、載體、宿主細胞或醫藥組合物作為用於治療疾病之藥劑的用途。本發明亦係關於本發明之抗體、核酸、載體、宿主細胞或醫藥組合物用於製造或製備治療個體之疾病之藥劑的用途。

【0098】 詳言之，本發明係關於一種治療個體之疾病的方法，其包含向有需要之個體投與有效量的本發明之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物。

【0099】如本文所用，術語「個體」或「患者」係指任何哺乳動物，較佳地人類。

【0100】有效量可為治療或預防有效量。「治療有效量」係指必需劑量下及在必需時間段內有效達成所需治療或預防結果的量。本發明之抗體或組合物之治療有效量可根據以下因素變化，諸如疾病狀態、個體之年齡、性別及體重，以及抗體或組合物在個體中誘導所需反應的能力。治療有效量涵蓋抗體或組合物之治療有利作用超過任何毒性或有害作用的量。

「預防有效量」係指在必需劑量下及在必需時間段內有效達成所需預防結果的量。通常但並非必需，因為在疾病之前或在疾病早期在個體中使用預防劑量，所以預防有效量將低於治療有效量。

【0101】本發明可用於預防或治療與某一程度之非所要PLA2-GIB活性相關的任何疾病或病症。

【0102】在一特定實施例中，本發明可用於預防或治療與不適當(例如，缺陷性或不當)免疫反應(特定言之與不適當CD4 T細胞活性)相關之任何疾病以及增加免疫性可改善個體病狀之任何疾病。此等疾病在本申請案中有時被稱作「免疫病症」或「免疫缺乏症」。此疾病包括尤其由病毒感染或病原性感染或癌症引起之免疫缺乏情形。

【0103】如本文所用，術語「治療(treatment或treat)」係指例如嘗試改變待治療之個體之自然過程的任何臨床干預，且可針對預防或治癒目的而進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性結果、預防癌轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，本發明之組合物及方法用以延緩疾病或病症之顯現或減慢疾病或病症之進展。

【0104】 可得益於此類治療的疾病之實例為關於免疫缺乏(諸如HIV介導之免疫缺乏)的所有疾病。就此而言，在一特定實施例中，本發明係關於用於治療有需要之個體之免疫缺乏或相關病症的方法，其包含向該個體投與如上文所定義之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物。

【0105】 在另一特定實施例中，本發明係關於一種用於治療有需要之個體之免疫缺乏或相關病症的如上文所定義之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物。

【0106】 免疫缺乏症及相關病症表示特徵為個體中之免疫功能或反應降低及/或由免疫功能或反應降低所致之任何病狀或病理學。免疫缺乏症可由例如病毒感染(例如,HIV、B型肝炎等)、細菌感染、癌症或其他病理性病狀所致。術語「免疫缺乏相關病症」因此表示由免疫缺乏所致或與免疫缺乏有關之任何疾病。本發明尤其適用於治療與CD4-T細胞相關之免疫缺乏症，及相關疾病。

【0107】 在一特定實施例中，本發明係關於藉由向個體投與如上文所定義之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物治療該個體之HIV感染的方法。在一些實施例中，個體為早期HIV患者且該等方法使患者成為HIV控制者之概率增加。在一些實施例中，個體為在抗反轉錄病毒治療之後具有低免疫重建及/或具有重度特發性CD4 T淋巴球減少症(ICL)之患者。本發明亦係關於一種藉由向經HIV感染個體投與式A化合物來增加該個體中CD4-T細胞活性之方法。

【0108】 本發明可用於治療感染初期之個體以預防或減少免疫缺乏之發生、程度或持續時間。通常，其可在偵測到傳染病後立即及顯現臨床症狀之前進行投與。在HIV感染期間之極早期，本發明可引導患者朝向

HIV控制者狀態發展。本發明亦可在之後單獨地或與抗病毒劑組合用於被感染個體。在此方案中，本發明可加速CD4 T淋巴球之復原及其功能之恢復。因此，在一特定實施例中，本發明包含同時、分開或依序向具有病毒感染之個體投與(i)抗病毒劑及(ii)如上文所定義之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物。此方案尤其適合於治療經HIV感染個體，其中本發明抗體與抗反轉錄病毒療法(例如，HAART)組合使用，從而允許減少嚴重有害作用已知的HAART治療或甚至至少暫時中斷HAART治療。

【0109】 本發明亦提供藉由增加個體之免疫反應來治療癌症的方法，其包含向該個體投與如上文所定義之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物。本發明亦提供藉由向個體投與如上文所定義之抗體、核酸、載體、宿主細胞或組合物來治療該個體之與癌症相關的CD4 T細胞相關免疫缺乏的方法。

【0110】 本發明抗體(及任何其他治療劑)可藉由任何合適手段投與，包括非經腸、肺內及鼻內投與，且視需要針對局部治療，包括病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。部分視投與之短期或長期性而定，可藉由任何合適途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經各個時間點多次投與、藥團投與及脈衝式輸注。

【0111】 以下實例出於說明之目的給出而非作為限制。

【0112】

實例

1- 抗sPLA2-GIB抗體14G9之產生及表徵

1.1 - #14G9 mAb之產生

簡言之，用重組人類sPLA2-GIB使小鼠免疫，且針對其抑制能力及分別對sPLA2-GIB與前-sPLA2-IB之親和力篩選所產生mAb。

【0113】

1.2 - #14G9 mAb之表徵

1.2.1 - 藉由競爭性ELISA表徵親和力

藉由基於培養盤之競爭免疫分析量測抗體與前-sPLA2-IB及sPLA2-IB之結合親和力。對於競爭ELISA，簡言之，將不同位準下之恆定量之抗體與在0至10 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內之抗原蛋白、人類sPLA2-IB或前-sPLA2-IB的連續稀釋液預混合，且在室溫下培育兩小時以在抗體與抗原之間達成偽結合平衡。隨後將此等溶液轉移至96孔sPLA2-IB或前-sPLA2-IB預塗佈培養盤以允許混合物中之游離抗體與培養盤所塗佈之sPLA2-IB或前-sPLA2-IB結合。通常將培養盤在4°C下用30至100 ng人類sPLA2-IB或前-sPLA2-IB蛋白之PBS溶液塗佈隔夜，隨後進行BSA非特異性阻斷。在溶液中洗除過量抗體後，用HRP結合之山羊抗小鼠IgG或IgA多株抗體試劑偵測培養盤結合抗體且使用比色受質顯影。使用Prism™軟體(Graph Pad)利用4-參數擬合分析來分析信號與溶液中抗原之濃度的相依性且報導為IC50。

【0114】

1.2.2 - 藉由SPR進行親和力測定

前-sPLA2-IB及sPLA2-IB與#14G9抗體結合之親和力常數(KD)係藉由基於即時生物感測器表面電漿子共振分析(BIAcore™)之表面動力學測定。更特定言之，使用BIAcore® 2000來量測抗體對人類前-sPLA2-IB及sPLA2-IB之親和力。在抗小鼠IgG表面上獲取抗體且將其暴露於各種濃度之重組前-sPLA2-IB及sPLA2-IB蛋白。使用BIAevaluation™軟體進行動

力學分析以獲得締合及解離速率常數。

【0115】

1.2.3 - 藉由間接ELISA進行特異性測定

通常在4°C 下用含100 ng重組人類sPLA2-X、sPLA2-IBGIB或前-sPLA2-IB之PBS pH 7.5塗佈微量培養盤孔隔夜。用含有0.05% Tween 20之PBS洗滌樣本孔三次。在最終洗滌之後，在室溫下用含有含1%牛血清白蛋白(BSA)之PBS緩衝液的阻斷溶液處理樣本孔60 min。用含有0.05% Tween 20之PBS洗滌後，將量漸增(10 ng/mL達至3 µg/mL)之#14G9 mAb添加至經抗原塗佈孔 且在室溫下培育細胞120 min。在用含有0.05% Tween 20之PBS洗滌之後，用HRP結合之山羊抗小鼠IgG或IgA多株抗體試劑偵測#14G9 mAb之結合且使用比色受質顯影。使用Prism™軟體(Graph Pad)利用4-參數擬合分析來分析信號與溶液中抗原之濃度的相依性且報導為EC50。

【0116】

1.2.4 - sPLA2-IB酶活性之抑制

根據公開程序(Rouault等人2007)測試#14G9 mAb對sPLA2-IB酶活性之抑制。簡言之，將重組人類sPLA2-IB (0.1 nM)與量漸增(0.1、0.3、1及3 µg)之靶向人類sPLA2-IB之經純化家兔多株免疫血清或經純化#14G9抗體一起在37°C下培育30 min。隨後使用[3H]-油酸酯-放射性標記之經高壓處理大腸桿菌膜作為sPLA2活性緩衝液中之磷脂受質來量測sPLA2酶活性。藉由添加300 µL停止緩衝液來停止反應，隨後以10000 g離心混合物5 min，且對含有釋放之[3H]-油酸酯之清液層進行計數。

【0117】 使用市售螢光酶活性分析確認結果。將重組人類sPLA2-IB

(3 nM)與量漸增之經純化#14G9 mAb一起在室溫下培育120 min，隨後使用選擇性螢光法(AteroDX[®] sPLA2 Activity，Aterovax Paris，France)來量測sPLA2酶活性。結果以單位每mL樣本(U/mL)表述，其中一個單位定義為在一分鐘內催化1 nmol產物之釋放大sPLA2酶的量。分析之偵測極限為17 U/mL，其中上限線性分析範圍為232 U/mL，且功能靈敏度(20%)為21 U/mL。平均運行內變化率及平均分析內變化率分別為5.9%及8.9%。兩種方法之結果使用Prism[™]軟體(Graph Pad)利用4-參數擬合分析來分析且報導為IC₅₀。

【0118】

1.3 - #14G9 mAb對CD4 T細胞中磷酸STAT5之IL-7誘導核易位的活體外作用

1.3.1 - 磷酸STAT5之IL-7誘導核易位

使用RosetteSep分離套組(Stemcell技術，#15062)純化人類CD4。將CD4 T細胞以10⁶個細胞/毫升再懸浮於補充有5%胎牛血清(FBS)、50 mm HEPES pH 7.4、麩醯胺酸、青黴素、鏈黴素及兩性黴素B之RPMI 1640培養基(Lonza, Verviers, Belgium)(完全培養基)中並在37°C下於5% CO₂加濕氣氛中平衡至少2 h。

【0119】 使用共焦顯微鏡追蹤pSTAT5核易位。平衡之後，將固定化細胞塗鋪於經聚離胺酸塗佈之玻璃載片上，之後用2 nM IL-7活化15 min。在37°C下將細胞固定於4% PFA中15 min，隨後在RT下固定15 min，且在-20°C下滲透於90% 甲醇/水溶液中。隨後藉由用經驢抗家兔AlexaFluor 555 (Life Technologies，#A31572)標記之家兔抗pSTAT5 (CST，#9359)染色來顯露pSTAT5。對於人類CD4 T淋巴球，用經山羊抗

小鼠AlexaFluor 488 (Life Technologies, #A11029)標記之小鼠抗人類CD4 (eBioscience, #14-0042-82)來染色細胞。對於小鼠CD4 T淋巴球，用經雞抗大鼠AlexaFluor 488 (Life Technologies, #A21470)標記之大鼠抗小鼠CD4 (eBioscience, #14-0042-85)來染色細胞。使用水浸沒式複消色差40×/1.2 NA物鏡(Zeiss)或油浸沒式平場複消色差63×/1.4 NA物鏡(Zeiss)於倒置雷射掃描共焦顯微鏡(LSM700, Zeiss)上獲取超出繞射限制之影像。獲取影像且用ZEN軟體(Zeiss)分析。

【0120】

1.3.2 - #14G9 mAb對於HIV-1陽性血漿對人類CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制的活體外作用

對於劑量-反應實驗，首先將量漸增之#14G9 mAb或同型mAb與重組sPLA2-IB或來自一個HIV-1陽性患者之人類血漿(於PBS中之3%稀釋液v/v)一起在室溫下培育25 min，之後在37°C下培育5 min。隨後將經平衡混合物添加至自一個健康供體分離之CD4 T細胞，且藉由如上文所描述之共焦顯微鏡分析磷酸STAT5之核易位。對於單一劑量實驗，首先將10 µg (最終濃度)之#14G9 mAb、非抑制#6F7 mAb或同型對照mAb與來自五個不同HIV-1陽性患者之人類血漿(於PBS中之3%稀釋液v/v)一起在室溫下培育25 min，之後在37°C下培育5 min。隨後將經平衡混合物添加至自一個健康供體分離之CD4 T細胞，且藉由如上文所描述之共焦顯微鏡分析磷酸STAT5之核易位。

【0121】

1.4 - #14G9 mAb對於sPLA2-GIB對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制的活體內中和作用

將30個C57BL/6J SOPF雌性小鼠(Charles River Laboratories)保持於具有任意提供之無菌食物及水之SOPF條件下且在12小時之晝/夜循環下的單獨換氣籠中，且使其在新環境中穩定5天，之後開始實驗。所有實驗性程序已受到當地動物道德委員會(Animal Ethical Committee；CETEA 89，Institut Pasteur de Paris)批准。將30個動物劃分成6個實驗組(每組1個籠子)，藉由腹膜內注射接受測試產品之不同組合。第1組在T0接受1 mg (300 μ L)之同型對照mAb，隨後在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-IB；第2組在T0接受1 mg (300 μ L)之#14G9 mAb，隨後在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-IB；第3組在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-GIB；第4組在T+2h接受PBS注射(100 μ L)；第5組在T0接受PBS注射(100 μ L)；且第6組在T0接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-GIB。在研究開始之後的不同時間點藉由頸椎脫位術使小鼠安樂死。第1至4組在T + 5h安樂死，且第5及6組在T+ 48h安樂死。緊接在安樂死之後，自動物收集脾臟且在室溫下保持於含有5mL RPMI 5%之15 mL試管中直至進一步處理為止。用gentleMACS解離器(程式m_spleen_01)製備小鼠脾細胞，隨後使用EasySep分離套組(Stemcell Technologies，#19851)藉由負向選擇分離小鼠CD4。藉由如上文所描述之共焦顯微鏡分析磷酸STAT5之核易位。使用曼-惠特尼檢定比較各組之中值。

【0122】

1.5 - #14G9 mAb之序列

#14G9 mAb之可變區係根據經典程序定序。簡言之，高純度RNA係自融合瘤細胞提取且互補DNA股係使用高真度逆轉錄酶合成。使用高真度PCR產生之PCR產物及特異性靶向編碼抗體重鏈及輕鏈之cDNA之簡併

引子經直接定序(雙股定序)。分析且組裝cDNA序列。肽序列係根據抗體結構來轉譯及驗證。

【0123】

2- #14G9抗體之人類化

2.1 - #14G9人類化變異體之人類化策略及產生

藉由將如藉由Kabat命名法所定義之三個CDR自輕鏈可變區(VL)接枝至儘可能與小鼠抗體VL同源之人類生殖系VL中來人類化#14G9小鼠抗體。類似地，將來自重鏈可變區(VH)之三個CDR接枝至儘可能小鼠抗體VH同源之人類生殖系VH中。另外，所選人類生殖系可變區之構架區中的一些胺基酸殘基變成小鼠可變區中存在之胺基酸殘基(所謂的回復突變)。

【0124】

2.2 - 藉由人類化抗體抑制sPLA2-GIB酶活性

根據公開程序(Rouault等人2007)測試人類化抗體#1A、#1B、#2A及#2B對sPLA2-GIB酶活性之抑制。簡言之，重組人類sPLA2-GIB (0.05 nM)與量漸增(0.1、0.3、1及3 μ g)之經純化抗體一起在37°C下培育30 min。隨後使用[3H]-油酸酯-放射性標記之經高壓處理大腸桿菌膜作為sPLA2活性緩衝液中之磷脂受質來量測sPLA2酶活性。藉由添加300 μ L停止緩衝液來停止反應，隨後以10000 g離心混合物5 min，且對含有釋放之[3H]-油酸酯之清液層進行計數。

【0125】

2.3 - 藉由競爭性ELISA進行人類化抗體之親和力測定

藉由基於培養盤之競爭免疫分析量測人類化抗體與前-sPLA2-GIB及sPLA2-GIB之結合親和力。對於競爭ELISA，簡言之，將不同位準下之恆

定量之抗體與在0至10 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內之抗原蛋白、人類sPLA2-GIB或前-sPLA2-GIB的連續稀釋液預混合，且在室溫下培育兩小時以在抗體與抗原之間達成偽結合平衡。隨後將此等溶液轉移至96孔sPLA2-GIB或前-sPLA2-GIB預塗佈培養盤以允許混合物中之游離抗體與培養盤所塗佈之sPLA2-GIB或前-sPLA2-GIB結合。通常將培養盤在4°C下用30至100 ng 人類sPLA2-GIB或前-sPLA2-GIB蛋白之PBS溶液塗佈隔夜，隨後進行BSA非特異性阻斷。在溶液中洗除過量抗體後，用HRP結合之山羊抗小鼠IgG或IgA多株抗體試劑偵測培養盤結合抗體且使用比色受質顯影。使用Prism™軟體(Graph Pad)利用4-參數擬合分析來分析信號與溶液中抗原之濃度的相依性且報導為IC50。

【0126】

2.4 - 人類化抗體之差示掃描熱量測定

於Microcal VP-Capillary DSC系統上藉由差示掃描熱量測定(DSC)比較抗體#1A、#1B、#2A及#2B之PBS緩衝液之熱穩定性。將所有樣本裝運於乾冰中，且藉由在-20 °C下隔夜培育、之後冰培育2小時來解凍。樣本解凍後，將所有樣本離心(20,000×g，5 min，4°C)，且在DSC分析之前，在Nanodrop ND-1000光譜光度計上利用IgG分析程式將其蛋白質含量定量。預平衡時間為3 min，且用60°C/小時之掃描比率、25秒之濾波時段及中等反饋在20與110°C之間獲取所追蹤熱譜圖。在樣本分析之前，量測5次緩衝液/緩衝液掃描以穩定儀器，且在每一蛋白質/緩衝液掃描之間進行一次緩衝液/緩衝液掃描。

【0127】

2.5 - 人類化抗體之分析性尺寸排阻層析(SEC-HPLC)

在Shimadzu Prominence HPLC上於Superdex 200 increase 5/150 GL管柱(GE Healthcare)上進行分析性尺寸排阻層析(SEC-HPLC)。事先將管柱以0.25 mL/min於PBS中平衡，管柱烘箱設定成30℃。將所有樣本離心(20000g，5 min，4℃)，且在SEC分析之前在Nanodrop ND-1000光譜光度計上利用IgG分析程式將其蛋白質含量定量。等濃度程式經設定成在18 min期間以0.25 mL/min噴射每一樣本約15 µg。SEC分析之後，自原始數據提取280 nm層析圖且藉由波峰積分來進行分析。來自GE Lifesciences分子量SEC校準套組之一系列蛋白質用以在樣本分析期間所使用之相同條件及緩衝液下校準管柱。所用蛋白質為：抑肽酶(6.500 Da)、核糖核酸酶A (13.700 Da)、碳酸酐酶(29.000 Da)、卵白蛋白(44.000 Da)、伴白蛋白(75.000 Da)及醛縮酶(158.000)。藍色聚葡萄糖用以判定管柱之空隙體積。根據Gel Filtration校準套組說明書(GE Lifesciences)完成管柱校準。

【0128】

3- #2B1及#2B2之表徵

3.1- #2B、#2B1及#2B2抗體之SPR親和力測定

前-sPLA2-GIB及sPLA2-GIB與#2B、#2B1及#2B2抗體結合之親和力常數(KD)係藉由基於即時生物感測器表面電漿子共振分析(BIAcore™)之表面動力學測定。更特定言之，使用BIAcore® 2000來量測抗體對人類前-sPLA2-IB及sPLA2-IB之親和力。在抗小鼠IgG表面上獲取抗體且將其暴露於各種濃度之重組前-sPLA2-IB及sPLA2-IB蛋白。使用BIAevaluation™軟體進行動力學分析以獲得締合及解離速率常數。

【0129】

3.2 - #2B1及#2B2人類化抗體之差示掃描熱量測定

藉由如上文所描述之差示掃描熱量測定(DSC)比較#2B1及#2B2抗體於PBS緩衝液中之熱穩定性。

【0130】

3.3- #2B1及#2B2人類化抗體之分析性尺寸排阻層析(SEC-HPLC)

如上文所描述進行#2B1及#2B2之分析性尺寸排阻層析(SEC-HPLC)分析。

【0131】

3.4 - #2B1及#2B2人類化抗體之毛細管等電聚焦分析

以最終蛋白質濃度0.2 mg/mL在脲存在下使用Pharmalyte pH3-10 (適用於大部分mAb之寬範圍)藉由成像毛細管等電聚焦(icIEF)分析測定#2B、#2B1及#2B2之電荷變異體之等電點及相對分佈。將括入樣本之預期pI的兩個pI標記用於校準。讀出之資料以吸收率(280 nm下)形式經量測且以電泳圖表述。使用Compass及Empower 3軟體計算pI值，且在Empower 3中進行波峰積分。

【0132】

3.5 -#2B、#2B1及#2B2人類化抗體與人類FcγR之結合

藉由將#2B、#2B1及#2B2抗體(100 ng/mL)與穩定表現人類FcγR之 1×10^5 個CHO細胞一起在冰上培育30 min來測試單體IgG結合。隨後洗滌細胞、剝離、固定且藉由流動式細胞測量術分析(FACSCalibur；BD Biosciences)。使用0.5 mg/mL之PE結合山羊抗人類IgG F(ab')₂片段(Jackson Laboratories；Cat# 109-096-006)偵測已結合mAb。

【0133】 藉由在37°C下將10 μg/ml人類化抗體與5 μg/ml sPLA2-

GIB共培育30 min來產生抗體-抗原免疫複合體。隨後將免疫複合體與穩定表現人類FcγR之 1×10^5 個CHO細胞在冰上一起培育30 min。隨後洗滌細胞、剝離、固定且藉由流動式細胞測量術分析(FACSCalibur; BD Biosciences)。使用0.5 mg/mL之PE結合山羊抗人類IgG F(ab')₂片段(Jackson Laboratories; Cat# 109-096-006)偵測已結合mAb。

【0134】 藉由首先將#2B、#2B1及#2B2抗體(10 μg/mL)與穩定表現人類FcγR之 1×10^5 個CHO細胞在冰上一期培育30 min來測試抗原於抗體致敏細胞上之剩餘結合。洗滌後，在冰經30 min添加sPLA₂-IB生物素標記之抗原(5 μg/mL)。隨後洗滌細胞、剝離、固定且藉由流動式細胞測量術分析。使用抗生物素蛋白-FITC結合物偵測已結合經生物素標記抗原。使用流動式細胞測量術分析軟體(FlowJo)分析所有資料。

【0135】

4- #2B2人類化抗體之生物特性

4.1 - #2B mAb對CD4 T細胞中磷酸STAT5之IL-7誘導核易位的活體外用

首先將量漸增之#14G9或#2B抗體在室溫下培育25 min，之後在37°C下與75 nM重組sPLA₂-GIB或來自一個HIV-1陽性患者之人類血漿(於PBS中之3%稀釋液v/v)一起培育5 min。隨後將經平衡混合物添加至自一個健康供體分離之CD4 T細胞，且藉由如上文所描述之共焦顯微鏡分析磷酸STAT5之核易位。使用Prism™軟體(Graph Pad)利用4-參數擬合分析來分析劑量相依曲線且報導為EC₅₀。

【0136】

1.4 - #2B2對於sPLA₂-IB對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之

抑制的活體內中和作用

將18個7週大的C57BL/6J SOPF雄性小鼠(Charles River Laboratories)保持於具有任意提供之無菌食物及水之SOPF條件下且在12小時之晝/夜循環下的單獨換氣籠中，且使其在新環境中穩定5天，之後開始實驗。所有實驗性程序已受到當地動物道德委員會(CETEA 89，Institut Pasteur de Paris)批准。將18個動物劃分為5個實驗組(每組1個籠子)，藉由腹膜注射接受測試產品之不同組合。第1組在T0接受PBS注射(350 μ L)，隨後在T+2h接受PBS注射(100 μ L)；第2組在T0接受PBS注射(350 μ L)，隨後在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-GIB；第3組在T0接受2 mg(350 μ L)之同型對照mAb，隨後在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-GIB；第4組在T0接受1 mg (350 μ L)之#2B2人類化mAb，隨後在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-IB；第5組在T0接受2 mg (350 μ L)之#2B2人類化mAb，隨後在T+2h接受100 μ g (100 μ L)之sPLA2-IB。在研究開始之後的T+5h藉由頸椎脫位術使小鼠安樂死。緊接在安樂死之後，自動物收集脾臟並立即進行處理。用gentleMACS解離器製備小鼠脾細胞，隨後使用EasySep分離套組(Stemcell Technologies，#19851)藉由負向選擇分離小鼠CD4。藉由如上文所描述之共焦顯微鏡分析磷酸STAT5之核易位。使用曼-惠特尼檢定比較各組之中值。

【0137】

結果

5- 抗sPLA2-IB 14G9抗體之產生及表徵

5.1 - #14G9 mAb之產生及表徵

簡言之，用重組人類sPLA2-IB使小鼠免疫，且針對其抑制能力及分

別對sPLA2-IB與前-sPLA2-IB之親和力篩選所產生mAb。顯示#14G9 mAb以2.3 nM之估計EC50抑制sPLA2-IB酶活性(圖1A)，對於sPLA2-GIB與前-sPLA2-GIB (圖1B及圖1C)具有高度特異性。在競爭ELISA中，前-sPLA2-GIB及sPLA2-GIB之IC50分別經估計為108.6 nM及1.0 nM。前-sPLA2-GIB及sPLA2-GIB與#14G9結合之親和力常數(KD)係藉由基於即時生物感測器表面電漿子共振分析(BIAcore™)之表面動力學測定。在此等實驗中，前-sPLA2-IB及sPLA2-IB之Kd分別經估計為174 nM及0.34 nM。

【0138】

5.2 - #14G9 mAb對於來自HIV-1感染患者之血漿對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制的活體外作用

近期，sPLA2-IB酶經鑑別在病毒血症HIV感染患者中之CD4 T淋巴球之無應答性背後之機制中起到關鍵作用。詳言之，經證實，sPLA2-IB為造成CD4 T淋巴球之慢性活化的蛋白質，其迫使CD4 T淋巴球進入異常活化分化狀態，使得CD4 T淋巴球難以對某些生理學信號(諸如藉由介白素-7傳送的彼等信號)作出反應(THÉZE Jacques等人2015)。

【0139】 藉由將自HIV-1病毒血症患者分離之血漿與#14G9 mAb一起培育來測試#14G9 mAb抗衡自HIV-1感染患者分離之血漿對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制作用的能力。

【0140】 如圖2中所描繪，量漸增之#14G9 mAb引起來自病毒血症患者之血漿抑制自一個健康供體分離之人類CD4 T細胞中由IL-7誘導之磷酸STAT5之核易位的能力之劑量相依復原。對於同型對照mAb，未觀測到此劑量-反應復原作用。此等結果在使用單次劑量(10 µg)之#14G9 mAb或

10 μg之非抑制性#6F7 mAb或同型對照mAb對自5個不同健康供體分離之CD4 T細胞進行的5個相繼實驗中再現(圖3)。

【0141】

5.3 - #14G9 mAb對於sPLA2-IB對磷酸STAT5核易位之抑制的活體內作用

藉由首先在小鼠中注射1 mg之#14G9 mAb，之後注射100 μg之sPLA2-IB來測試#14G9 mAb活體內抗衡注射sPLA2-IB對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制作用的能力。隨後藉由共焦顯微鏡分析自經處理小鼠之脾細胞分離之CD4 T細胞中的磷酸STAT5之核易位。

【0142】 如圖4中所描繪，在小鼠中注射1 mg之sPLA2-IB引起對自脾細胞分離之CD4 T細胞中磷酸STAT5之核易位的60%抑制。此作用藉由事先注射1 mg之#14G9 mAb而完全消除，其中在對照注射中未觀測到顯著作用。

【0143】

5.4 - #14G9 mAb可變區之序列

#14G9 mAb之輕鏈及重鏈之可變區經定序且如下經呈現。

>14G9-VL (SEQ ID NO: 8)
GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAACTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAG
CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAAGAAAAAC
CAGGTCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCT
AATCGCTTCACAGGCAGTAGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCA
GGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTCAGCAAGATTATAGCACTCCTCCTACGTTTCG

GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC

>14G9-VL (SEQ ID NO: 2)
DIVMTQSHKLMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQEKPGQSPKLLIYWASTRHTGVP
NRFTGSRSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQDYSTPPTFGAGTKLELKRADAAPT VSI

>14G9-VH (SEQ ID NO: 9)

CAGGTCCAACAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATACACTGGGTGAAGCGGA
GGCCTGGACAAGGCCTTGAATGGATTGGTAATATTGACCCTTCTGATACTAGAACTCAC
TACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGGCTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGC
CTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTTTTACTGTGCAAGAC
AGACCCTCTACTATGAGGCCTTGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC
TCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGG

>14G9-VH (SEQ ID NO: 3)
QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWVKRRPGQGLEWIGNIDPSDTRTH
YNQKFQDKATLAVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVFYCARQTLYYEALDYWGQGTTLTVS
SAKTTTPPSVYPL

【0144】 在大部分抗體中，保守性VH/VL介面主要由重鏈構架殘基中Kabat位置H37、H45、H47、H89、H91、H100B及H103與輕鏈構架殘基中Kabat位置L36、L44、L46、L87、L96及L98之間的疏水相互作用以及H39與L38之間的氫結合構成。

【0145】 #14G9單株抗體之突出且特有之特徵為Arg在Kabat位置H39處及Glu在Kabat位置L38處之不同尋常之存在，而非普通及高度保守性之Gln存在於該兩個位置。在14G9中，Gln H39與Gln L38之間的氫結合相互作用經Arg H39與Glu L38之間的靜電引力置換。

【0146】

6- #14G9小鼠單株抗體之人類化

6.1 - 人類化抗體之人類化策略及產生

藉由將如藉由Kabat命名法所定義之三個CDR自輕鏈可變區(VL)接枝至儘可能與小鼠抗體VL同源之人類生殖系VL中來人類化#14G9小鼠抗體。類似地，將來自重鏈可變區(VH)之三個CDR接枝至儘可能與小鼠抗體VH同源之人類生殖系VH中。另外，所選人類生殖系可變區之構架區中的一些胺基酸殘基變成小鼠可變區中存在之胺基酸殘基(所謂的回復突變)。基於關於免疫球蛋白可變區之結構之資訊，構架區中之此等少數殘

基經鑑別在將CDR維持於正確構形或VH/VL組裝中並因此保留於人類化型式A及B中起到關鍵作用。針對#14G9 VH之CDR接枝型式之設計，選擇兩個人類生殖系IGHV1-46*01及IGHV5-10-1*01。選擇人類生殖系IGHV1-46*01，是因為其展現跨整個V基因與小鼠14G9 VH之間的最佳總體一致性66.3%。選擇人類生殖系IGHV5-10-1*01，是因為儘管其與14G9 VH具有較低總體一致性(58.2%)，但其具有不同於IGHV1-46*01的跨整個14G9 VH之同源性型態。針對14G9 VL之CDR接枝型式之設計，選擇兩個不同人類κ生殖系IGKV1-39*01及IGKV3-15*01。選擇IGKV1-39*01，是因為其具有跨整體V基因與小鼠14G9 VL之最高同源性，一致性為67.4%。儘管一致性百分比較低(62.1%)，但選擇IGKV3-15*01，是因為其具有不同於IGKV1-39*01的與#14G9 VL在CDR內之一致性型態。

【0147】人類化型式之設計考慮到Arg H39及Glu L38在VH/VL介面處之不尋常的存在。在CDR接枝VH及VL序列之型式A中，在H39 (Arg)及L38 (Glu)處之親本小鼠殘基分別為保守性的。在型式B中，Kabat位置H39及L38處之親本殘基經Gln (人類生殖系對應殘基)取代以便重新產生高度保守的氫結合相互作用。因此，針對用於CDR接枝#14G9之設計的每一人類生殖系(2個用於VH且2個用於VL)，建構2個型式(A及B)。型式A具有Arg H39 (VH)或Glu L38 (VL)，而型式B在兩個位置處具有Gln。VH之人類化型式A僅與VL之人類化型式A配對，且對於人類化型式B，原理相同。表1中呈現小鼠#14G9融合瘤與CDR接枝型式之間的跨整體V基因之序列一致性百分比(亦即，人類化百分比)之增加。表2呈現人類化型式與對應免疫球蛋白可變人類生殖系之間的跨V基因之序列差異的細節。

【0148】

6.2 - 藉由人類化抗體抑制sPLA2-IB酶活性

藉由在存在量漸增之經純化單株抗體的情況下將經放射性標記膜與重組人類sPLA2-IB一起培育來測試不同人類化抗體抑制sPLA2-IB酶活性的能力。結果表述為在所測試mAb之最高濃度下觀測到的酶活性抑制百分比且呈現於表3中。如所呈現，#2B為具有抑制sPLA2-GIB之最高效力的mAb。

【0149】

6.3 - 藉由競爭性ELISA進行人類化抗體之親和力測定

藉由基於培養盤之競爭免疫分析量測人類化抗體分別與人類前-sPLA2-GIB及人類sPLA2-GIB之結合親和力。簡言之，將不同位準下之恆定量之抗體與抗原蛋白的連續稀釋液預混合以在抗體與抗原之間達成偽結合平衡。隨後將此等溶液轉移至抗原預塗佈培養盤以允許混合物中之游離抗體與培養盤所塗佈之sPLA2-GIB或前-sPLA2-GIB結合。用HRP結合多株抗體偵測培養盤結合抗體。圖5中呈現震盪不同變異體所獲得之滴定曲線之實例。資料與4PL邏輯斯蒂非線性回歸模型擬合，且相對IC₅₀值係根據該模型估計(表4)。

【0150】

6.4 - 人類化抗體之差示掃描熱量測定

圖6中呈現不同所測試抗體之標準化熱變性，且表5中呈現DSC參數。T_m為變性/熔融溫度。T_{onset}為伸展轉變開始的溫度。T_{1/2}為在波峰之半高處的轉變之寬度。ΔH為量熱伸展焓且反映蛋白質之分子內相互作用之破壞。總面積為整體伸展焓(熱譜圖下之總面積)且反映熱力學穩定性。

藉由DSC，根據所有熱譜圖之疊加(圖6)，#1B為具有較佳特性之一者。第一轉變(約70至72℃)應對應於CH₂域。最後轉變(約82至83℃)應對應於CH₃，且最高波峰對應於Fab轉變。在#2A中，Fab轉變在CH₂頂部，所有其他變異體在CH₃轉變之頂部上具有Fab轉變，且至少在#2B上，Fab轉變之右端上之肩峰應對應於CH₃轉變。

【0151】

6.5 - 人類化抗體之分析性尺寸排阻層析(SEC-HPLC)

在PBS緩衝液中藉由SEC-HPLC分析人類化#1A、#1B、#2A及#2B抗體。圖7中呈現#2B之代表性層析圖，且結果彙總於表6中。如所呈現，所有變異體顯示接近160 kDa之表觀分子量，指示單體構形且在所測試條件下不存在聚集。

【0152】

6.6 - #2B序列

基於上文所描述之抑制性、結合及生理特性，選擇#2B抗體以供進一步最佳化。變異體#2B之重鏈顯示與IGHV1-46*01人類生殖系之81.60%一致性(80/98)。#2B之輕鏈顯示與IGKV3-15*01生殖系之86.3%一致性(82/95)。#2B之總體一致性%為與參考人類生殖系83.94%一致。

【0153】

#2B之重鏈及輕鏈之序列呈現如下：

重鏈

> 3352.VH 2B (SEQ ID NO: 11)

gcgggccgcatgaattttggactgaggctgattttcctgggtgctgaccctgaaaggcgctccagt
gtcaagtccagctcgtccagagcggggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtgaaagtctcgtgcaa
ggcgagcggatatacgttcacgaactactggattcactgggtccggcaagcgccggggcaggggctggag
tgatcggggaacatcgaccgctcgacacgcggacgcactacaaccagaagttcaaggaccggggcgacgc
tgaccgtcgacaagagcacgagcacggcgtagatggagctgtcgagcctgaggagcaggacacggcgct
ctactactgcgcggcgagacgctgtactacgaggcgctggactactgggggcaggggacgctcgtcacg
gtctcgagcgctagcacaaggccctagtgtgtttcctctgggtccctcttccaaatccacttctgggtg
gcactgctgctctgggatgcctgggtgaaggattactttcctgaacctgtgactgtctcatggaactctgg
tgctctgacttctgggtgtccacactttccctgctgtgctgcagtctagtggactgtactctctgtcatct
gtgggtcactgtgccctcttcatctctgggaaccacagacctacatttgtaatgtgaaccacaaaccatcca
acactaaagtggacaaaagagtggaaacccaaatcctgtgacaaaaccacacctgccaccttgtcctgc
ccctgaactgctgggaggaccttctgtgtttctgttcccccccaaaccaaaggataccctgatgatctct
agaaccctgaggtgacatgtgtggtggtggatgtgtctcatgaggaccctgaggtcaaattcaactggt
acgtggatggagtggaaagtccacaatgccaaaaccaagcctagagaggaacagtacaattcaacctacag
agtggtcagtgtgctgactgtgctgcacaggattggctgaatggcaaggaatacaagtgtaaagtctca
aacaaggccctgctgctccaattgagaaaacaatctcaaaggccaaggacagcctagggaacccaggg
tctacaccctgccaccttcaagagaggaaatgacaaaaaccaggtgtccctgacatgctggtcaaagg
cttctacccttctgacattgctgtggagtgggagtcaaatggacagcctgagaacaactacaaaacaacc
ccccctgtgctggattctgatggctctttctttctgtactccaaactgactgtggacaagtctagatggc
agcaggggaatgtcttttcttctgtctgtcatgaggtctgcataaccactacactcagaaatccct
gtctctgtctcccggaatgatagtaaaagctttga

輕鏈

> 3352.VL2.B (SEQ ID NO: 10)

Gcgggccgcatgaattttggactgaggctgattttcctgggtgctgaccctgaaaggcgctccagt
gtgagatcgtgatgacgcagtcgccggcgacgctgagcgtgagtcgggggagcggggcgacgctgagctg
caaggcgtcgcaggacgtgagcacggccgtcgcgtggatcaacagaagccggggcaagcgccgcggctg
ctgatctactgggcgagcacgcggcacacgggcatccggcgcgattctcggggagcgggagcgggacgg
agtacacgctgacgatctcgtcgtgcaaagcgaggacttcgccgtctactactgccagcaggactactc
gacgccgccgacgttcgggggggtaccaaggtcgagatcaaacgtacggtcgcggcgcccttctgtgttc
attttccccccatctgatgaacagctgaaatctggcactgcttctgtggtctgtctgctgaacaacttct
accctagagaggccaaagtccagtggaaagtggacaatgctctgcagagtgggaattcccaggaatctgt
cactgagcaggactctaaggatagcacatactccctgtcctctactctgacactgagcaaggctgattac
gagaaacacaaagtgtacgcctgtgaagtcacacatcaggggctgtctagtctgtgaccaaatccctca
ataggggagagtgtgatagtaaaagctttga

> 重鏈(SEQ ID NO: 5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGNIDPSDTRTHYNQKF
KDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARQTLYYEALDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 輕鏈(SEQ ID NO: 4)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQDVSTAVAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRHTGIPARFSG
SRSGTEYTLTISSLQSEDFAVYYCQQDYSTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

【0154】

7- #2B1及#2B2人類化變異體之表徵

7.1 - 消除CDC及ADCC之點突變之策略

藉由引入已知消除mAb之重鏈恆定區中之ADCC及CDC功能兩者的特異性點突變來進一步最佳化人類化#2B抗體。

【0155】 所得抗體#2B1 (雙重突變L234A及L235E)及#2B2 (三重突變L234A、L235E及P331S)之序列呈現如下：

2B1 (突變L234A及L235E)

重鏈

SEQ ID NO: 12

gcgggccgccatgaatTTTGGactgaggctgattTTTcctggTgctgaccctgaaagggcgTccagt
gtcaagtccagctcgtccagagcggggCGgaagtcaagaagccgggggCGagcgTgaaagtctcgtgcaa
ggcgagcggatatacgtTcacgaactactggattcactgggtccggcaagcgccggggcaggggctggag
tggatcgggaaacatcgaccCGtcggacacgcgggacgcactacaaccagaagTtcaaggaccgggCGacgc
tgaccgTcgacaagagcacgagcacggcgTacatggagctgTcgagcctgCGgagcgaggacacggcCGt
ctactactgCGcgCGgcagacgctgtactacgaggcgctggactactgggggCaggggacgctcgtcacg
gtctcgagcgctagcacaagggccctagtgtgtTtTcctctggctccctctTccaaatccacttctggTg
gcactgctgctctgggatgcctggTgaaggattactTTTcctgaacctgtgactgtctcatggaactctgg
tgctctgacttctggTgtccacactTTTccctgctgtgctgcagtctagtggactgtactctctgtcatct
gtggTcactgtgccctctTcatctctgggaaccCagacctacattTgtaatgtgaaccacaaaccatcca
aactaaagtggacaaaagagtgaaccCaaatcctgtgacaaaaccCacacctgcccacctgtccggc
gcctgaagcggaaggaggaccttctgtgtTtTctgtTccccccCaaaccCaaaggataccctgatgatctcg
cgaaccctgaggTgacatgtgtggTggTggatgtgtctcatgaggaccCgaagtcaaattTtaattggT
atgtcgagggcgTcgaggTgcataatgCcaaaaccCagcctagagaggaacagtacaattcaacctacag
agtcgTcagtgtgctgactgtgctgcatcaggattggctgaatggcaaggaatacaagtgtaaagtctca
aacaaggccctgcctgctccaattgagaaaacaatctcaaaggccaagggacagcctagggaaaccCagg
tctacacctgCcaccttcaagagaggaaatgacCaaaaaccaggTgtccctgacatgcctggTcaaagg
cttctacccttctgacattgctgtggagtgggagtcaaTggacagcctgagaacaactacaaaaaacc
ccccctgtgctggattctgatggctctTtTctTctgtactccaaactgactgtggacaagtctagatggc
agcaggggaatgtctTtTctTgtctgtcatgcatgaggctctgcataaccactacactcagaaatccct
gtctctgtctcccggaatgataagctTtga

輕鏈

與2B相同(參見SEQ ID NO: 10)

> 重鏈(SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGNIDPSDTRTH
YNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQTLYYEALDYWGQGTLTVTSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPE**AE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

> 輕鏈

與2B相同(參見SEQ ID NO: 4)

2B2 (突變L234A、L235E及P331S)

重鏈

SEQ ID NO: 13

gcgggccgcatgaatTTTggactgaggctgattTTTcctggTgctgaccctgaaaggcgTccagt
gtcaagtccagctcgtccagagcggggCGgaagtcaagaagcgggggCGagcgTgaaagtctcgtgcaa
ggcgagcggaatacgtTcacgaactactggattcactgggtccggcaagcgccggggcaggggctggag
tgatcggggaacatcgaccctcgacacgcggacgcactacaaccagaagTtcaaggaccgggCGacgc
tgaccgtcgacaagagcacgagcacggcgTacatggagctgtcgagcctgCGgagcgaggacacggcgt
ctactactgcgcgCGgacagctgtactacgaggcgctggactactgggggCaggggacgctcgtcacg
gtctcgagcgctagcacaaggGCCctagtgtgtTtTcctctggTcctcttccaaatccacttctggTg
gcactgtgctctgggatgcctggTgaaggattactTTTcctgaacctgtgactgtctcatggaactctgg
tgctctgacttctggTgtccacactTTTcctgtgtgctgcagtctagtggactgtactctctgtcatct
gtggTcactgtgccctcttcatctctgggaaccagacctacattTgtaatgtgaaccacaaaccatcca
aactaaagtggacaaaagagtggaaacccaaatcctgtgacaaaaccacacctgcccacctgtccggc
gcctgaagcggaaggaggaccttctgtgtTtTcctgttccccccaaaccaaaggataccctgatgatctcg
cgaaccctgaggTgacatgtgtggTggTggatgtgtctcatgaggacccCGaagtcaaatttaattggT
atgtcgagcgcgTcgaggTgcataatgccccaaacCGcctagagaggaacagtacaattcaacctacag
agtctcagtgtgctgactgtgctgcacaggattggctgaatggcaaggaatacaagtgtaaagtctca
aacaaggccctgctgcttcaattgagaaaacaatctcaaaggccaagggacagcctagggaacccag
tctacaccctgccaccttcaagagaggaaatgacaaaaaccaggtgtccctgacatgctggTcaaagg
cttctacccttctgacattgtgtggagtgggagtcaaatggacagcctgagaacaactacaaaacaacc
ccccctgtgctggattctgatggctctTtTtTtctgtactccaaactgactgtggacaagtctagatggc
agcaggggaatgtctTtTtTtctgtctgtcatgcatgaggctctgcataaccactacactcagaaatccct
gtctctgtctcccggaatgataagctTtTgatgtcatgcatgaggctctgcataaccactacactcaga
aatccctgtctctgtctcccggaatgataagctTtTga

輕鏈

與2B相同(參見SEQ ID NO: 10)

> 重鏈(SEQ ID NO: 7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGNIDPSDTRTH
YNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQTLYYEALDYWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPEAEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

> 輕鏈

與2B相同(參見SEQ ID NO: 4)

【0156】

7.2- #2B1及#2B2人類化抗體之SPR親和力測定

前-sPLA2-GIB及sPLA2-GIB與#2B1及#2B2結合之親和力常數(KD)係藉由基於即時生物感測器表面電漿子共振分析(BIAcore™)之表面動力學測定。在抗小鼠IgG表面上獲取抗體且將其暴露於各種濃度之重組前-sPLA2-IB及sPLA2-IB蛋白。使用BIAevaluation™軟體進行動力學分析以獲得締合及解離速率常數(表7)。如表7中所呈現，在#2B1或#2B2中引入雙重或三重突變並不顯著影響變異體對sPLA2-IB目標之親和力。

【0157】

7.3 - #2B1及#2B2人類化抗體之差示掃描熱量測定

圖8中呈現#2B1及#2B2之標準化熱變性，且表8中呈現DSC參數。#2B1在此等實驗中顯示較佳特徵曲線，因為Tonset及Tm1(對應於CH2)較高。

【0158】

7.4- #2B1及#2B2人類化抗體之分析性尺寸排阻層析(SEC-HPLC)

在PBS緩衝液中藉由SEC-HPLC分析#2B1及#2B2。結果彙總於表9中。如所呈現，小於5%之mAb以高分子量聚集物存在，指示單體構形且在所測試條件下不存在聚集。

【0159】

7.5 - #2B1及#2B2人類化抗體之毛細管等電聚焦分析

藉由成像毛細管等電聚焦(icIEF)分析測定#2B、#2B1及#2B2之電荷變異體之等電點及相對分佈。結果彙總於表10中。對於所有抗體，以低

RSD值%獲得重複結果。對於#2B，主峰之pI為8.96，對於#2B1為8.76，且對於#2B2為8.75。除主峰之pI略微不同以外，#2B亦顯示與其他兩個樣本相反的略微不同之電荷變異體特徵曲線。雖然#2B1及#2B2與酸性電荷相比更具鹼性，但#2B相反(表10)。#2B中之主峰包含所有波峰之64%，而在#2B1及#2B2中，主峰僅包含57%。在所有所測試樣本中，未偵測到前酸性波峰及後鹼性波峰。

【0160】

7.6 -#2B、#2B1及#2B2與人類FcγR之結合

藉由將mAb與穩定表現人類FcγRI、FcγRIIA (H131)、FcγRIIA(R131)、FcγRIIB、FcγRIIIA(F176)、FcγRIIIA(V176)、FcγRIIIB(NA1)、FcγRIIIB(NA2)及FcγRIIIB(SH)之CHO細胞一起培育來藉由流動式細胞測量術測試單體#2B、#2B1及#2B2與人類FcγR之結合(REF P. Bruhns)。如圖9中所呈現，#2B僅與hFcγRI及hFcγRIIIA (V176)結合，而未觀測到#2B1及#2B2與所有所測試hFcγR之單體結合。藉由首先將mAb與抗原一起培育，且隨後將形成之免疫複合體與穩定表現人類FcγR的CHO細胞一起培育來測試抗體-抗原免疫複合體。#2B之免疫複合體與除hFcγRIIB外之所有所測試hFcγR結合(圖10)。觀測到#2B1之免疫複合體與hFcγRIIIA (V176)之較弱結合(資料未展示)，而未觀測到#2B2與任何所測試hFcγR之免疫複合體結合(資料未展示)。藉由首先將#2B、#2B1及#2B2與穩定表現人類FcγR之CHO細胞一起培育來測試抗原在抗體致敏細胞上之剩餘結合。洗滌後，添加sPLA2-GIB生物素標記抗原且使用抗生物素蛋白-FITC結合物藉由流動式細胞測量術進行偵測。如圖11中所描繪，當與hFcγRI及hFcγRIIIA (V176)結合時觀測到sPLA2-GIB抗原與

mAb #2B之剩餘結合。相反，未觀測到sPLA2-GIB抗原與mAb #2B1及#2B2之剩餘結合。

【0161】

7.7 - #2B2 Fab與sPLA2-GIB之共結晶及抗原決定基之定義

使#2B2之Fab片段與其抗原共結晶，基於Soleil同步加速器上之PROXIMA -1射束線收集共晶體之sPLA2-GIB及X射線繞射資料(St.Aubin, France)。晶體屬於每不對稱單元具有兩種sPLA2-GIB/Fab複合體之P21空間群($a = 71.9\text{\AA}$, $b = 83.8\text{\AA}$, $c = 103.9\text{\AA}$; $\alpha = \beta = 99.58^\circ$)(圖12A)。sPLA2-GIB/Fab複合體之結構之解析度實現與參與複合體中之非共價相互作用的關鍵殘基之鑑別及#2B2抗原決定基之定義。如圖12B中所呈現，sPLA2-IB中之W3、R6及K7參與與Fab輕鏈之相互作用，且sPLA2-GIB中之K10、C77、Y75、G79及S80參與與Fab重鏈之相互作用。

【0162】

8- #2B2人類化抗體之生物特性

8.1- #2B人類化抗體對於sPLA2-GIB或來自HIV感染患者之血漿對磷酸STAT5核易位之抑制的活體外作用。

藉由將自HIV-1感染患者分離之血漿與#14G9或#2B mAb一起培育來測試#14G9或#2B抗衡75 nM sPLA2-GIB或自HIV-1感染患者分離之血漿對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制作用的能力。

【0163】 如圖13中所描繪，量漸增之#14G9或#2B mAb引起sPLA2-IB (圖13A)或來自病毒血症患者之血漿(圖13B)抑制自一個健康供體分離之人類CD4 T細胞中由IL-7誘導之磷酸STAT5之核易位的能力之劑量相依

復原。sPLA2-IB作用之復原的EC50針對#2B及#14G9 mAb分別為3.7 ng/mL及2.2 ng/mL。HIV感染血漿作用之復原的EC50針對#2B及#14G9 mAb分別為3.3 ng/mL及2.7 ng/mL。

【0164】

8.2- #2B2對於sPLA2-GIB對磷酸STAT5核易位之抑制的活體內作用

藉由首先在小鼠中注射1或2 mg之#2B2 mAb，之後注射100 µg之sPLA2-IB來測試#2B2 mAb活體內抗衡注射sPLA2-IB對CD4 T細胞中IL-7誘導之磷酸STAT5核易位之抑制作用的能力。隨後藉由共焦顯微鏡分析自經處理小鼠之脾細胞分離之CD4 T細胞中的磷酸STAT5之核易位。

如圖14中所描繪，在小鼠中注射100 µg之sPLA2-IB引起對自脾細胞分離之CD4 T細胞中磷酸STAT5之核易位的50%抑制。此作用藉由事先注射1或2 mg之#2B2 mAb而完全消除，其中在對照注射中未觀測到顯著作用。

表1

IMGT人類生殖系	可變區			一致殘基之編號
	融合瘤	人類化		
		型式	型式	
		A	B	
		總體一致性%		
IGHV1-46*01	66.3	80.6	81.6	65 - 79-80 / 98
IGHV5-10-1*04	58.2	80.6	81.6	57 - 79-80 / 98
IGKV1-39*01	67.4	83.2	84.2	64 - 79-80 / 95
IGKV3-15*01	62.1	85.3	86.3	59 - 81-82/ 95

表2

Kabat 命名法	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3		
人類化型式	與人類細胞系不匹配						總計	
VH殘基數目	30	5	14	17	32	0	98	% 一致性
IGHV1-46*01 型式A	0	3	2	9	5	NR	19	80.6% (79//98)
IGHV1-46*01 型式B	0	3	1	9	5	NR	18	81.6% (80//98)
IGHV5-10-1*04 型式A	2	2	2	9	4	NR	19	80.6% (79//98)
IGHV5-10-1*04 型式B	2	2	1	9	4	NR	18	81.6% (80//98)
VL殘基數目	23	16	15	7	32	7	100	% 一致性
IGKV1-39*01 型式A	0	7	1	5	2	1	16	83.2% (79/95)
IGKV1-39*01 型式B	0	7	0	5	2	1	15	84.2% (80/95)
IGKV3-15*01 型式A	0	5	1	2	2	4	14	85.3% (81/95)
IGKV3-15*01 型式B	0	5	0	2	2	4	13	86.3% (82/95)

表3

酶活性之抑制(控制%)				
mAb (ug)	Ab #1A	Ab #1B	Ab #2A	Ab #2B
0.1	64%	60%	55%	42%
0.3	41%	42%	33%	24%
1	19%	22%	20%	13%
3	14%	12%	12%	10%

表4

人類化Ab	前-sPLA2-GIB IC50 (nM)	sPLA2-GIB IC50 (nM)
#1A	1053	1.9
#1B	263	3.3
#2A	216	1.9
#2B	341	2.3

表5

樣本名稱	Conc (mM)	T _{1/2} (°C)	ΔH (cal/M)	T _{onset} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
Ab #1A	0.0034	5.01	1.04E6	65.26	70.65	78.84	-
Ab #1B	0.0137	5.01	1.09E6	64.28	71.19	81.94	-
Ab #2A	0.0078	5.00	1.06E6	64.76	74.15	-	82.70
Ab #2B	0.0074	5.02	1.03E6	64.68	70.59	77.81	83.85

表6

	滯留時間	面積%	所計算MW (kDa)
Ab #1A	6.186	97.55	158
Ab #1B	6.193	97.19	157
Ab #2A	6.181	93.96	159
Ab #2B	6.183	97.52	159

表7

mAb	抗原	k _{on} (10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	t _{1/2} (min)	K _d (pM)
#2B	sPLA2-IB	289 ± 12	22.5 ± 2.0	5.1 ± 0.4	786 ± 63
#2B1	sPLA2-IB	278 ± 1	20.3 ± 0.4	5.7 ± 0.1	729 ± 9
#2B2	sPLA2-IB	302 ± 2	24.7 ± 1.3	4.7 ± 0.2	796 ± 8
#2B	前-sPLA2-IB	17.6 ± 0.4	1417 ± 25	0.080 ± 0.002	784900 ± 31600
#2B1	前-sPLA2-IB	18.1 ± 0.4	1551 ± 51	0.074 ± 0.003	853400 ± 12400
#2B2	前-sPLA2-IB	16.4 ± 1.2	1462 ± 129	0.079 ± 0.007	879500 ± 28300

表8

樣本名稱	濃度 (mM)	T _{1/2} (°C)	ΔH (cal/M)	T _{onset} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
------	---------	-----------------------	------------	-------------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Ab #2B1	0.0060	5.02	0.591E6	64.16	68.66	77.60	83.38
Ab #2B2	0.0074	5.01	0.785E6	56.97	64.53	78.00	84.10

表9

	滯留時間	面積%	所計算MW (kDa)
Ab #2B1	6.128	96.30	170.53
Ab #2B2	6.159	97.18	166.12

表10

樣本 名稱	酸性3	酸性2	酸性1	主峰	鹼性1	鹼性2	鹼性3
Ab #2B	8.76	8.84	8.89	8.96	9.06	9.13	NA
Ab #2B1	8.36	8.50	8.64	8.76	8.88	8.99	9.05
Ab #2B2	8.35	8.49	8.63	8.75	8.87	8.98	9.04

參考文獻

Eskola, J.U., Nevalainen, T.J.及Aho, H.J., 1983a. Purification and Characterization of Human Pancreatic Phospholipase A2. , 29(10), 第1772-1776頁。

Eskola, J.U., Nevalainen, T.J.及Aho, H.J., 1983b. Purificationand Characterization of Human Pancreatic Phospholipase A2. , 29(10), 第1772-1776頁。

Kitagawa, M.等人, 1991. The diagnostic value of serum pancreatic phospholipase A2 (PLA2) in pancreatic diseases. *Gastroenterologia Japonica*, 26(1), 第62-68頁。

Kolko, M. 等人, 2007. Human secretory phospholipase A2, group IB in normal eyes and in eye diseases. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 85(3), 第317-323頁。

Lambeau, G.及Gelb, M.H., 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry*,

77, 第495-520頁。可在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405237>獲得。

Nakano, T.等人, 1994. Plasmin converts pro-form of group I phospholipase A2 into receptor binding, active forms. *Biochemical and biophysical research communications*, 198(1), 第10-15頁。

Nevalainen, T.J.等人, 1985. Immunoreactive phospholipase A2 in serum in acute pancreatitis and pancreatic cancer. *Clin Chem*, 31(7), 第1116-1120頁。可在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2408788>獲得。

Nevalainen, T.J. 及Haapanen, T.J., 1993. Distribution of pancreatic (group I) and synovial-type (group II) phospholipases A2 in human tissues. *Inflammation*, 17(4), 第453-464頁。

Nishijima, J. 等人, 1983. Purification and characterization of human pancreatic phospholipase A2 and development of a radioimmunoassay. *Journal of biochemistry*, 94(1), 第137-147頁。

Ramanadham, S.等人, 1998. Type IB secretory phospholipase A2 is contained in insulin secretory granules of pancreatic islet β -cells and is co-secreted with insulin from glucose-stimulated islets. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1390(3), 第301-312頁。

Rouault, M. 等人, 2007. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry*, 46(6), 第1647-1662頁。

Singer, A.G. 等人, 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII

secreted phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 第48535-48549頁。

Sternby, B., 1984. IMMUNOREACTIVE PANCREATIC COLIPASE, LIPASE AND PHOSPHOLIPASEA₂ IN HUMAN PLASMA AND URINE FROM HEALTHY INDIVIDUALS. , 789, 第164-169頁。

THEZE Jacques, Thierry, R.及BUGAULT Florence, 2015. 專利申請 WO2015097140A1.pdf.

【序列表】

<110> 法商迪亞庫雷特公司
<120> 治療性抗sPLA2-GIB抗體
<130> B27Q1
<160> 14
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 148
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

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

<210> 2
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14G9 VL

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Leu 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 Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asn Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110
Pro Thr Val Ser Ile
115

<210> 3
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14G9 VH

<400> 3

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu
130

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2B L

<400> 4

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Thr Pro Pro
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> 5
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2B H

<400> 5

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Thr Arg Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180										185										190									
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro														
		195					200					205																	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys														
		210				215					220																		
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro														
225					230					235					240														
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser														
				245					250					255															
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp														
			260					265					270																
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn														
		275				280						285																	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val														
		290				295					300																		
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu														
305					310				315					320															
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys														
				325					330					335															
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr														
			340					345					350																
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr														
		355					360					365																	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu														
		370				375					380																		
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu														
385					390					395					400														
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys														
				405					410					415															
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu														
			420					425					430																
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly														
		435					440					445																	

Lys

<210> 6
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2B1 H

<400> 6

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

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

Lys

- <210> 7
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
<223> 2B2 H
<400> 7
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Thr Arg Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Thr Leu Tyr Tyr Glu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245

250

255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260265270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275280285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290295300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305310315320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys

325330335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340345350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355360365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370375380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385390395400

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

405410415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420425430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435440445

Lys

<210> 8

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1469 VL

<400> 8

gacattgtga tgaccagtc tcacaaactc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggccagtc ggaatgtgagt actgctgtag cctggtatca agaaaaacca 120

ggatcaatctc ctaaactact gatitactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctaataat 180
cgcttcacag gcagtagatc tgggacagat tatactctca ccatcagcag tgtgcaggct 240
gaagacctgg cactttatta ctgtcagcaa gattatagca ctctcctac gttegggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat c 351

<210> 9
<211> 392
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 14G9 VH

<400> 9
caggtccaac tgcaacagcc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
tcttgaagg ctcttgcta caccctcacc aactactgga tacactgggt gaagcggagg 120
cctggacaag gccttgaatg gattggtaat atgaccctt ctgatactag aactcactac 180
aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg gctgtagaca aatccctcag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct ttactgtgc aagacagacc 300
ctctactatg aggccttggg ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc 360
aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gg 392

<210> 10
<211> 726
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 2B L

<400> 10
ggggccgcc tgaattttgg actgaggctg attttcctgg tgctgacctt gaaaggcgtc 60
cagtgtgaga tcgtgatgac gcagtcgccg gcgacgctga gcgtgagtcg gggggagcgg 120
gcgacgctga gctgcaaggc gtcgcaggac gtgagcacgg ccgtcgcgtg gtatcaacag 180
aagccggggc aagcgccgcg gctgctgac tactggggca gcacgcggca cacgggcatac 240
ccggcgcgat tctcggggag ccggagcggg acggagtaca cgctgacgat ctctcgcctg 300
caaagcgagg acttcgccgt ctactactgc cagcaggact actcgacgcc gccgacgttc 360
ggggggggta ccaaggctga gatcaaactg acggctgcgg cgcttctgt gtcatcttc 420
cccccatctg atgaacagct gaaatctggc actgcttctg tggctctgt gctgaacaac 480
ttctacccta gagaggccaa agtccagttg aaagtggaca atgctctgca gagtgggaat 540
tcccaggaat ctgtcactga gcaggactct aaggatagca catactccct gtctctact 600
ctgacactga gcaaggctga ttacgagaaa cacaaagtgt acgcctgiga agtcacacat 660
caggggctgt ctagtccgtg gaccaaattc ttcaataggg gagagtgcct atagtaaaag 720

ctttga 726

<210> 11
<211> 1431
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 2B H

<400> 11
gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttcctgg tgctgacctt gaaaggcgtc 60
cagtgtaag tccagctcgt ccagagcggg gcggaagtca agaagccggg ggcgagcgtg 120
aaagtcctgt gcaaggcgag cggatatacg ttcacgaact actggattca ctgggtccgg 180
caagcgccgg ggcaggggct ggagtggatc gggaacatcg acccgtcggg cagcgaggacg 240
cactacaacc agaagttcaa ggaccgggcg acgtgaccg tcgacaagag cagagcacg 300
gcgtacatgg agctgtcgag cctgcggagc gaggacacgg ccgtctacta ctgcgcgagg 360
cagacgctgt actacgaggc gctggactac tgggggcagg ggacgctcgt caggtctctg 420
agcgctagca caaaggggcc tagtgtgttt cctctggctc cctcttccaa atccacttct 480
ggtaggactg ctgctctggg atgcctgggt aaggattact ttctgaacc tgtgactgtc 540
tcatggaact ctggtgctct gacttctggg gtccacactt tccctgctgt gctgcagtct 600
agtggactgt actctctgtc atctgtgggt actgtgccct ctctatctct gggaaccag 660
acctacattt gtaatgtgaa ccacaaacca tccaacacta aagtggaaca aagagtggaa 720
cccaaatcct gtgacaaaac ccacacctgc ccacctgtc ctgcccctga actgctggga 780
ggaccttctg tgtttctgtt ccccccaaa ccaaaggata cctgatgat ctctagaacc 840
cctgaggtga catgtgtgtt ggtggatgtg tctcatgagg accctgaggt caaattcaac 900
tggtacgtgg atggagtggg agtccacaat gccaaaacca agcctagaga ggaacagtac 960
aattcaacct acagagtggt cagtggtctg actgtgtgtc atcaggatig gctgaatggc 1020
aagggaataca agtgtaagt ctcaacaag gccctgcctg ctccaattga gaaaacaatc 1080
tcaaaggcca agggacagcc tagggaacct caggtctaca cctgccacc ttcaagagag 1140
gaaatgacca aaaaccaggt gtccctgaca tgcctggta aaggcttcta cccttctgac 1200
attgctgtgg agtgggagtc aaatggacag cctgagaaca actacaaaac aacccccctt 1260
gtgctggatt ctgatggctc tttctttctg tactccaaac tgactgtgga caagtctaga 1320
tggcagcagg ggaatgtctt ttcttctctt gtcattcatg aggcctctga taaccactac 1380
actcagaaat cctgtctctt gtctcccggt aaatgatagt aaaagctttg a 1431

<210> 12
<211> 1426
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 2B1 H

<400> 12
gcggccgcca tgaatTTTgg actgaggctg attttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
cagtgtcaag tccagctcgt ccagagcggg gcggaagtca agaagccggg ggcgagcgtg 120
aaagtctcgt gcaaggcgag cggatatacg ttacgaact actggattca ctgggtccgg 180
caagcgccgg ggcaggggct ggagtggtac gggaacatcg acccgtcgga cagcgggacg 240
cactacaacc agaagttcaa ggaccgggcg acgctgaccg tcgacaagag cagcagcacg 300
gcgtacatgg agctgtcgag cctgcggagc gaggacacgg ccgtctacta ctgcgcgagg 360
cagacgctgt actacgaggc gctggactac tgggggcagg ggacgctcgt cacggtctcg 420
agcgctagca caaaggggccc tagtgtgtt cctctggctc cctcttccaa atccacttct 480
gggggcactg ctgctctggg atgcctgggtg aaggattact ttctgaacc tgtgactgtc 540
tcattggaact ctgggtctct gacttctggt gtccacactt tccctgctgt gctgcagtct 600
agtggactgt actctctgtc atctgtggtc actgtgccct ctccatctct gggaaccag 660
acctacattt gtaatgtgaa ccacaaacca tccaacacta aagtggacaa aagagtggaa 720
cccaaatcct gtgacaaaac ccacaccigc ccacctgtc cggcgccctga agcgggaagga 780
ggacctctcg tgtttctgtt ccccccaaa ccaaggata ccctgatgat ctgcgaacc 840
ccctgaggta catgtgtggt ggtggatgtg tctcatgagg accccgaagt caaatTTaat 900
tggtatgtcg acggcgctga ggtgcataat gccaaaacca agcctagaga ggaacagtac 960
aatccaacct acagagtcgt cagtgtgtcg actgtgtgc atcaggattg gctgaatggc 1020
aaggaataca agtgtaaagt ctcaacaag gccctgcctg ctccaattga gaaaacaatc 1080
tcaaaggcca agggacagcc tagggaaacc caggctctaca cctgccacc ttcaagagag 1140
gaaatgacca aaaaccaggt gtccctgaca tgccctggta aaggcttcta ccctctgac 1200
attgctgtgg agtgggagtc aaatggacag cctgagaaca actacaaaac aacccccct 1260
gtgctggatt ctgatggctc tttctttctg tactccaaac tgactgtgga caagtctaga 1320
tggcagcagg ggaatgtctt ttcttgctct gtcatgatg aggctctgca taaccactac 1380
actcagaaat cctgtctct gtctccggg aatgataag ctltga 1426

<210> 13
<211> 1503
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 2B2 H

<400> 13
gcggccgcca tgaatTTTgg actgaggctg attttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
cagtgtcaag tccagctcgt ccagagcggg gcggaagtca agaagccggg ggcgagcgtg 120
aaagtctcgt gcaaggcgag cggatatacg ttacgaact actggattca ctgggtccgg 180

caagcgccgg ggcaggggct ggagtggatc gggaacatcg acccgtcgga cagcgggacg 240
cactacaacc agaagttcaa ggaccgggcg acgctgaccg tcgacaagag cagcagcacg 300
gcgtacatgg agctgtcgag cctgcggagc gaggacacgg cctgtacta ctgcgcgcgg 360
cagacgctgt actacgaggc gctggactac tgggggcagg ggacgctcgt cacggtctcg 420
agcgctagca caaagggccc tagtgtgttt cctctggctc cctcttccaa atccacttct 480
ggtggcactg ctgctctggg atgcctgggt aaggattact ttcttgaacc tgtgactgtc 540
tcatggaact ctggtgtctt gacttctggt gtccacactt tccctgcctg gctgcagtct 600
agtggactgt actctctgtc atctgtggte actgtgccct cttcatctct gggaaccag 660
acctacattt gtaatgtgaa ccacaaacca tccaacacta aagtggacaa aagagtggaa 720
cccaaatcct gtgacaaaac ccacacctgc ccacctgtc cggcgcctga agcgggaagga 780
ggaccttctg tgtttctggt ccccccaaa ccaaaggata ccctgatgat ctgcgaacc 840
cctgagggtga catgtgtggt ggtggatgtg tctcatgagg acccgaagt caaatttaat 900
tggtatgtcg acggcgctga ggtgcataat gccaaaacca agcctagaga ggaacagtac 960
aattcaacct acagagtcgt cagtgtgctg actgtgtctc atcaggattg gctgaatggc 1020
aaggaataca agtgtaaagt ctcaaacaag gccctgcctg cttcaattga gaaaacaatc 1080
tcaaaggcca agggacagcc tagggaaccc caggctctaca ccctgccacc ttcaagagag 1140
gaaatgacca aaaaccaggt gtccctgaca tgcctggta aaggcttcta cccttctgac 1200
attgctgtgg agtgggagtc aaatggacag cctgagaaca actacaaaac aacccccct 1260
gtgctggatt ctgatggctc tttctttctg tactccaaac tgactgtgga caagtctaga 1320
tggcagcagg ggaatgtctt ttcttctctt gtcatgcatg aggctctgca taaccactac 1380
actcagaaat ccctgtctct gtctccgggg aaatgataag ctttgatgtc atgcatgagg 1440
ctctgcataa ccactacact cagaaatccc tgtctctgtc tccggggaaa tgataagctt 1500
tga 1503

<210> 14
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Ala Val Trp Gln Phe Arg Lys Met Ile Lys Cys Val Ile Pro Gly Ser
1 5 10 15

Asp Pro Phe Leu Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Leu Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Thr Pro Val Asp Glu Leu Asp Lys Cys Cys Gln Thr His
35 40 45

Asp Asn Cys Tyr Asp Gln Ala Lys Lys Leu Asp Ser Cys Lys Phe Leu

50

55

60

Leu Asp Asn Pro Tyr Thr His Thr Tyr Ser Tyr Ser Cys Ser Gly Ser
65 70 75 80

Ala Ile Thr Cys Ser Ser Lys Asn Lys Glu Cys Glu Ala Phe Ile Cys
85 90 95

Asn Cys Asp Arg Asn Ala Ala Ile Cys Phe Ser Lys Ala Pro Tyr Asn
100 105 110

Lys Ala His Lys Asn Leu Asp Thr Lys Lys Tyr Cys Gln Ser
115 120 125



202000230

【發明摘要】

【中文發明名稱】

治療性抗sPLA2-GIB抗體及其用途

【英文發明名稱】

THERAPEUTIC ANTI-sPLA2-GIB ANTIBODIES AND THE USES
THEREOF

【中文】

本發明係關於結合PLA2-GIB之人類或人類化抗體、其產生及其用途。此等抗體展現尤其針對治療性及診斷性目的之有利特徵。

【英文】

The present invention relates to human or humanized antibodies which bind PLA2-GIB, their production and the uses thereof. These antibodies exhibit advantageous characteristics, in particular for therapeutic and diagnostic purposes.

【指定代表圖】

圖14

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種經分離人類或人類化抗體或其衍生物，其結合人類sPLA2-GIB。

【第2項】

如請求項1之抗體或其衍生物，其為單株抗體。

【第3項】

如請求項1或2之抗體或衍生物，其結合參考SEQ ID NO: 14包含至少一個選自以下之胺基酸殘基的抗原決定基：人類sPLA2-GIB之W3、R6、K7、K10、C77、Y75、G79及S80。

【第4項】

如請求項1或2之抗體或衍生物，其競爭性地抑制單株抗體14G9與人類sPLA2-GIB之該結合，該單株抗體14G9包含：包含SED ID NO: 2之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 3之重鏈可變區。

【第5項】

如請求項1或2之抗體或衍生物，其競爭性地抑制單株抗體#2B與人類sPLA2-GIB之該結合，該單株抗體#2B包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及包含SEQ ID NO: 5或由SEQ ID NO: 5組成之重鏈。

【第6項】

如請求項1之抗體或衍生物，其競爭性地抑制單株抗體#2B1與人類sPLA2-GIB之該結合，該單株抗體#2B1包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及包含SEQ ID NO: 6或由SEQ ID NO: 6組成之

重鏈。

【第7項】

如請求項1之抗體或衍生物，其競爭性地抑制單株抗體#2B2與人類 sPLA2-GIB之該結合，該單株抗體#2B2包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及包含SEQ ID NO: 7或由SEQ ID NO: 7組成之重鏈。

【第8項】

如前述請求項中任一項之抗體或衍生物，其中和sPLA2-GIB。

【第9項】

如請求項1之經分離抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及包含SEQ ID NO: 5或由SEQ ID NO: 5組成之重鏈。

【第10項】

如請求項1之經分離抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及包含SEQ ID NO: 6或由SEQ ID NO: 6組成之重鏈。

【第11項】

如請求項1之經分離抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成之輕鏈及包含SEQ ID NO: 7或由SEQ ID NO: 7組成之重鏈。

【第12項】

如請求項1之經分離抗體，其包含以下CDR區：

CDR-L1：胺基酸殘基QDVSTA，

CDR-L2：胺基酸殘基WAS，

CDR-L3：胺基酸殘基QQDYSTPPT，

CDR-H1：胺基酸殘基GYTFTNYW，

CDR-H2：胺基酸殘基IDPSDTRT，及

CDR-H3：胺基酸殘基ARQTLYYEALDY。

【第13項】

一種編碼前述請求項中任一項之抗體或衍生物或此抗體之輕鏈或重鏈或其可變域的核酸。

【第14項】

如請求項13之核酸，其包含選自SEQ ID NO: 10-13中之任一者或其互補序列的核苷酸序列。

【第15項】

一種載體，其包含如請求項13或14之核酸。

【第16項】

一種重組宿主細胞，其含有如請求項15之載體或如請求項13之核酸。

【第17項】

一種醫藥組合物，其包含：(i)如請求項1至12中任一項之抗體或衍生物，或如請求項15之載體或如請求項13之核酸或如請求項16之重組宿主細胞；及(ii)醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

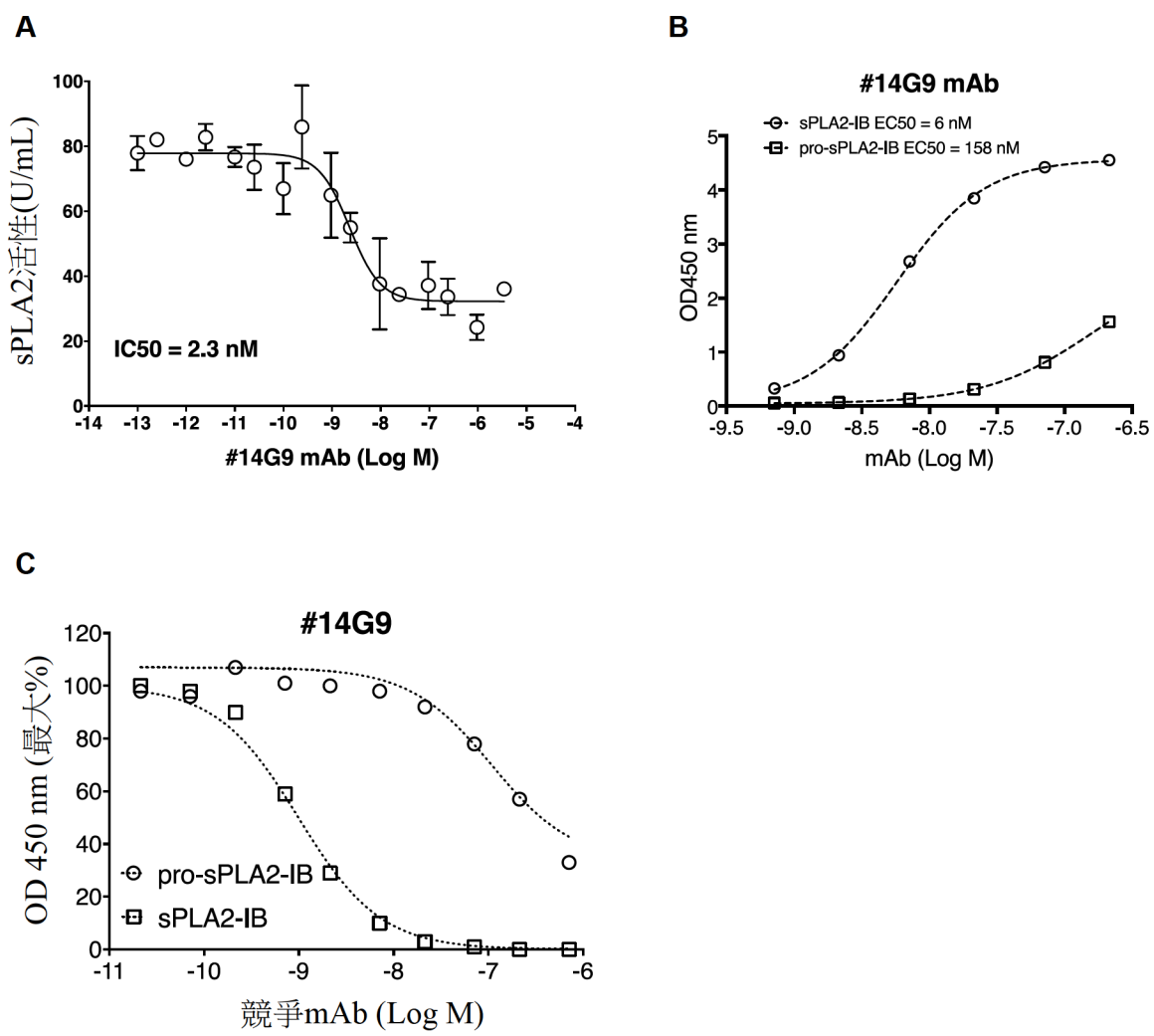
【第18項】

如請求項1至12中任一項之抗體或衍生物，其用於治療有需要之個體之疾病。

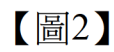
【第19項】

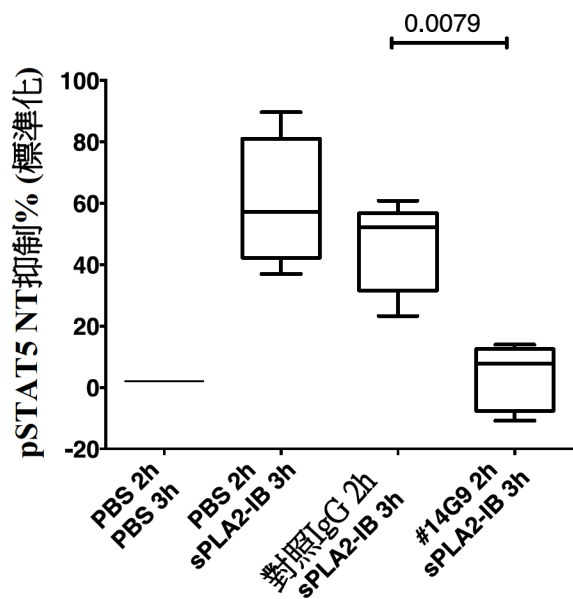
一種產生如請求項1至12中任一項之抗體的方法，其包含在適合於表現該抗體的條件下培養如請求項16之細胞，及視情況回收該抗體。

【發明圖式】

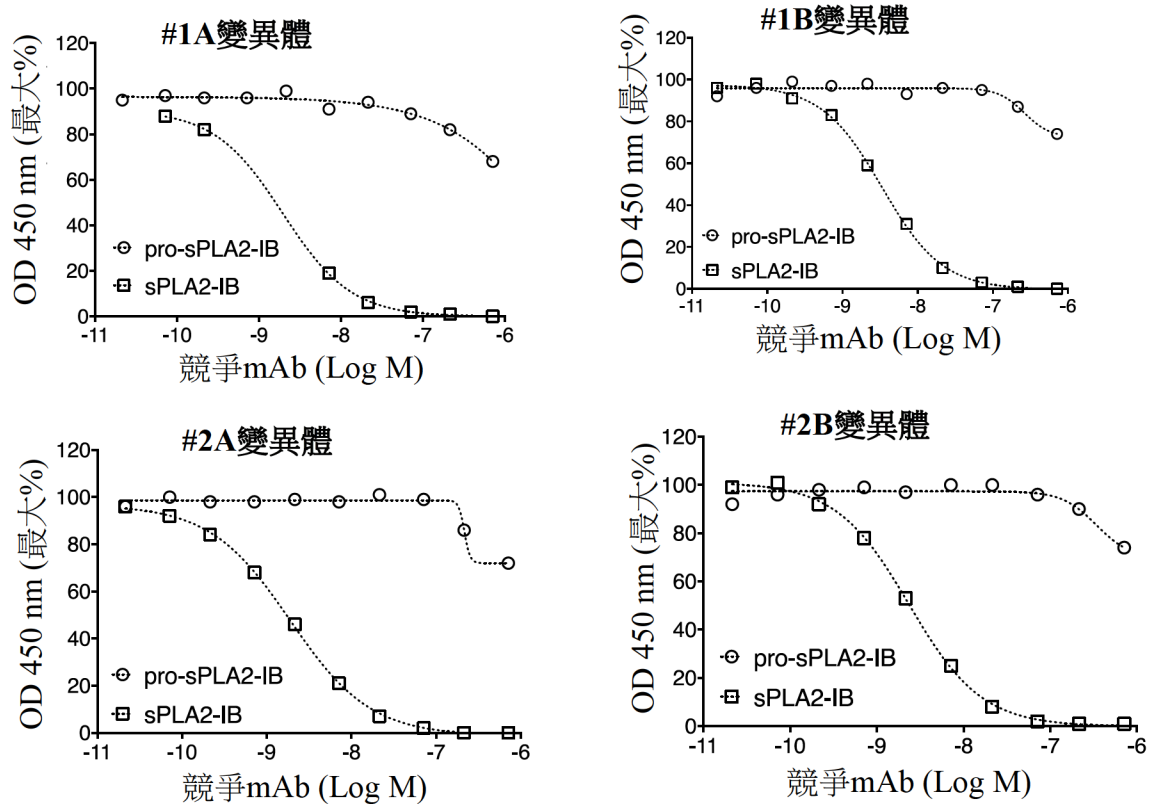


【圖1】

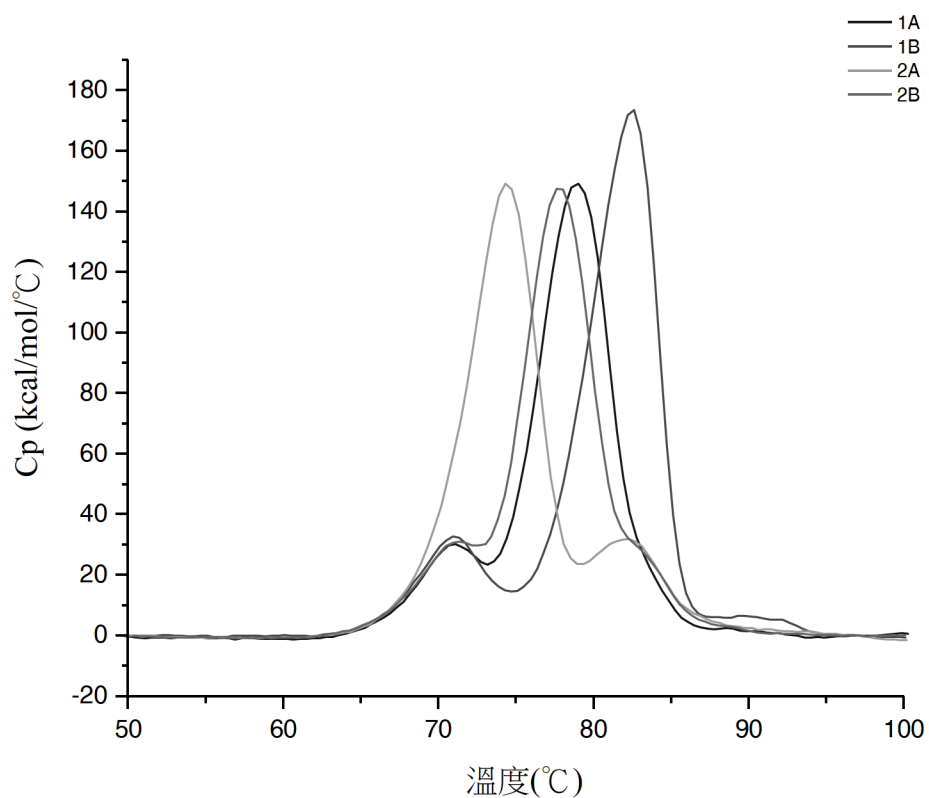




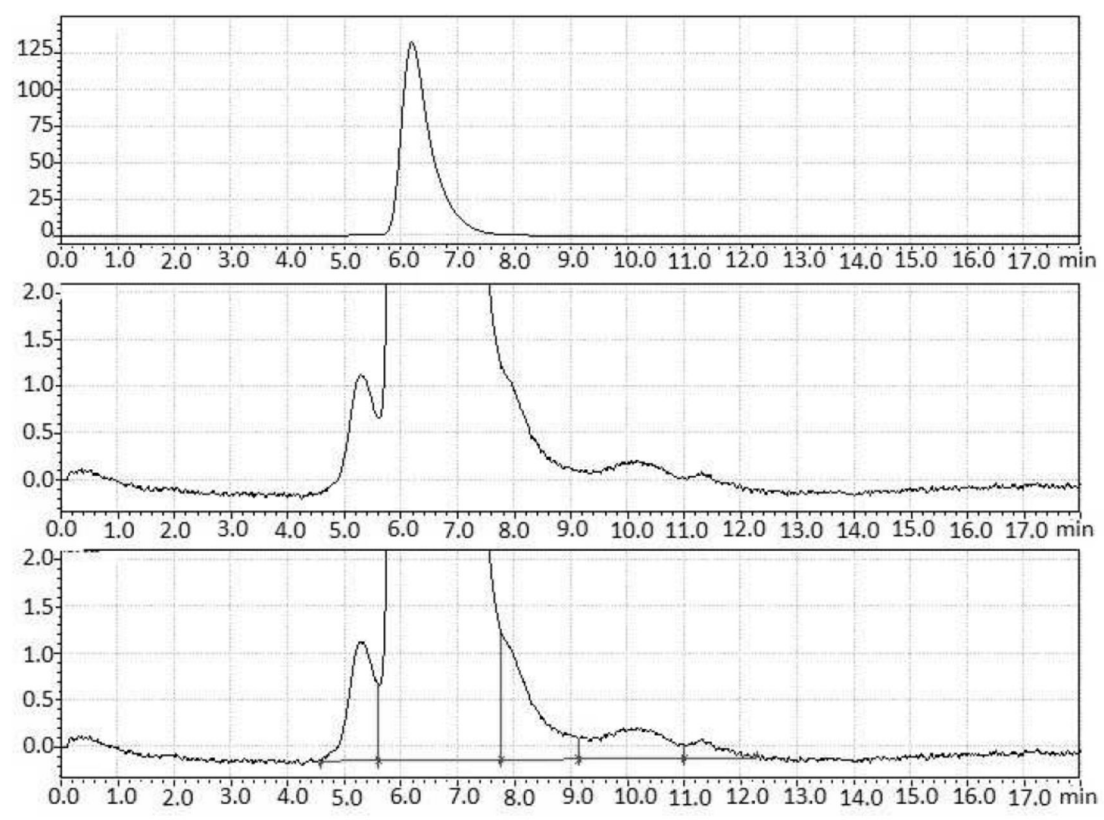
【圖4】



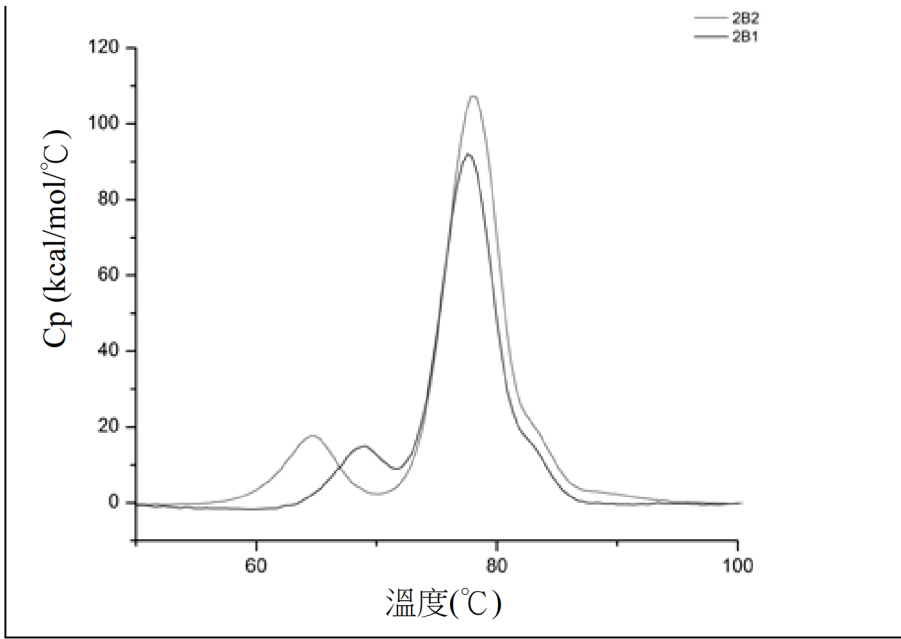
【圖5】



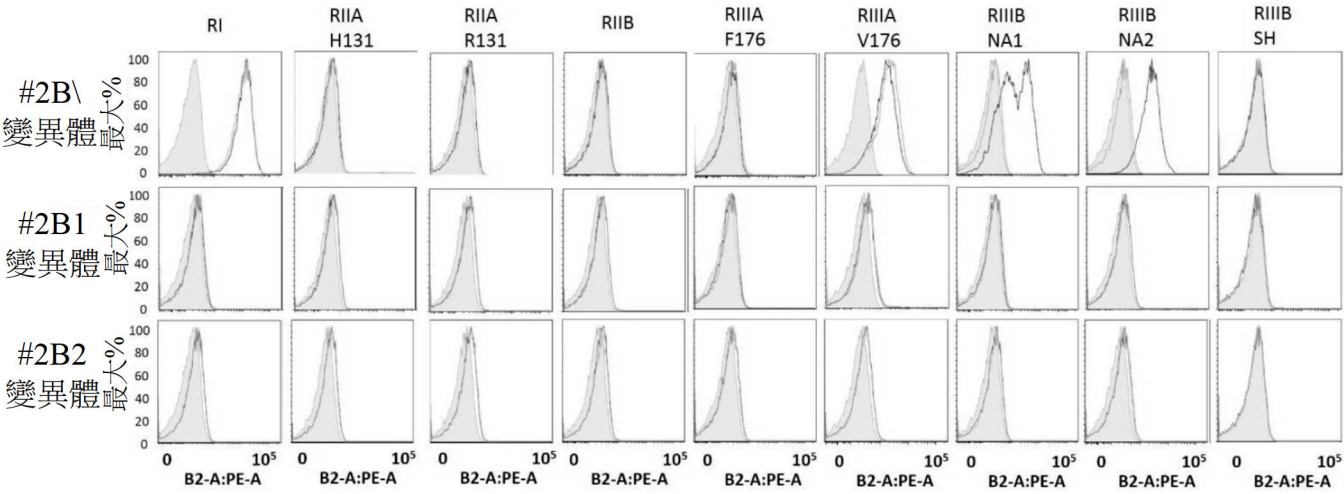
【圖6】



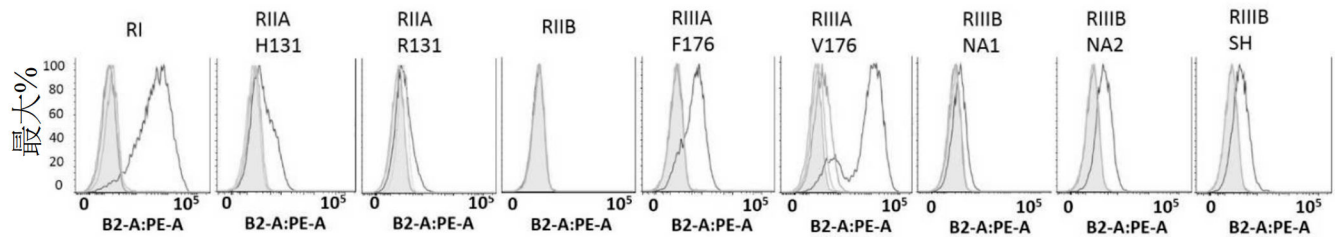
【圖7】



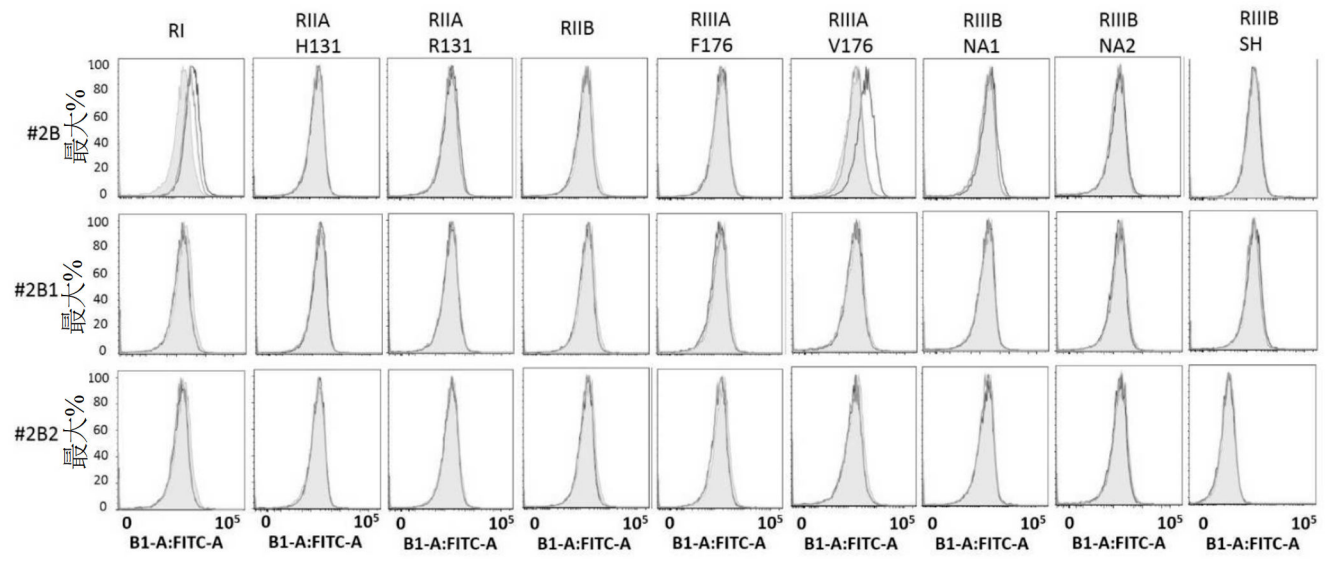
【圖8】



【圖9】

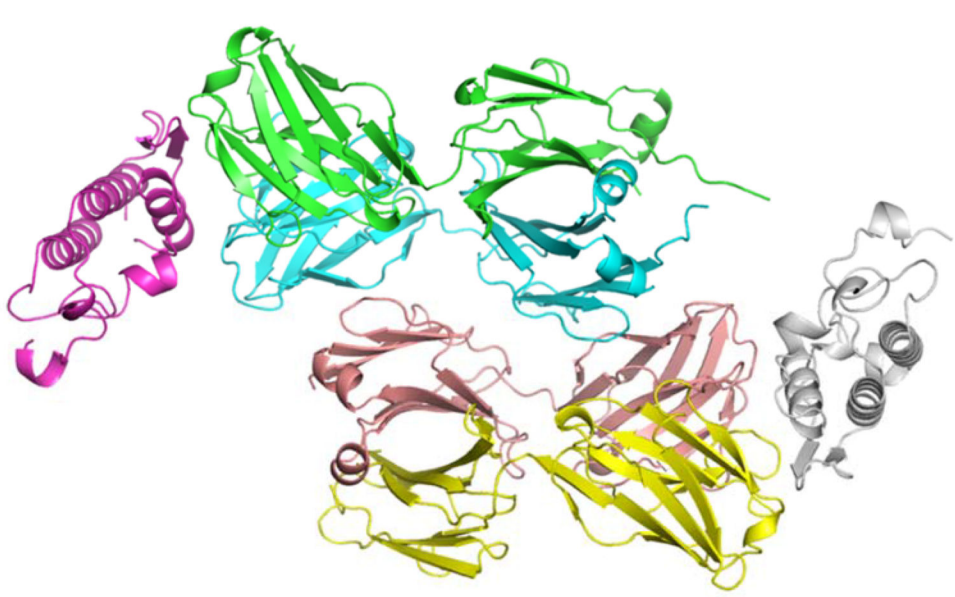


【圖10】

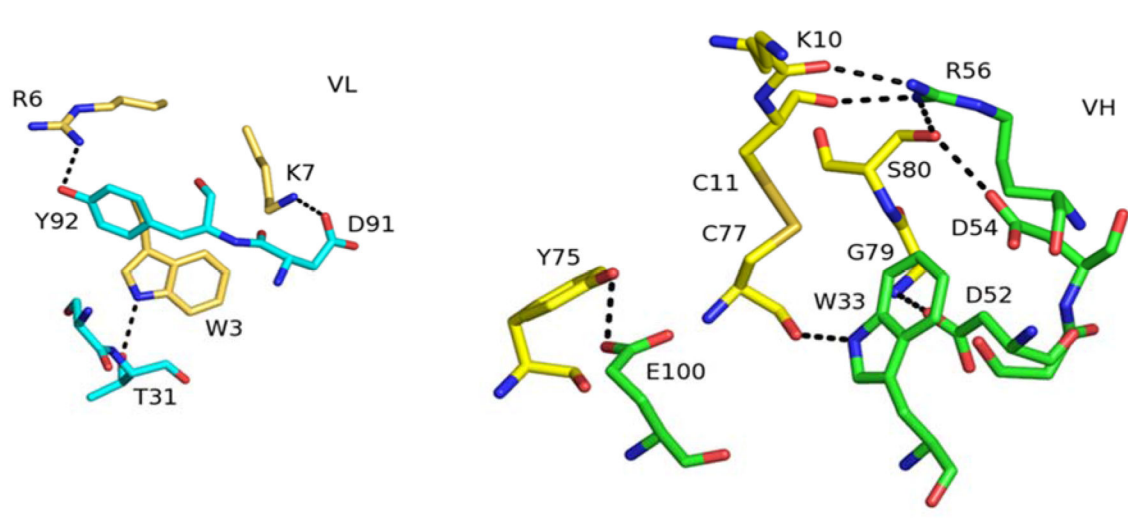


【圖11】

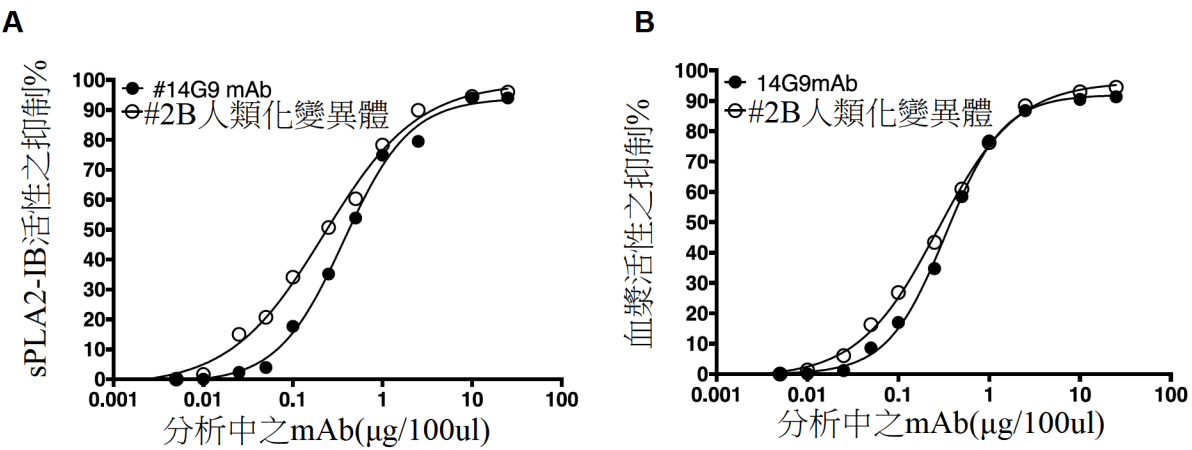
A



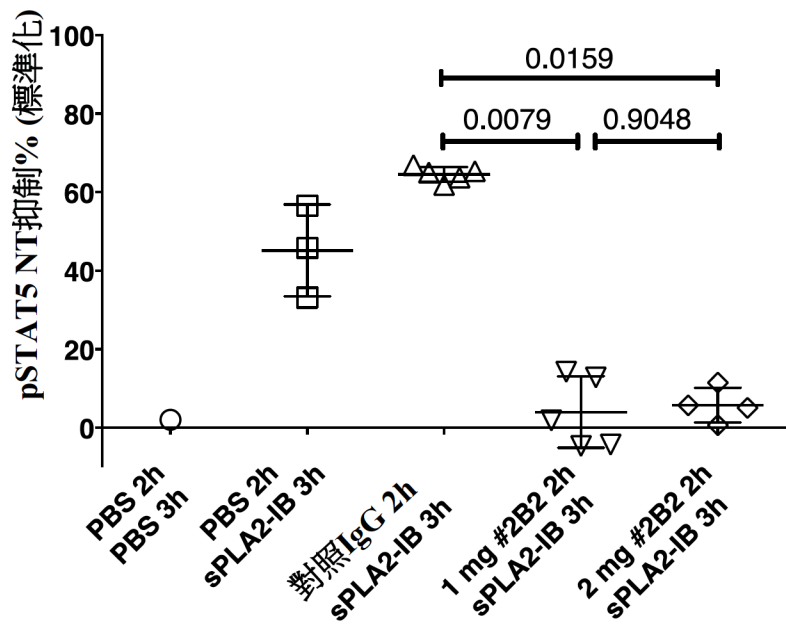
B



【圖12】



【圖13】



【圖14】