



(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 I784945 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：106108832

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 17 日

(51)Int. Cl.：

**C07K16/28 (2006.01)****C07K16/30 (2006.01)****C12N5/07 (2010.01)****C12N15/13 (2006.01)****C12N15/63 (2006.01)****A61K39/395 (2006.01)****A61P1/00 (2006.01)**

(30)優先權：2016/03/17

歐洲專利局

16160907.8

(71)申請人：瑞士商迪洛特醫藥有限公司 (瑞士) TILLOTTS PHARMA AG (CH)

瑞士

(72)發明人：岡德 堤 GUNDE, TEA (CH)；梅爾 賽巴斯汀 MEYER, SEBASTIAN (DE)；費

羅 艾斯特 瑪麗亞 FURRER, ESTHER MARIA (CH)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201138825A1

WO 2015/144852A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：16 共 125 頁

(54)名稱

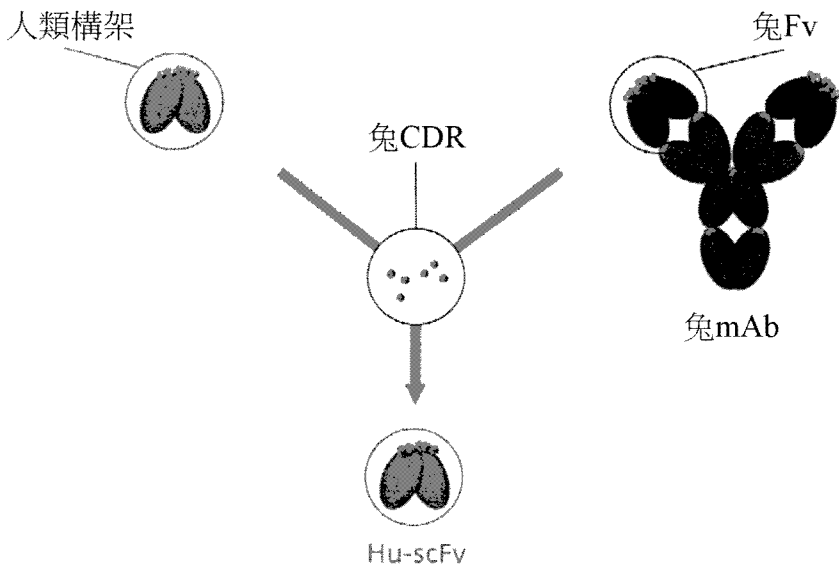
抗 TNF $\alpha$  抗體及其功能性片段

(57)摘要

本發明係關於能夠結合至腫瘤壞死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 的抗體分子及其功能性片段、其等製造方法以及其等治療性用途。

The present invention relates to antibody molecules and functional fragments thereof, capable of binding to tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), to processes for their production, and to their therapeutic uses.

指定代表圖：



【圖1】



公告本

申請日：

IPC分類：

I784945

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗TNF $\alpha$ 抗體及其功能性片段

【英文發明名稱】

ANTI-TNF $\alpha$ -ANTIBODIES AND FUNCTIONAL FRAGMENTS

THEREOF

【中文】

本發明係關於能夠結合至腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )的抗體分子及其功能性片段、其等製造方法以及其等治療性用途。

【英文】

The present invention relates to antibody molecules and functional fragments thereof, capable of binding to tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), to processes for their production, and to their therapeutic uses.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

抗TNF $\alpha$ 抗體及其功能性片段

### 【英文發明名稱】

ANTI-TNF $\alpha$ -ANTIBODIES AND FUNCTIONAL FRAGMENTS

THEREOF

### 【技術領域】

本發明係關於能夠結合至腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )的抗體分子及其功能性片段、其等製造方法以及其等治療性用途。

### 【先前技術】

TNF $\alpha$ 係同源三聚促炎性細胞介素，其係由免疫系統之細胞所釋放且會與該等細胞相互作用。TNF $\alpha$ 亦顯示在多種人類疾病中上調，該等人類疾病包括慢性疾病，諸如類風濕性關節炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎及多發性硬化症。

已提出用針對TNF $\alpha$ 之抗體來預防及治療內毒素休克(Beutler等人, Science, 234, 470-474, 1985)。Bodmer等人(Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993)及Wherry等人(Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993)論述抗TNF $\alpha$ 抗體在治療敗血性休克方面的治療潛能。Kirschenbaum等人(Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998)亦論述抗TNF $\alpha$ 抗體在治療敗血性休克方面的用途。膠原蛋白誘導之關節炎可以使用抗TNF $\alpha$ 單株抗體有效地治療(Williams等人(PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992))。

抗TNF $\alpha$ 抗體在治療類風濕性關節炎及克羅恩氏病方面的用途在

Feldman 等人 (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998) 、 Adorini 等人 (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) 及 Feldman 等人 (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997) 中有所論述。以前在此類治療中所用的針對TNF $\alpha$ 之抗體通常係嵌合抗體，諸如美國專利第5,919,452號中所述之嵌合抗體。

針對TNF $\alpha$ 之單株抗體在先前技術中已有描述。Meager 等人 (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) 描述針對重組性TNF $\alpha$ 之鼠類單株抗體。Fendly 等人 (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) 描述針對重組性TNF $\alpha$ 之鼠類單株抗體界定TNF $\alpha$ 上之中和抗原決定基的用途。另外，在國際專利申請案WO 92/11383中，揭示對TNF $\alpha$ 具有特異性的重組抗體，包括CDR移植抗體。Rankin 等人 (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) 描述此類CDR移植抗體在治療類風濕性關節炎方面的用途。美國專利第5,919,452號揭示抗TNF $\alpha$ 嵌合抗體及其在治療與TNF $\alpha$ 之存在有關的病變方面的用途。在Stephens 等人 (Immunology, 85, 668-674, 1995) 、 GB-A-2 246 570 、 GB-A-2 297 145 、 US 8,673,310 、 US 2014/0193400 、 EP 2 390 267 B1 、 US 8,293,235 、 US 8,697,074 、 WO 2009/155723 A2 及 WO 2006/131013 A2 中揭示有其他抗TNF $\alpha$ 抗體。

先前技術重組性抗TNF $\alpha$ 抗體分子對於TNF $\alpha$ 之親和力相較於獲得高變區或CDR之抗體而言通常降低。所有目前出售的TNF $\alpha$ 抑制劑係以每週一次或更長的時間間隔作為快速注射靜脈內或皮下投與，產生高起始濃度，濃度穩定地減小，直至下一次注射。

目前獲得批准的抗TNF $\alpha$ 生物治療劑包括(i) 英利昔單抗 (infliximab)，一種嵌合型IgG抗人類單株抗體(Remicade®；Wiekowski

M 等人：「 Infiximab (Remicade) 」， Handbook of Therapeutic Antibodies, WILEY-VCH； Weinheim, 2007-01-01, 第885-904頁)； (ii) 依那西普(etanercept)，一種 TNFR2 二聚融合蛋白，含有 IgG1 Fc (Enbrel®)； (iii)阿達木單抗(adalimumab)，一種完全人類單株抗體(mAb) (Humira®； Kupper H等人：「 Adalimumab (Humira) 」， Handbook of Therapeutic Antibodies, WILEY-VCH； Weinheim, 2007-01-01, 第697-732頁)； (iv)賽妥珠單抗(certolizumab)，一種聚乙二醇化Fab片段 (Cimzia®； Melmed G Y 等人：「 Certolizumab pegol 」， Nature Reviews. Drug Discovery, Nature Publishing Group, GB, 第7卷, 第8期, 2008-08-01, 第641-642頁)； (v)戈利木單抗(Golimumab)，一種人類 IgG1K單株抗體(Simponi®； Mazumdar S等人：「 Golimumab 」， mAbs, Landes Bioscience, US, 第1卷, 第5期, 2009-09-01, 第422-431頁)。然而，仍在研發各種生物仿製藥(biosimilars)，且稱為Remsima之英利昔單抗模擬物已在歐洲獲得批准。

英利昔單抗對TNF $\alpha$ 之親和力相對較低( $K_D > 0.2$  nM； Weir等人, 2006, Therapy 3: 535)，且在L929分析中的中和效能有限。另外，英利昔單抗顯示基本上不具有與來自食蟹猴或恆河猴之TNF $\alpha$ 的交叉反應性。然而，就抗TNF $\alpha$ 抗體而言，非常期望存在與來自猴之TNF $\alpha$ 的交叉反應性，因為這允許用靈長類動物進行動物測試，反映人類在許多態樣中的情況。

依那西普雖然係二價分子，但以每一個依那西普分子一個三聚體之比率結合TNF $\alpha$ ，避免了大型抗原-生物治療劑複合物之形成(Wallis, 2008, Lancet Infect Dis, 8: 601)。其不抑制單核球中LPS誘導之細胞介素分泌(Kirchner等人, 2004, Cytokine, 28: 67)。

阿達木單抗之效能類似於英利昔單抗之效能。阿達木單抗之另一缺點係其不良穩定性，例如在熱去摺疊測試中所測定。阿達木單抗在此類測試中之熔融溫度( $T_m$ )經過測定係 $67.5^{\circ}\text{C}$ 。然而，抗體之 $T_m$ 值愈低，其整體穩定性愈低。較低的 $T_m$ 使得抗體不太適合於藥物使用，例如口服。

賽妥珠單抗(certolizumab)之效能略大於英利昔單抗之效能，但是仍然不能令人滿意。賽妥珠單抗不抑制MLR中之T細胞增殖(Vos等人, 2011, *Gastroenterology*, 140: 221)。

EP2623515 A1揭示人類化抗TNF $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段(Fab)。從所揭示之實例清楚瞭解到，在L929中和分析中，所得人類化Fab片段之效能與英利昔單抗之效能相當(參見表2及表5)。關於交叉反應性所測試的單獨的抗TNF $\alpha$  IgG抗體僅微弱地結合至恆河猴TNF- $\alpha$  (參見[0069]；圖3)。未測試與食蟹猴TNF $\alpha$ 之交叉反應性。此外，與人類TNF $\beta$ 存在弱結合(參見圖3)。因此，EP2623515 A1未揭示這樣的抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段：其所具有的抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能大於英利昔單抗之效能且其可與恆河猴TNF $\alpha$ 及食蟹猴TNF $\alpha$ 交叉反應。

WO 2012/007880 A2揭示一種呈融合蛋白形式的經修飾之單域抗原結合分子(SDAB)，其包含結合至一或多個目標(例如，TNF $\alpha$ )的一或多個單一抗原結合域、連接子及一或多個聚合物分子。所給出的唯一具體實例係稱為SDAB-01且包括兩個抗原結合域，其結合至TNF $\alpha$ ，經彈性連接子連接，且C端半胱胺酸支持位點特異性聚乙二醇化(參見圖3)。WO 2012/007880 A2未比較在基於L929細胞之中和分析中SDAB-01之效能與已知TNF $\alpha$ 抗體(如英利昔單抗)之效能，或未評定其它SDAB-01特異性參數，如阻斷TNF $\alpha$ -TNFRI/II相互作用之有效性及對TNF $\alpha$ 之結合優於對

TNF $\beta$ 的選擇性。在一個分析中，其中在過度表現人類TNF $\alpha$ 之多發性關節炎轉殖基因小鼠模型中比較SDAB-01處理與英利昔單抗處理(參見第54頁，實例8)，這兩者在預防關節炎之進一步發展方面似乎同樣有效(例如，圖17及圖18)。然而，此實例中給出的劑量易引起誤解，因為SDAB-01之分子量小於英利昔單抗之分子量的一半。因此，WO 2012/007880 A2未揭示抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能大於英利昔單抗之效能的抗TNF $\alpha$ 抗體。

WO 2015/144852 A1研究命名為「scFv1」之抗TNF- $\alpha$  scFv的特性。此scFv在PK-15細胞分析中顯示出TNF $\alpha$ 中和能力，該能力與英利昔單抗之能力相當(參見[0236])。另外，scFv似乎與來自恆河猴及食蟹猴之TNF- $\alpha$ 具有一定程度的交叉反應性(參見實例8)。WO 2015/144852 A1中未報導親和力資料。然而，已知僅具有中等親和力( $K_D=157$  pM；參見Urech等人 2010 Ann Rheum Dis 69: 443)的單鏈抗體片段DLX105 (亦稱為ESBA 105)所顯示的對TNF- $\alpha$ 之結合優於scFv1 (參見WO 2015/144852 A1之圖1)。因此，WO 2015/144852 A1未揭示對人類TNF $\alpha$ 具有高親和力( $K_D < 125$  pM)的抗TNF- $\alpha$ 抗體。

WO 2015/065987 A1描述抗TNF- $\alpha$ 抗體、抗IL-6抗體及結合至兩種抗原的雙特異性抗體。某些抗TNF $\alpha$ 抗體與來自食蟹猴之TNF $\alpha$ 顯示出一些交叉反應性(圖17)。然而，在L929中和分析中，抗TNF- $\alpha$ 抗體所展現的效能顯著低於英利昔單抗([0152]；圖5)。因此，WO 2015/065987 A1未揭示抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能大於英利昔單抗之效能的抗TNF- $\alpha$ 抗體。

Drugs in R&D, 第4卷 第3期, 2003, 第174-178頁描述人類化抗體

「Humicade」(CDP 571 ; BAY 103356)，一種具有高親和力的單株抗TNF $\alpha$ 抗體。然而，Humicade抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能似乎有限(參見例如US 2003/0199679 A1之[0189])。因此，該參考文獻未揭示抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能大於英利昔單抗之效能的抗TNF $\alpha$ 抗體。

Saldanha J W等人：「Molecular Engineering I: Humanization」, Handbook of Therapeutic Antibodies, 第6章, 2007-01-01, WILEY-VCH, Weinheim, 第119-144頁揭示使單株抗體人類化之不同策略，包括CDR移植、表面重塑(Resurfacing)/鑲飾(Veneering)、SDR轉移及去免疫技術。

需要經過改良的抗體分子來治療慢性發炎疾病，諸如發炎性腸病。抗體分子應該至少具有(i)對人類TNF $\alpha$ 之高親和力(亦即 $K_D < 125$  pM)；(ii)抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的高效能；(iii)抑制LPS誘導之細胞介素分泌的高效能；(iv)針對來自食蟹猴及恆河猴之TNF $\alpha$ 的高親和力(例如， $K_D < 1$  nM)；及(v)可變域之高熔融溫度，如在熱去摺疊實驗中所測定(例如， $T_m > 70^\circ\text{C}$ )。

#### 【發明內容】

本申請案之發明人發現，某些抗TNF $\alpha$ 抗體及其功能性片段展現有利特性之組合，包括對人類TNF $\alpha$ 之高親和力( $K_D < 125$  pM)、大於英利昔單抗之效能的抑制L929細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能、大於阿達木單抗之效能的抑制LPS誘導之細胞介素分泌的效能、及針對來自諸如食蟹猴(食蟹獼猴(*Macaca fascicularis*))及/或恆河猴(恆河獼猴(*Macaca mulatta*))之動物的TNF $\alpha$ 的高親和力( $K_D < 1$  nM)。另外，抗體及其功能性片段對TNF $\alpha$ 具有特異性係在於其不顯著結合至TNF $\beta$ ，且展現顯著的穩定

性，如在可變域之熱去摺疊分析中所測定。

本發明提供抗體分子及其功能性片段。

因此，本發明係關於在以下項目(1)至(48)中所限定的標的：

(1) 一種能夠結合至人類腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )的抗體或其功能性片段，其中該抗體或其功能性片段包含(i) V<sub>L</sub>域，其包含具有根據如SEQ ID NO: 1中所示胺基酸序列者的CDR1區、具有根據如SEQ ID NO: 2中所示胺基酸序列者的CDR2區及具有根據如SEQ ID NO: 3中所示胺基酸序列者的CDR3區；及(ii) V<sub>H</sub>域，其包含具有根據如SEQ ID NO: 4中所示胺基酸序列者的CDR1區、具有根據如SEQ ID NO: 5中所示胺基酸序列者的CDR2區及具有根據如SEQ ID NO: 6中所示胺基酸序列者的CDR3區。

(2) 如項目(1)之抗體或功能性片段，其中該抗體或功能性片段包含(i) V<sub>L</sub>域，其包含具有如SEQ ID NO: 7中所示胺基酸序列的CDR1區、具有如SEQ ID NO: 8中所示胺基酸序列的CDR2區及具有如SEQ ID NO: 9中所示胺基酸序列的CDR3區；及(ii) V<sub>H</sub>域，其包含具有如SEQ ID NO: 10中所示胺基酸序列的CDR1區、具有如SEQ ID NO: 11中所示胺基酸序列的CDR2區及具有如SEQ ID NO: 12中所示胺基酸序列的CDR3區。

(3) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該抗體或功能性片段包含具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列的V<sub>H</sub>域。

(4) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該抗體或功能性片段包含具有選自SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 54之胺基酸序列，較佳具有如SEQ ID NO: 14中所示胺基酸序列的V<sub>L</sub>域。

(5) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該抗體或其功能性片段特異性結合至人類TNF $\alpha$ 。

(6) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該抗體或其功能性片段不顯著結合至TNF $\beta$ 。

(7) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該抗體或功能性片段

(i) 以小於125 pM之解離常數( $K_D$ )結合至人類TNF $\alpha$ ；

(ii) 與恆河獼猴TNF $\alpha$ 及與食蟹獼猴TNF $\alpha$ 交叉反應；

(iii) 如藉由L929分析所測定，所具有的效能大於英利昔單抗；及/或

(iv) 能夠以至少2的化學計量(抗體:TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>)結合至人類TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>。

(8) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其係以小於100 pM、較佳小於50 pM之 $K_D$ 結合至人類TNF $\alpha$ 。

(9) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其係以小於1 nM之 $K_D$ 結合至來自恆河獼猴之TNF $\alpha$ 。

(10) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其係以小於1 nM之 $K_D$ 結合至來自食蟹獼猴之TNF $\alpha$ 。

(11) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中抗體或功能性片段抑制TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能相對於英利昔單抗之效能(相對效能)在L929分析中經過測定係大於5，且其中該相對效能係L929分析中以英利昔單抗之ng/mL計的IC<sub>50</sub>值與L929分析中以呈scFv形式之抗體之ng/mL計的IC<sub>50</sub>值的比率。

(12) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中呈scFv形式之抗體之可變域的熔融溫度藉由差示掃描螢光測定法測定係至少65°C。

(13) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中呈scFv形式之抗體之可變域的熔融溫度藉由差示掃描螢光測定法測定係至少68°C。

(14) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該熔融溫度藉由差示掃描螢光測定法測定係至少70°C。

(15) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中在五個連續凍融循環之後，單體含量損失係小於0.2%。

(16) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中在4°C下儲存四週之後，單體含量損失係小於1%。

(17) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中抗體或功能性片段阻斷人類TNF $\alpha$ 與TNF受體I (TNFRI)之間的相互作用的效能相對於英利昔單抗之效能(相對效能)如在抑制ELISA中測定係至少2，其中該相對效能係以英利昔單抗之ng/mL計的IC<sub>50</sub>值與以呈scFv形式之抗體之ng/mL計的IC<sub>50</sub>值的比率。

(18) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中抗體或功能性片段阻斷人類TNF $\alpha$ 與TNF受體II (TNFRII)之間的相互作用的效能相對於英利昔單抗之效能(相對效能)如在抑制ELISA中測定係至少2，其中該相對效能係以英利昔單抗之ng/mL計的IC<sub>50</sub>值與以呈scFv形式之抗體之ng/mL計的IC<sub>50</sub>值的比率。

(19) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其能夠抑制混合淋巴細胞反應中外周血液單核細胞之細胞增殖。

(20) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其能夠抑制LPS誘導CD14<sup>+</sup>單核球分泌介白素-1 $\beta$ 。

(21) 如項目(20)之抗體或功能性片段，其中抑制LPS誘導介白素-1 $\beta$ 分泌之IC<sub>50</sub>值係小於1 nM。

(22) 如項目(21)之抗體或功能性片段，其中以莫耳濃度計，抑制LPS

誘導介白素-1 $\beta$ 分泌之該IC<sub>50</sub>值係低於阿達木單抗之IC<sub>50</sub>值。

(23) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其能夠抑制LPS誘導CD14<sup>+</sup>單核球分泌TNF $\alpha$ 。

(24) 如項目(23)之抗體或功能性片段，其中抑制LPS誘導TNF $\alpha$ 分泌之IC<sub>50</sub>值係小於1 nM。

(25) 如項目(24)之抗體或功能性片段，其中以莫耳濃度計，抑制LPS誘導TNF $\alpha$ 分泌之該IC<sub>50</sub>值係低於阿達木單抗之IC<sub>50</sub>值。

(26) 如前述項目中任一項之抗體，其係免疫球蛋白G (IgG)。

(27) 如項目(1)至(25)中任一項之功能性片段，其係單鏈可變片段(scFv)。

(28) 如項目(27)之功能性片段，其中該scFv包含以下或由以下組成：選自SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 55之胺基酸序列，較佳如SEQ ID NO: 15中所示胺基酸序列。

(29) 如項目(1)至(25)中任一項之功能性片段，其係雙功能抗體。

(30) 如項目(29)之功能性片段，其該雙功能抗體包含以下或由以下組成：如SEQ ID NO: 51中所示胺基酸序列。

(31) 一種抗體或其功能性片段，其與包含具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有如SEQ ID NO: 14中所示胺基酸序列的V<sub>L</sub>域的抗體結合至人類TNF $\alpha$ 上基本上相同的抗原決定基，尤其是其中該抗體或功能性片段展現上文項目1至30中所提及之特徵中之一或多者。

(32) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中以下各者之總和係小於7，較佳小於4：(i)該抗體或功能性片段之可變輕鏈域之構架區I至III中與SEQ ID NO: 56至58之各別人類V $\kappa$ 1共同序列(參見表15)不同的

胺基酸的數目，及(ii)該抗體或功能性片段之可變輕鏈域之構架區IV中與選自SEQ ID NO: 59至62之最相似的基於人類 $\lambda$ 生殖系的序列(參見表16)不同的胺基酸的數目。

(33) 如前述項目中任一項之抗體或功能性片段，其中該抗體或功能性片段之可變輕鏈域之構架區I至III分別係由SEQ ID NO: 56至58之人類V $\kappa$ 1共同序列組成，且構架區IV係由選自SEQ ID NO: 59至62之基於 $\lambda$ 生殖系的序列組成。

(34) 一種核酸，其編碼如前述項目中任一項之抗體或功能性片段。

(35) 一種載體或質體，其包含如項目(34)之核酸。

(36) 一種細胞，其包含如項目(35)之核酸或如項目(34)之載體或質體。

(37) 一種製備如項目(1)至(33)中任一項之抗體或功能性片段的方法，其包含在培養基中在允許編碼該抗體或功能性片段之核酸表現的條件下培養如項目(36)之細胞，及自該等細胞或自該培養基回收該抗體或功能性片段。

(38) 一種醫藥組合物，其包含如項目(1)至(33)中任一項之抗體或功能性片段，及視情況選用之醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑。

(39) 如項目(1)至(33)中任一項之抗體或功能性片段，其係用於治療發炎病症或TNF $\alpha$ 相關病症的方法中。

(40) 如項目(39)之抗體或功能性片段，其中該發炎病症係選自在下文「待治療之病症」部分中所列的疾病及病症的清單。

(41) 如項目(39)之抗體或功能性片段，其中該發炎病症係胃腸道之發炎病症。

(42) 如項目(41)之抗體或功能性片段，其中該胃腸道之發炎病症係發炎性腸病。

(43) 如項目(41)或(42)之抗體或功能性片段，其中該胃腸道之發炎病症係克羅恩氏病。

(44) 如項目(43)之抗體或功能性片段，其中該克羅恩氏病係選自由以下組成之群：迴腸的、結腸的、迴腸結腸的及/或隔離的上部的克羅恩氏病(胃的、十二指腸的及/或空腸的)且包括非狹窄型/非穿透型、狹窄型、穿透型及肛周的疾病行為，允許以上所提及者中之任一者的定位及疾病行為的任何組合。

(45) 如項目(41)或(42)之抗體或功能性片段，其中該胃腸道之發炎病症係潰瘍性結腸炎。

(46) 如項目(45)之抗體或功能性片段，其中該潰瘍性結腸炎係選自由以下組成之群：潰瘍性直腸炎、直腸乙狀結腸炎(proctosigmoiditis)、左側結腸炎、全潰瘍性結腸炎及貯存袋炎(pouchitis)。

(47) 如項目(41)或(42)之抗體或功能性片段，其中該胃腸道之發炎病症係顯微性結腸炎(microscopic colitis)。

(48) 如項目(39)至(47)中任一項之抗體或功能性片段，其中該方法包含向個體經口投與該抗體或功能性片段。

#### 【圖式簡單說明】

圖1：人類化製程之示意性圖示。

圖2：scFv之經純化之人類化scFv製劑的SE-HPLC層析圖。scFv單體在介於8.5分鐘與9.5分鐘之間的滯留時間溶離，而緩衝劑組分在> 10 min時溶離。將自管柱怠體積至各別scFv單體之所有峰按聚集體/寡聚物進

行整合且用於計算相對峰面積。

圖3：來自兩個scFv構築體之DSF量測的熱去摺疊曲線。各構築體顯示雙重複量測。所得T<sub>m</sub>值係藉由用波茲曼方程式(Boltzmann equation)擬合資料以獲得轉變中點而確定。

圖4：在儲存期間，兩個scFv構築體之單體含量的時程。已針對儲存溫度4°C、-20°C及<-65°C、為期4週的持續時間繪製了如藉由SE-HPLC所測定之單體含量。

圖5：兩個scFv分子之SE-HPLC層析圖的重疊圖。針對各scFv，顯示在d0及在4°C下儲存4週之後的樣品(10 mg/ml)。另外顯示樣品在5個凍融循環之後的層析圖。插圖顯示就各分子而言y軸放大約15倍，從而亦能觀察寡聚物含量的極小改變。

圖6：在儲存期間，人類化scFv之單體含量的時程。已針對10 mg/mL樣品、在37°C之儲存溫度下、為期4週的持續時間繪製了如藉由SE-HPLC所測定之單體含量。

圖7：在兩個scFv之L929分析中，中和人類TNF $\alpha$ 之效能。顯示了各實驗中scFv及參考抗體英利昔單抗之劑量反應曲線。將最高scFv及英利昔單抗濃度以及陰性對照設定為100%及0%生長。

圖8：在L929分析中，兩個scFv中和非人類靈長類動物及人類TNF $\alpha$ 的效能。顯示關於人類、食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之中和的劑量反應曲線。將最高scFv濃度及陰性對照設定為100%及0%生長。

圖9：兩個scFv阻斷TNF $\alpha$ -TNFRI相互作用的效能。顯示劑量反應曲線。將最高scFv濃度及陰性對照設定為0%及100%的TNF $\alpha$ 與TNFRI之結合。

圖10：兩個scFv阻斷TNF $\alpha$ -TNFR $\text{II}$ 相互作用的效能。顯示劑量反應曲線。將最高scFv濃度及陰性對照設定為0%及100%的TNF $\alpha$ 與TNFR $\text{II}$ 之結合。

圖11：scFv之目標特異性。藉由競爭ELISA分析TNF $\alpha$ 及TNF $\beta$ 抑制經生物素標記之TNF $\alpha$ 與scFv之相互作用的潛能。顯示TNF $\alpha$ 及TNF $\beta$ 之劑量依賴性作用。

圖12描繪藉由SE-HPLC確定的16-22-H5-scFv:TNF $\alpha$ 複合物之形成(實例4)。

圖13描繪藉由SPR測定的兩個TNF $\alpha$ 分子與16-22-H5-scDb之同時結合(實例5)。

圖14A描繪16-22-H5-IgG:TNF $\alpha$ 複合物之形成(實例5)。

圖14B描繪16-22-H5-scDb:TNF $\alpha$ 複合物之形成(實例5)。

圖15描繪在抗TNF $\alpha$ 處理之後MLR中之細胞增殖之抑制。相較於IgG對照，\*：p < 0.05；\*\*：p < 0.01 (實例6)。

圖16描繪16-22-H5之不同抗體形式及阿達木單抗以劑量依賴性方式抑制LPS誘導單核球分泌IL-1 $\beta$  (圖16A)及TNF $\alpha$  (圖16B)的能力(實例7)。

#### 【實施方式】

本發明係關於一種能夠結合至人類TNF $\alpha$ 之抗體或其功能性片段。

在本申請案之上下文中，術語「抗體」係用作「免疫球蛋白」(Ig)之同義詞，其被定義為屬於類別IgG、IgM、IgE、IgA或IgD (或其任何子類別)之蛋白質，且包括所有習知地已知的抗體及其功能性片段。在本發明之上下文中，抗體/免疫球蛋白之「功能性片段」被定義為親本抗體之抗原結合片段或基本上維持此類親本抗體之在上文項目(1)至(30)中所提及之

特性中之一或多者的其他衍生物。抗體/免疫球蛋白之「抗原結合片段」被定義為保留抗原結合區之片段(例如，IgG之可變區)。抗體之「抗原結合區」通常存在於抗體之一或多個高變區中，亦即，CDR-1、CDR-2及/或CDR-3區。本發明之「抗原結合片段」包括F(ab')<sub>2</sub>片段及Fab片段之結構域。本發明之「功能性片段」包括scFv、dsFv、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及Fc融合蛋白。F(ab')<sub>2</sub>或Fab可經工程改造以最小化或完全移除CH1域與CL域之間發生的分子間二硫化物相互作用。本發明之抗體或功能性片段可以係雙功能或多功能構築體之一部分。

本發明中之較佳功能性片段係scFv及雙功能抗體。

scFv係單鏈Fv片段，其中可變輕鏈(「V<sub>L</sub>」)域及可變重鏈(「V<sub>H</sub>」)域經由肽橋連接。

雙功能抗體係由兩個片段組成之二聚體，這兩個片段各自具有經由連接子或其類似者連接在一起的可變區(在下文中稱為形成雙功能抗體之片段)，且通常含有兩個V<sub>L</sub>及兩個V<sub>H</sub>。形成雙功能抗體之片段包括由V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>及V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>及V<sub>H</sub>等，較佳V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>組成的片段。在形成雙功能抗體之片段中，連接子連接的可變區不受特別限制，但是較佳足夠短以避免在同一片段中之可變區之間的非共價鍵。此類連接子之長度可以適當地由熟習此項技術者確定，但是通常係2至14個胺基酸，較佳3至9個胺基酸，尤其是4至6個胺基酸。在此情況下，在同一片段上編碼的V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>經由連接子連接，該連接子足夠短以避免在同一條鏈上的V<sub>L</sub>與V<sub>H</sub>之間的非共價鍵且避免形成單鏈可變區片段，因此可以與另一個片段形成二聚體。可以在形成雙功能抗體之片段之間經由共價鍵或非共價鍵或這兩者形成二聚體。

此外，形成雙功能抗體之片段可以經由連接子或其類似者連接，形

成單鏈雙功能抗體(sc(Fv)<sub>2</sub>)。藉由使用約15至20個胺基酸之長連接子連接形成雙功能抗體之片段，可以在存在於同一條鏈上的形成雙功能抗體之片段之間形成非共價鍵，從而形成二聚體。基於與製備雙功能抗體相同的原理，亦可以藉由連接三個或更多個形成雙功能抗體之片段來製備諸如三聚體或四聚體之聚合抗體。

本發明之抗體或功能性片段較佳特異性結合至TNF $\alpha$ 。當抗體或功能性片段能夠區分人類TNF $\alpha$ 與一或多個參考分子時，如本文所用之抗體或其功能性片段「特異性識別」或「特異性結合至」人類TNF $\alpha$ 。與參考分子中之每一者的結合的IC<sub>50</sub>值較佳比與TNF $\alpha$ 之結合的IC<sub>50</sub>值大至少1,000倍，尤其如實例2，部分2.1.4中所述。在其最普遍的形式中(且當未提及限定參考時)，「特異性結合」係指抗體或功能性片段區分人類TNF $\alpha$ 與不相關生物分子之能力，如例如根據此項技術中已知之特異性分析方法所判定。此類方法包含(但不限於)西方墨點法(Western blots)及ELISA測試。舉例而言，可以執行標準ELISA分析。通常不是使用單一參考生物分子，而是使用一組約三至五個不相關的生物分子，諸如奶粉、BSA、運鐵蛋白或其類似者，來測定結合特異性。在一個實施例中，特異性結合係指抗體或片段區分人類TNF $\alpha$ 與人類TNF $\beta$ 之能力。

本發明之抗體或本發明之功能性片段包含V<sub>L</sub>域及V<sub>H</sub>域。V<sub>L</sub>域包含CDR1區(CDRL1)、CDR2區(CDRL2)、CDR3區(CDRL3)及構架區。V<sub>H</sub>域包含CDR1區(CDRH1)、CDR2區(CDRH2)、CDR3區(CDRH3)及構架區。

術語「CDR」係指抗體可變域內主要促進抗原結合的六個高變區之一。六個CDR之最常用定義之一係由Kabat E. A.等人, (1991) Sequences

of proteins of immunological interest. NIH公開案91-3242)提供。如本文所用的Kabat之CDR定義僅適用於輕鏈可變域(CDR L1、CDR L2、CDR L3，或L1、L2、L3)之CDR1、CDR2及CDR3，以及重鏈可變域(CDR H2、CDR H3，或H2、H3)之CDR2及CDR3。然而，如本文所用的重鏈可變域(CDR H1或H1)之CDR1係由以下殘基(Kabat編號)定義：其始於位置26且在位置36之前結束。

V<sub>L</sub>域之CDR1區由根據如SEQ ID NO: 1中所示胺基酸序列的胺基酸序列組成。V<sub>L</sub>域之CDR1區較佳由選自由SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 22組成之群的胺基酸序列組成。V<sub>L</sub>域之CDR1區最佳由如SEQ ID NO: 7中所示胺基酸序列組成。

V<sub>L</sub>域之CDR2區由根據如SEQ ID NO: 2中所示胺基酸序列的胺基酸序列組成。V<sub>L</sub>域之CDR2區較佳由選自由SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25及SEQ ID NO: 26組成之群的胺基酸序列組成。V<sub>L</sub>域之CDR2區最佳由如SEQ ID NO: 8中所示胺基酸序列組成。

V<sub>L</sub>域之CDR3區由根據如SEQ ID NO: 3中所示胺基酸序列的胺基酸序列組成。V<sub>L</sub>域之CDR3區較佳由選自由SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31及SEQ ID NO: 32組成之群的胺基酸序列組成。V<sub>L</sub>域之CDR3區最佳由如SEQ ID NO: 9中所示胺基酸序列組成。

V<sub>H</sub>域之CDR1區由根據如SEQ ID NO: 4中所示胺基酸序列的胺基酸序列組成。V<sub>H</sub>域之CDR1區較佳由選自由SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO:

33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35及SEQ ID NO: 36組成之群的胺基酸序列組成。V<sub>H</sub>域之CDR1區最佳由如SEQ ID NO: 10中所示胺基酸序列組成。

V<sub>H</sub>域之CDR2區由根據如SEQ ID NO: 5中所示胺基酸序列的胺基酸序列組成。V<sub>H</sub>域之CDR2區較佳由選自由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40及SEQ ID NO: 41組成之群的胺基酸序列組成。V<sub>H</sub>域之CDR2區最佳由如SEQ ID NO: 11中所示胺基酸序列組成。

V<sub>H</sub>域之CDR3區由根據如SEQ ID NO: 6中所示胺基酸序列的胺基酸序列組成。V<sub>H</sub>域之CDR3區較佳由選自由SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 48組成之群的胺基酸序列組成。V<sub>H</sub>域之CDR3區最佳由如SEQ ID NO: 12中所示胺基酸序列組成。

在一個特定實施例中，本發明之抗體或本發明之功能性片段包含(i) V<sub>L</sub>域，其包含具有根據如SEQ ID NO: 1中所示胺基酸序列者的CDR1區、具有根據如SEQ ID NO: 2中所示胺基酸序列者的CDR2區及具有根據如SEQ ID NO: 3中所示胺基酸序列者的CDR3區；及(ii) V<sub>H</sub>域，其包含具有根據如SEQ ID NO: 4中所示胺基酸序列者的CDR1區、具有根據如SEQ ID NO: 5中所示胺基酸序列者的CDR2區及具有根據如SEQ ID NO: 6中所示胺基酸序列者的CDR3區。

在一個特定實施例中，本發明之抗體或本發明之功能性片段包含(i) V<sub>L</sub>域，其包含具有如SEQ ID NO: 7中所示胺基酸序列的CDR1區、具有如SEQ ID NO: 8中所示胺基酸序列的CDR2區及具有如SEQ ID NO: 9中

所示之胺基酸序列的CDR3區；及(ii) V<sub>H</sub>域，其包含具有如SEQ ID NO: 10中所示胺基酸序列的CDR1區、具有如SEQ ID NO: 11中所示胺基酸序列的CDR2區及具有如SEQ ID NO: 12中所示胺基酸序列的CDR3區。

在一個更佳實施例中，本發明之抗體或本發明之功能性片段包含具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列的V<sub>H</sub>域。在另一個更佳實施例中，抗體或功能性片段包含具有如SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 54中所示胺基酸序列的V<sub>L</sub>域。本發明之抗體或本發明之功能性片段最佳包含(i)具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列的V<sub>H</sub>域，及(ii)具有如SEQ ID NO: 14中所示胺基酸序列的V<sub>L</sub>域。

在一個尤佳實施例中，功能性片段係單鏈抗體(scFv)，其包含具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有如SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 54中所示胺基酸序列的V<sub>L</sub>域。V<sub>H</sub>域及V<sub>L</sub>域較佳由肽連接子連接。肽連接子(在下文中稱為「連接子A」)通常具有約10至約30個胺基酸，更佳約15至約25個胺基酸之長度。連接子A通常包含Gly及Ser殘基，但是其他胺基酸亦係可能的。在較佳實施例中，連接子包含序列GGGGS (SEQ ID NO: 50)之多個重複，例如如SEQ ID NO: 50中所示胺基酸序列的2至6個、或3至5個、或4個連續重複。連接子A最佳由如SEQ ID NO: 49中所示胺基酸序列組成。scFv可以具有以下結構(其中N端在左側且C端在右側)：

V<sub>L</sub>-連接子A-V<sub>H</sub>；或

V<sub>H</sub>-連接子A-V<sub>L</sub>。

功能性片段更佳係由如SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 55中所示之胺基酸序列組成的單鏈抗體(scFv)。功能性片段最佳係由如SEQ ID NO: 15

中所示胺基酸序列組成的單鏈抗體(scFv)。

在另一尤佳實施例中，功能性片段係雙功能抗體，其包含具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有如SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 54中所示胺基酸序列的V<sub>L</sub>域。V<sub>H</sub>域及V<sub>L</sub>域由肽連接子連接。肽連接子(在下文中稱為「連接子B」)較佳具有約2至約10個胺基酸，更佳約5個胺基酸之長度。連接子B通常包含Gly及Ser殘基，但是其他胺基酸亦係可能的。連接子B最佳由如SEQ ID NO: 50中所示胺基酸序列組成。

雙功能抗體較佳係單特異性雙功能抗體，亦即其僅針對一個抗原決定基。雙功能抗體較佳係均二聚體。雙功能抗體可以係兩條彼此非共價鍵結之多肽鏈的二聚體。各單體可以係具有以下結構之多肽鏈：

V<sub>L</sub>-連接子B-V<sub>H</sub>；或

V<sub>H</sub>-連接子B-V<sub>L</sub>。

此外，形成雙功能抗體之片段可以經由連接子A或其類似者連接，形成單鏈雙功能抗體(sc(Fv)<sub>2</sub>)。藉由使用約15至20個胺基酸之長連接子連接形成雙功能抗體之片段，可以在存在於同一條鏈上的形成雙功能抗體之片段之間形成非共價鍵，從而形成二聚體。單鏈雙功能抗體之配置之實例包括以下。

V<sub>H</sub> - 連接子B - V<sub>L</sub> - 連接子A - V<sub>H</sub> - 連接子B - V<sub>L</sub>

V<sub>L</sub> - 連接子B - V<sub>H</sub> - 連接子A - V<sub>L</sub> - 連接子B - V<sub>H</sub>

本發明之雙功能抗體較佳具有以下結構：

V<sub>L</sub> - 連接子B - V<sub>H</sub> - 連接子A - V<sub>L</sub> - 連接子B - V<sub>H</sub>

雙功能抗體最佳由如SEQ ID NO: 51中所示胺基酸序列組成。

基於與製備雙功能抗體相同的原理，亦可以藉由連接三個或更多個

形成雙功能抗體之片段來製備諸如三聚體或四聚體之聚合抗體。

在另一特定實施例中，本發明之抗體係免疫球蛋白，較佳免疫球蛋白 G (IgG)。本發明IgG之子類別不受限制且包括IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及IgG<sub>4</sub>。本發明IgG較佳屬於子類別1，亦即其係IgG<sub>1</sub>分子。在一個實施例中，本發明IgG分子之各輕鏈具有如SEQ ID NO: 52中所示胺基酸序列，及/或本發明IgG分子之各重鏈具有如SEQ ID NO: 53中所示胺基酸序列。本發明之特定IgG由兩條輕鏈及兩條重鏈組成，其中兩條輕鏈各自具有如SEQ ID NO: 52中所示胺基酸序列，且兩條重鏈各自具有如SEQ ID NO: 53中所示胺基酸序列。

### 親和力

本發明之抗體或功能性片段對人類TNF $\alpha$ 具有高親和力。術語「K<sub>D</sub>」係指特定抗體-抗原相互作用之解離平衡常數。如使用表面電漿子共振 (SPR)技術用BIAcore儀器所測定，本發明之抗體或功能性片段通常按以下解離平衡常數(K<sub>D</sub>)結合至人類TNF $\alpha$ ：例如小於約 $2 \times 10^{-10}$  M，較佳小於 $1.5 \times 10^{-10}$  M，較佳小於 $1.25 \times 10^{-10}$  M，更佳小於 $1 \times 10^{-10}$  M，最佳小於 $7.5 \times 10^{-11}$  M，或甚至小於 $5 \times 10^{-11}$  M。特定言之，如實例2，部分2.1.1中所述進行K<sub>D</sub>測定。

### 與來自食蟹猴或來自恆河猴之TNF $\alpha$ 的交叉反應性

在特定實施例中，本發明之抗體或功能性片段對來自諸如食蟹猴(食蟹獼猴)及/或恆河猴(恆河獼猴)之動物的TNF $\alpha$ 具有高親和力。此係有利的，因為較佳用此類動物進行抗人類TNF $\alpha$ 抗體之臨床前測試，諸如毒性研究。因此，本發明之抗體或功能性片段較佳與來自諸如食蟹猴及/或恆河猴之動物的TNF $\alpha$ 交叉反應。如實例2，部分2.1.1中所述進行親和力量

測。

在一個實施例中，本發明之抗體或功能性片段與來自食蟹獼猴之TNF $\alpha$ 交叉反應。本發明之抗體或功能性片段對食蟹獼猴TNF $\alpha$ 之親和力較佳小於20倍，尤其小於10倍，甚至更尤其小於5倍不同於其對人類TNF $\alpha$ 之親和力。本發明之抗體或功能性片段通常以解離平衡常數( $K_D$ )結合至來自食蟹獼猴之TNF $\alpha$ ，其中(i)與來自食蟹獼猴之TNF $\alpha$ 結合的 $K_D$ 與(ii)與人類TNF $\alpha$ 結合的 $K_D$ 的比率 $R_{\text{食蟹獼猴}}$ 係小於20。

$$R_{\text{食蟹獼猴}} = \frac{K_D(\text{食蟹獼猴})}{K_D(\text{人類})}$$

$R_{\text{食蟹獼猴}}$ 較佳小於20，尤其小於10，甚至更尤其小於5。

在另一實施例中，本發明之抗體或功能性片段與來自恆河獼猴之TNF $\alpha$ 交叉反應。本發明之抗體或功能性片段對恆河獼猴TNF $\alpha$ 之親和力較佳小於20倍，更尤其小於10倍不同於其對人類TNF $\alpha$ 之親和力。本發明之抗體或功能性片段通常以解離平衡常數( $K_D$ )結合至來自恆河獼猴之TNF $\alpha$ ，其中(i)與來自恆河獼猴之TNF $\alpha$ 結合的 $K_D$ 與(ii)與人類TNF $\alpha$ 結合的 $K_D$ 的比率 $R_{\text{恆河獼猴}}$ 係小於20。

$$R_{\text{恆河獼猴}} = \frac{K_D(\text{恆河獼猴})}{K_D(\text{人類})}$$

$R_{\text{恆河獼猴}}$ 較佳小於20，尤其小於10。

在另一實施例中，本發明之抗體或功能性片段與來自食蟹獼猴之TNF $\alpha$ 及與來自恆河獼猴之TNF $\alpha$ 交叉反應。本發明之抗體或功能性片段對食蟹獼猴TNF $\alpha$ 之親和力較佳小於20倍，尤其小於10倍，甚至更尤其小於5倍不同於其對人類TNF $\alpha$ 之親和力，且其對恆河獼猴TNF $\alpha$ 之親和力較佳小於20倍，更尤其小於10倍不同於其對人類TNF $\alpha$ 之親和力。抗體或功能性片段之比率 $R_{\text{食蟹獼猴}}$ 較佳小於20，尤其小於10，甚至更尤其小於5，且抗

體或功能性片段之比率 $R_{恆河獼猴}$ 較佳小於20，尤其小於10。

#### *抑制L929細胞之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能*

本發明之抗體或功能性片段具有抑制L929細胞之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的高效能。在一個特定實施例中，本發明之抗體或功能性片段所具有的抑制L929細胞之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能大於已知抗體英利昔單抗之效能。

可以在如本申請案之實例2，部分2.1.2中所述的L929分析中測定相對於英利昔單抗之效能。本發明之抗體或功能性片段之相對效能大於1.5，較佳大於2，更佳大於3，更佳大於5，更佳大於7.5，或甚至大於10，其中相對效能係(i) L929分析中英利昔單抗之IC<sub>50</sub>值與(ii) L929分析中本發明之抗體或功能性片段之IC<sub>50</sub>值的比率，且其中IC<sub>50</sub>指示達成L929細胞之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的最大抑制之50%所需的各別分子之濃度ng/mL。

在另一實施例中，本發明之抗體或功能性片段之相對效能係大於1.5，較佳大於2，更佳大於3，更佳大於5，更佳大於7.5，或甚至大於10，其中相對效能係(i) L929分析中英利昔單抗之IC<sub>90</sub>值與(ii) L929分析中本發明之抗體或功能性片段之IC<sub>90</sub>值的比率，且其中IC<sub>90</sub>值指示達成L929細胞之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的最大抑制之90%所需的各別分子之濃度ng/mL。

#### *抑制LPS誘導之細胞介素分泌*

本發明之抗體或功能性片段通常能夠抑制LPS誘導單核球分泌細胞介素。單核球之LPS誘導的細胞介素分泌可以如實例7中所述測定。

在一個實施例中，本發明之抗體或功能性片段能夠抑制LPS誘導

CD14<sup>+</sup>單核球分泌介白素-1 $\beta$ 。抑制LPS誘導介白素-1 $\beta$ 分泌之IC<sub>50</sub>值較佳小於1 nM及/或小於100 pg/mL。以莫耳濃度計及/或以重量/體積計，抑制LPS誘導介白素-1 $\beta$ 分泌之IC<sub>50</sub>值較佳低於阿達木單抗之IC<sub>50</sub>值。

在另一實施例中，本發明之抗體或功能性片段能夠抑制LPS誘導CD14<sup>+</sup>單核球分泌TNF $\alpha$ 。抑制LPS誘導TNF $\alpha$ 分泌之IC<sub>50</sub>值較佳小於1 nM及/或小於150 pg/mL。以莫耳濃度計及/或以重量/體積計，抑制LPS誘導TNF $\alpha$ 分泌之IC<sub>50</sub>值較佳低於阿達木單抗之IC<sub>50</sub>值。

### *抑制細胞增殖*

本發明之抗體或功能性片段通常能夠抑制混合淋巴細胞反應中外周血液單核細胞之細胞增殖。可以如實例6中所述測定細胞增殖之抑制。抗體或功能性片段(例如本發明之scFv或雙功能抗體)之刺激指數根據實例6測定較佳小於5，更佳小於4.5。在特定實施例中，抗體(例如本發明之IgG)之刺激指數係小於4或甚至小於3。

### *抑制TNF $\alpha$ 與TNF受體之間的相互作用*

本發明之抗體或功能性片段通常能夠抑制人類TNF $\alpha$ 與TNF受體I (TNFRI)之間的相互作用。人類TNF $\alpha$ 與TNFRI之間的相互作用之抑制可以在如下文在實例2，部分2.1.3中所述的抑制ELISA中測定。

如在抑制ELISA中所測定，本發明之抗體或功能性片段抑制人類TNF $\alpha$ 與TNFRI之間的相互作用的效能相對於英利昔單抗之效能(相對效能)較佳係至少2，其中該相對效能係以英利昔單抗之ng/mL計之IC<sub>50</sub>值與以抗體或其功能性片段之ng/mL計之IC<sub>50</sub>值的比率。

本發明之抗體或功能性片段通常能夠抑制人類TNF $\alpha$ 與TNF受體II (TNFRII)之間的相互作用。人類TNF $\alpha$ 與TNFRII之間的相互作用之抑制可

以在如下文在實例2，部分2.1.3中所述的抑制ELISA中測定。

如在抑制ELISA中所測定，本發明之抗體或功能性片段抑制人類TNF $\alpha$ 與TNFR<sub>II</sub>之間的相互作用的效能相對於英利昔單抗之效能(相對效能)較佳係至少2，更佳至少3，其中該相對效能係以英利昔單抗之ng/mL計之IC<sub>50</sub>值與以抗體或其功能性片段之ng/mL計之IC<sub>50</sub>值的比率。

### 化學計量及交聯

本發明之抗體或功能性片段通常能夠以至少2之化學計量(抗體:TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>)結合至人類TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>。化學計量(抗體:TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>)較佳係大於2，或至少2.5，或至少3。在一個實施例中，化學計量(抗體:TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>)係約3。化學計量(抗體:TNF $\alpha$ <sub>三聚體</sub>)可以如下文實例4中所述測定。

在另一實施例中，本發明之抗體或功能性片段能夠與人類TNF $\alpha$ 形成複合物，其中該複合物包含至少兩個TNF $\alpha$ 分子及至少三個抗體或功能性片段分子。根據此實施例之功能性片段包含至少兩個單獨的TNF $\alpha$ 結合位點，諸如雙功能抗體。複合物形成可以如下文實例5中所述測定。

在一個實施例中，抗體係IgG，且能夠與TNF $\alpha$ 形成至少600 kDa之複合物。在另一實施例中，功能性片段係雙功能抗體，且能夠與TNF $\alpha$ 形成至少300 kDa之複合物。

### 目標選擇性

在某些實施例中，本發明之抗體或功能性片段具有高目標選擇性，亦即其可以區分TNF $\alpha$ 與TNF $\beta$ 。如在如實例2，部分2.1.4中所述的競爭ELISA中測定，TNF $\beta$ 之IC<sub>50</sub>值較佳比TNF $\alpha$ 之IC<sub>50</sub>值大至少1,000倍。如在如實例2，部分2.1.4中所述的競爭ELISA中測定，TNF $\beta$ 之IC<sub>50</sub>值更佳比TNF $\alpha$ 之IC<sub>50</sub>值大至少5,000倍，最佳至少10,000。

### 表現量及再摺疊量

在其他實施例中，本發明之抗體或功能性片段，較佳scFv或雙功能抗體，可以在諸如細菌之微生物中或在其他細胞中以重組方式按高產量表現。如實例2中所述測定，在大腸桿菌(*E. coli*)中之表現量較佳係至少0.25 g/L。此尤其適用於諸如scFv之功能性片段。

如實例2中所述測定，再摺疊量係至少5 mg/L，更佳至少10 mg/L，更佳至少15 mg/L，且最佳至少20 mg/L。此尤其適用於諸如scFv之功能性片段。

### 穩定性

本發明之抗體或功能性片段，較佳scFv或雙功能抗體，通常具有高穩定性。穩定性可以藉由不同方法評定。藉由如實例2，部分2.2.4中所述之差示掃描螢光測定法(DSF)測定，本發明之抗體或功能性片段之可變域的「熔融溫度」 $T_m$ 較佳係至少65°C，更佳至少68°C，最佳至少70°C。如本文所用的「可變域之熔融溫度」係指由序列 $V_L$ -連接子A- $V_H$ 組成之scFv的熔融溫度，其中連接子A之胺基酸序列由如SEQ ID NO: 49中所示胺基酸序列組成。舉例而言，IgG之可變域之熔融溫度被定義為如上文所定義之其相應scFv的熔融溫度。

藉由如實例2，部分2.2.5中所述的分析型尺寸排阻層析測定，在4°C下儲存四週之後，單體含量損失(以10 g/L之濃度；初始單體含量> 95%)較佳係小於5%，更佳小於3%，更佳小於1%，最佳小於0.5%。藉由如實例2，部分2.2.5中所述的分析型尺寸排阻層析測定，在-20°C下儲存四週之後，單體含量損失(以10 g/L之濃度；初始單體含量> 95%)較佳係小於5%，更佳小於3%，更佳小於1%，最佳小於0.5%。藉由如實例2，部分

2.2.5中所述的分析型尺寸排阻層析測定，在-65℃下儲存四週之後，單體含量損失(以10 g/L之濃度；初始單體含量> 95%)較佳係小於5%，更佳小於3%，更佳小於1%，最佳小於0.5%。

如實例2中所述測定，在五個連續凍融循環(freeze-thaw cycles)之後，單體損失係小於5%，更佳小於1%，更佳小於0.5%，最佳小於0.2%，例如0.1%或0.0%。

### 抗體及功能性片段

本發明之特定實施例係關於本文所述之抗體的功能性片段。功能性片段包括(但不限於) F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab片段、scFv、雙功能抗體、三功能抗體及四功能抗體。功能性片段較佳係單鏈抗體(scFv)或雙功能抗體。scFv或雙功能抗體之非CDR序列更佳係人類序列。

較佳地，為了使得在人類中之免疫原性可能性降到最低，所選擇的接受體架構係由源自人類共同序列或人類生殖系序列的構架區組成。特定言之，可變輕鏈域之構架區I至III由根據SEQ ID NO: 56至58的人類Vκ1共同序列組成且基於λ生殖系之序列的構架區IV選自SEQ ID NO: 59至62。因為不是人類共同殘基或人類生殖系殘基的殘基可能引起免疫反應，所以各可變域(VH或VL)中此類殘基之數目應該儘可能地低，較佳低於7，更佳低於4，最佳係0。

抗體較佳係單株抗體。如本文所用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。術語「單株抗體」係指源自單一純系，包括任何真核、原核或噬菌體純系的抗體，而非產生抗體的方法。可以使用此項技術中已知之各種技術製備單株抗體，該等技術包括使用融合瘤、重組及噬菌體呈現技術或其組合。(Harlow及Lane, 「Antibodies, A Laboratory

Manual」 CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.)。

在其他實施例中，包括與抗TNF $\alpha$ 抗體在人類中之活體內使用有關的實施例，可以使用嵌合抗體、靈長類化抗體、人類化抗體或人類抗體。在一個較佳實施例中，抗體係人類抗體或人類化抗體，更佳係單株人類抗體或單株人類化抗體。

如本文所用的術語「嵌合」抗體係指具有源自以下的可變序列的抗體：諸如大鼠或小鼠抗體之非人類免疫球蛋白及通常選自人類免疫球蛋白模板的人類免疫球蛋白恆定區。嵌合抗體之製造方法為此項技術中已知的。參見例如Morrison, 1985, Science 229(4719): 1202-7；Oi等人, 1986, BioTechniques 4:214-221；Gillies等人, 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202；美國專利第5,807,715號；第4,816,567號；及第4,816,397號，其以全文引用的方式併入本文中。

一般熟習此項技術者可用不同的重組方法，藉由產生最小的含有源自非人類(例如，鼠類)免疫球蛋白之序列的免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗體之其他目標結合子序列)，使得此類非人類抗體更像人類。一般而言，所得重組抗體將包含至少一個且通常兩個可變域中的基本上所有，其中所有或基本上所有的CDR區對應於非人類免疫球蛋白之CDR區且所有或基本上所有的FR區係人類免疫球蛋白序列、尤其是人類免疫球蛋白共同序列的FR區。CDR移植抗體係具有來自最初在非人類物種中產生的結合所要抗原的抗體的一或多個互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子的構架(FR)區的抗體分子(EP239400；PCT公開案WO 91/09967；美國專利第5,225,539號；第5,530,101號及第5,585,089號)。在稱為「人類化」的過程中，人類構架區

中之構架殘基常常將另外由來自CDR供體抗體之相應殘基取代以改變、較佳改善抗原結合。此等構架取代藉由此項技術中熟知之方法鑑別，例如藉由使CDR與構架殘基之相互作用模型化以鑑別對於抗原結合而言重要的構架殘基，且進行序列比較以鑑別特定位置處的異常構架殘基。參見例如 Riechmann 等人，1988, *Nature* 332:323-7 及 Queen 等人，美國專利第 5,530,101 號；第 5,585,089 號；第 5,693,761 號；第 5,693,762 號；及第 6,180,370 號(其各自以全文引用的方式併入本文中)。可以使用此項技術中已知的各種其他技術使抗體更人類化，該等技術包括例如鑲飾或表面重塑 (EP592106；EP519596；Padlan, 1991, *Mol. Immunol.* 28:489-498；Studnicka 等人，1994, *Prot. Eng.* 7:805-814；Roguska 等人，1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:969-973)，及鏈改組(美國專利第 5,565,332 號)，其全部以全文引用的方式併入本文中。CDR 移植抗體或人類化抗體亦可以包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，該恆定區通常係所選擇的人類免疫球蛋白模板之恆定區。

在一些實施例中，人類化抗體係如 Queen 等人，美國專利第 5,530,101 號；第 5,585,089 號；第 5,693,761 號；第 5,693,762 號；及第 6,180,370 號(其各自以全文引用的方式併入本文中)中所述製備。

在一些實施例中，抗 TNF $\alpha$  抗體係人類抗體。可能需要完全「人類」抗 TNF $\alpha$  抗體來治療性治療人類患者。如本文所用的「人類抗體」包括具有人類免疫球蛋白之胺基酸序列的抗體且包括自人類免疫球蛋白庫或自針對一或多個人類免疫球蛋白而言的轉殖基因動物分離且不表現內源性免疫球蛋白的抗體。人類抗體可以藉由此項技術中已知的各種方法製得，該等方法包括上文所述的噬菌體呈現方法，使用源自人類免疫球蛋白序列之抗

體庫。參見美國專利第4,444,887號及第4,716,111號；及PCT公開案WO 98/46645；WO 98/50433；WO 98/24893；WO 98/16654；WO 96/34096；WO 96/33735；及WO 91/10741，其各自以全文引用之方式併入本文中。人類抗體亦可以使用不能表現功能內源性免疫球蛋白但可以表現人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠產生。參見例如PCT公開案WO 98/24893；WO 92/01047；WO 96/34096；WO 96/33735；美國專利第5,413,923號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,569,825號；第5,661,016號；第5,545,806號；第5,814,318號；第5,885,793號；第5,916,771號；及第5,939,598號，其以全文引用之方式併入本文中。識別所選擇的抗原決定基的完全人類抗體可以使用稱為「導向選擇(guided selection)」之技術產生。在此方法中，所選擇的非人類單株抗體，例如小鼠抗體，用於指導識別相同抗原決定基之完全人類抗體的選擇(Jespers 等人, 1988, Biotechnology 12:899-903)。

在一些實施例中，抗TNF $\alpha$ 抗體係靈長類化抗體。術語「靈長類化抗體」係指包含猴可變區及人類恆定區之抗體。靈長類化抗體之製造方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第5,658,570號；第5,681,722號；及第5,693,780號，其以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，抗TNF $\alpha$ 抗體係衍生化抗體。舉例而言，但不限於，例如藉由糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、用已知的保護基/封端基衍生化、蛋白水解裂解、鍵聯至細胞配體或其他蛋白質(參見下文關於抗體結合物之討論)等進行修飾的衍生化抗體。眾多化學修飾中之任一者可以藉由已知技術進行，該等技術包括(但不限於)特異性化學裂解、乙醯化、甲醯化、代謝合成衣黴素(tunicamycin)等。另外，衍生物

可以含有一或多個非經典胺基酸。

在又其他態樣中，抗TNF $\alpha$ 抗體具有一或多個插入至其高變區中之一或多者中的胺基酸，例如如US 2007/0280931中所述。

### 抗體結合物

在一些實施例中，抗TNF $\alpha$ 抗體係例如藉由任何類型之分子與抗體共價連接，以共價連接不干擾與TNF $\alpha$ 之結合的方式進行修飾的抗體結合物。使效應部分與抗體結合的技術為此項技術中所熟知的(參見例如 Hellstrom等人, Controlled Drug Delivery, 第2版, 第623-53頁 (Robinson等人編, 1987); Thorpe等人, 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58; 及 Dubowchik等人, 1999, Pharmacology and Therapeutics 83:67-123)。

在一個實例中，抗體或其片段經由視情況在N端或C端之共價鍵(例如，肽鍵)與另一蛋白質(或其部分；較佳至少10、20或50個胺基酸之蛋白質部分)之胺基酸序列融合。抗體或其片段較佳在抗體恆定域之N端連接至另一蛋白質。可以使用重組DNA程序產生此類融合體，例如如WO 86/01533及EP0392745中所述。在另一實例中，效應分子可以提高活體內半衰期。此類型之適合效應分子之實例包括聚合物、白蛋白、白蛋白結合蛋白或白蛋白結合化合物，諸如WO 2005/117984中所述之化合物。

在一些實施例中，抗TNF $\alpha$ 抗體可以連接至聚(乙二醇) (PEG)部分。舉例而言，若抗體係抗體片段，則PEG部分可以經由位於抗體片段中的任何可用的胺基酸側鏈或末端胺基酸官能基連接，例如任何自由胺基、亞胺基、硫醇、羥基或羧基。此類胺基酸可以天然存在於抗體片段中或可以使用重組DNA方法工程改造至片段中。參見例如美國專利第5,219,996號。可以使用多個位點連接兩個或更多個PEG分子。PEG部分較佳經由位於抗

體片段中的至少一個半胱胺酸殘基之硫醇基共價連接。在使用硫醇基作為連接點之情況下，可以使用經過適當活化的效應部分，例如硫醇選擇性衍生物，諸如順丁烯二醯亞胺及半胱胺酸衍生物。

在另一實例中，抗TNF $\alpha$ 抗體結合物係經修飾之Fab'片段，其經聚乙二醇化，亦即其上共價連接有PEG（聚(乙二醇)），例如根據EP0948544中所揭示之方法。亦參見Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications (J. Milton Harris (編), Plenum Press, New York, 1992)；Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications (J. Milton Harris 及 S. Zalipsky 編, American Chemical Society, Washington D. C, 1997)；及Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences (M. Aslam及A. Dent編, Grove Publishers, New York, 1998)；及Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531- 545。

### 醫藥組合物及治療

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

投與抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段之「個體」或「患者」可以係哺乳動物，諸如非靈長類動物(例如，牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等)或靈長類動物(例如，猴或人類)。在某些態樣中，人類係兒科患者。在其他態樣中，人類係成年患者。

本文描述組合物，其包含抗TNF $\alpha$ 抗體及視情況存在之一或多種額外治療劑，諸如下文所述之第二治療劑。組合物通常作為包括醫藥學上可接

受之載劑的無菌醫藥組合物之一部分提供。此組合物可以呈任何適合形式(視所期望的向患者投與組合物之方法而定)。

抗TNF $\alpha$ 抗體及功能性片段可以藉由各種途徑投與給患者，諸如經口、經皮、皮下、鼻內、靜脈內、肌肉內、鞘內、局部(topically)或局部(locally)。在任何指定情況下最合適的投藥途徑將視特定抗體、個體、及疾病之性質及嚴重程度以及個體之身體狀況而定。通常將靜脈內投與抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段。

在一個尤佳實施例中，經口投與本發明之抗體或功能性片段。若投藥係經由經口途徑進行，則功能性片段較佳係單鏈抗體(scFv)、雙功能抗體或IgG。

在典型實施例中，抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段以足以允許以0.5毫克/公斤體重至20毫克/公斤體重靜脈內投藥的濃度存在於醫藥組合物中。在一些實施例中，適用於本文所述之組合物及方法中的抗體或片段之濃度包括(但不限於) 0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13 mg/kg、14 mg/kg、15 mg/kg、16 mg/kg、17 mg/kg、18 mg/kg、19 mg/kg、20 mg/kg，或在任何前述值之間的濃度範圍，例如1 mg/kg至10 mg/kg、5 mg/kg至15 mg/kg或10 mg/kg至18 mg/kg。

視待治療之病狀、投藥途徑及個體之年齡、體重及狀況而定，抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段之有效劑量可以根據單次投藥(例如，快速投藥(bolus administration))、多次投藥或連續投藥而在約0.001至約750 mg/kg的範圍內，或根據單次投藥(例如，快速投藥)、多次投藥或連續投

藥而達成0.01至5000  $\mu\text{g/ml}$ 血清濃度的血清濃度，或任何有效範圍或範圍內的值。在某些實施例中，各劑量可以在每公斤體重約0.5 mg至約50 mg或每公斤體重約3 mg至約30 mg的範圍內。可以將抗體調配為水溶液。

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

抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段的有效劑量、劑量總數及治療長度之確定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，且可以使用標準的劑量遞增研究確定。

適合本文所述之方法中的抗TNF $\alpha$ 抗體及功能性片段的治療性調配物可以藉由將具有所要純度之抗體與視情況選用之此項技術中通常採用的醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(其在本文中皆稱為「載劑」)混合而製備成凍乾調配物或水溶液進行儲存，該等載劑亦即緩衝劑、穩定劑、防腐劑、等張劑、非離子清潔劑、抗氧化劑及其他各種添加劑。參見Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版 (Osol編 1980)。此類添加劑在所採用的劑量及濃度下必須對接受者無毒。

緩衝劑有助於將pH維持在接近生理條件的範圍內。其可以按在約2 mM至約50 mM範圍內的濃度存在。適合緩衝劑包括有機及無機酸及其鹽，諸如檸檬酸鹽緩衝劑(例如，檸檬酸單鈉-檸檬酸二鈉混合物、檸檬酸

-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸單鈉混合物等)、丁二酸鹽緩衝劑(例如，丁二酸-丁二酸單鈉混合物、丁二酸-氫氧化鈉混合物、丁二酸-丁二酸二鈉混合物等)、酒石酸鹽緩衝劑(例如，酒石酸-酒石酸鈉混合物、酒石酸-酒石酸鉀混合物、酒石酸-氫氧化鈉混合物等)、反丁烯二酸鹽緩衝劑(例如，反丁烯二酸-反丁烯二酸單鈉混合物、反丁烯二酸-反丁烯二酸二鈉混合物、反丁烯二酸單鈉-反丁烯二酸二鈉混合物等)、葡糖酸鹽緩衝劑(例如，葡糖酸-葡糖酸鈉混合物、葡糖酸-氫氧化鈉混合物、葡糖酸-葡糖酸鉀混合物等)、草酸鹽緩衝劑(例如，草酸-草酸鈉混合物、草酸-氫氧化鈉混合物、草酸-草酸鉀混合物等)、乳酸鹽緩衝劑(例如，乳酸-乳酸鈉混合物、乳酸-氫氧化鈉混合物、乳酸-乳酸鉀混合物等)及乙酸鹽緩衝劑(例如，乙酸-乙酸鈉混合物、乙酸-氫氧化鈉混合物等)。另外，可以使用磷酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑及三甲胺鹽，諸如Tris。

可以添加防腐劑來阻礙微生物生長，且防腐劑可以按0.2%至1% (w/v)範圍內的量添加。適合防腐劑包括苯酚、苯甲醇、間甲苯酚、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、氯化十八烷基二甲基苯甲基銨、苄烷銨鹵化物(例如，氯化物、溴化物及碘化物)、氯化六羥季銨及對羥基苯甲酸烷基酯(諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯)、兒茶酚、間苯二酚、環己醇及3-戊醇。等張劑有時稱為「穩定劑」，可以添加等張劑來確保液體組合物之等張性且等張劑包括多羥基糖醇，較佳三羥基糖醇或更多羥基的糖醇，諸如甘油、赤藻糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇及甘露糖醇。穩定劑係指廣泛類別之賦形劑，其功能範圍可以係自增積劑至使治療劑溶解或有助於防止變性或黏附於容器壁上的添加劑。典型的穩定劑可以係多羥基糖醇(以上所列舉的)；胺基酸，諸如精胺酸、離胺酸、甘胺

酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等；有機糖或糖醇，諸如乳糖、海藻糖、水蘇糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌肉肌醇、半乳糖醇、甘油及其類似者，包括環醇，諸如肌醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，諸如脲、麩胱甘肽、硫辛酸、巰乙酸鈉、硫甘油、 $\alpha$ -單硫甘油及硫代硫酸鈉；低分子量多肽(例如，具有10個殘基或更少殘基的肽)；蛋白質，諸如人類血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮單醣，諸如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；雙醣，諸如乳糖、麥芽糖、蔗糖；及三醣，諸如棉子糖；以及多醣，諸如聚葡萄糖。每重量份活性蛋白質可以存在在0.1至10,000重量範圍內的穩定劑。

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

另外各種賦形劑包括增積劑(例如，澱粉)、螯合劑(例如，EDTA)、抗氧化劑(例如，抗壞血酸、甲硫胺酸、維生素E)、蛋白酶抑制劑及共溶劑。

本文中之調配物除了抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段之外亦可以含有第二治療劑。適合第二治療劑之實例提供於下文中。

給藥時程可以在一月一次至每天一次之範圍內變化，視多種臨床因

素而定，包括疾病類型、疾病嚴重程度及患者對抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段之敏感性。在特定實施例中，抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段係每天一次、每週兩次、一週三次、每隔一天、每5天、每10天、每兩週、每三週、每四週或一月一次或按任何介於以上任何兩個值之間的範圍投與，例如每四天至每月、每10天至每兩週、或一週兩次至一週三次等。

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

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

#### *待治療之病症*

本發明係關於一種治療或預防個體之人類TNF $\alpha$ 相關疾病的方法，其包含向個體投與如本文所定義之抗體或功能性片段。術語「TNF $\alpha$ 相關病症」或「TNF $\alpha$ 相關疾病」係指要求TNF $\alpha$ 參與的症狀或疾病病況的任何紊亂、發作、進展或持久性。例示性TNF $\alpha$ 相關病症包括(但不限於)慢性及/或自體免疫性一般發炎病況；免疫介導之一般發炎病症；發炎性CNS疾病；影響眼睛、關節、皮膚、黏膜、中樞神經系統、胃腸道、泌尿道或肺的發炎疾病；一般葡萄膜炎病況；視網膜炎；HLA-B27+葡萄膜炎；貝塞特氏病(Behçet's disease)；乾眼症候群；青光眼；休格連氏症候群

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

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

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

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

最佳地，本發明之抗體或功能性片段用於治療發炎性腸病，尤其是克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎或顯微性結腸炎。克羅恩氏病可以係迴腸的、

結腸的、迴腸結腸的或隔離的上部的克羅恩氏病(胃的、十二指腸的及/或空腸的)，包括非狹窄型/非穿透型、狹窄型、穿透型及肛周的疾病行為，允許以上所提及者中之任一者的定位及疾病行為的任何組合。潰瘍性結腸炎可以係潰瘍性直腸炎、直腸乙狀結腸炎、左側結腸炎、全潰瘍性結腸炎及貯存袋炎。

### 組合療法及其他態樣

較佳地，經抗TNF $\alpha$ 抗體或其功能性片段治療之患者亦用另一種習知藥物治療。舉例而言，患有發炎性腸病、尤其是若患有中度至重度疾病之患者通常亦用美沙拉嗪(mesalazine)或其衍生物或前藥、皮質類固醇(例如布地奈德(budesonide)或潑尼龍(prednisolone) (經口或靜脈內))、免疫抵制劑(例如硫唑嘌呤(azathioprine)/6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine；6-MP)或甲胺喋呤(methotrexate))、環孢靈(cyclosporine)或他克莫司(tacrolimus)治療。其他可共投與至患者之藥物包括生物製劑，諸如英利昔單抗、阿達木單抗、依那西普、聚乙二醇化賽妥珠單抗或其他。其他可共投與至患者之藥物包括免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤/6-MP或甲胺喋呤或口服環孢靈)以便維持穩定及較長緩解。本發明之又一個態樣係如上文所定義之抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段用於減少發炎的用途。

本發明之又一個態樣係如上文所定義之抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段，其用於減少患有發炎病狀之患者的發炎。

本發明之另一態樣係一種治療發炎病狀之方法，其包含向有需要之患者投與有效量的如上文所定義之抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段。發炎病狀較佳係上文所述之病狀中之一者。

本發明之另一態樣係一種預防發炎病狀之方法，其包含向有需要之

患者投與有效量的如上文所定義之抗TNF $\alpha$ 抗體或功能性片段。發炎病狀較佳係上文所述之病狀中之一者。

表1. 胺基酸序列之概述

| SEQ ID NO: | 說明                                                       |
|------------|----------------------------------------------------------|
| 1          | 通用CDR L1                                                 |
| 2          | 通用CDR L2                                                 |
| 3          | 通用CDR L3                                                 |
| 4          | 通用CDR H1                                                 |
| 5          | 通用CDR H2                                                 |
| 6          | 通用CDR H3                                                 |
| 7          | 純系16-22-H05之CDR L1                                       |
| 8          | 純系16-22-H05及純系16-16-H10之CDR L2                           |
| 9          | 純系16-22-H05及純系16-16-H10之CDR L3                           |
| 10         | 純系16-22-H05、純系16-16-B08及純系16-16-H10之CDR H1               |
| 11         | 純系16-22-H05之CDR H2                                       |
| 12         | 純系16-22-H05之CDR H3                                       |
| 13         | 純系16-22-H05-sc02及純系16-22-H05-sc04之人類化scFv之V <sub>H</sub> |
| 14         | 純系16-22-H05-sc02之人類化scFv之V <sub>L</sub>                  |
| 15         | 純系16-22-H05-sc02之人類化scFv                                 |
| 16         | 純系16-12-B11之CDR L1                                       |
| 17         | 純系16-13-C08之CDR L1                                       |
| 18         | 純系16-13-E05之CDR L1                                       |
| 19         | 純系16-16-B08之CDR L1                                       |
| 20         | 純系16-16-H10之CDR L1                                       |
| 21         | 純系17-13-G07之CDR L1                                       |
| 22         | 純系17-20-E06之CDR L1                                       |
| 23         | 純系16-12-B11、純系16-16-B08及純系17-13-G07之CDR L2               |
| 24         | 純系16-13-C08之CDR L2                                       |
| 25         | 純系16-13-E05之CDR L2                                       |
| 26         | 純系17-20-E06之CDR L2                                       |
| 27         | 純系16-12-B11之CDR L3                                       |
| 28         | 純系16-13-C08之CDR L3                                       |
| 29         | 純系16-13-E05之CDR L3                                       |
| 30         | 純系16-16-B08之CDR L3                                       |
| 31         | 純系17-13-G07之CDR L3                                       |
| 32         | 純系17-20-E06之CDR L3                                       |
| 33         | 純系16-12-B11及純系16-13-E05之CDR H1                           |
| 34         | 純系16-13-C08之CDR H1                                       |
| 35         | 純系17-13-G07之CDR H1                                       |
| 36         | 純系17-20-E06之CDR H1                                       |
| 37         | 純系16-12-B11及純系17-13-G07之CDR H2                           |
| 38         | 純系16-13-C08之CDR H2                                       |
| 39         | 純系16-13-E05之CDR H2                                       |
| 40         | 純系16-16-B08及純系17-20-E06之CDR H2                           |
| 41         | 純系16-16-H10之CDR H2                                       |

|    |                                          |
|----|------------------------------------------|
| 42 | 純系16-12-B11之CDR H3                       |
| 43 | 純系16-13-C08之CDR H3                       |
| 44 | 純系16-13-E05之CDR H3                       |
| 45 | 純系16-16-B08之CDR H3                       |
| 46 | 純系16-16-H10之CDR H3                       |
| 47 | 純系17-13-G07之CDR H3                       |
| 48 | 純系17-20-E06之CDR H3                       |
| 49 | scFv中之連接子序列                              |
| 50 | 雙功能抗體中之連接子序列                             |
| 51 | 純系16-22-H05之人類化雙功能抗體                     |
| 52 | 純系16-22-H05之人類化IgG之輕鏈                    |
| 53 | 純系16-22-H05之人類化IgG之重鏈                    |
| 54 | 純系16-22-H05-sc04之人類化scFv之V <sub>L</sub>  |
| 55 | 純系16-22-H05-sc04之人類化scFv                 |
| 56 | 構架I之V <sub>κ</sub> 1共同序列(Kabat位置1-23)    |
| 57 | 構架II之V <sub>κ</sub> 1共同序列(Kabat位置35-49)  |
| 58 | 構架III之V <sub>κ</sub> 1共同序列(Kabat位置57-88) |
| 59 | 構架IV之基於V <sub>λ</sub> 生殖系之序列(參見表16)      |
| 60 | 構架IV之基於V <sub>λ</sub> 生殖系之序列(參見表16)      |
| 61 | 構架IV之基於V <sub>λ</sub> 生殖系之序列(參見表16)      |
| 62 | 構架IV之基於V <sub>λ</sub> 生殖系之序列(參見表16)      |

實例

實例1：製造針對人類TNFα之兔抗體

1. 結果

1.1 免疫接種

用經純化之重組性人類TNFα (Peprotech，目錄號300-01A)對兔進行免疫接種。在免疫接種過程中，藉由測定仍可偵測到產生多株血清抗體與抗原之結合的各兔血清之最大稀釋度(效價)來定性評定針對抗原之體液免疫反應的強度。使用酶聯免疫吸附分析(ELISA，參見2.2.1)評定針對固定化重組性人類TNFα之血清抗體效價。所有三隻兔子均以10×10<sup>6</sup>倍仍在ELISA中產生正信號(比由來自用作背景對照之未經處理之不相關動物的血清獲得的信號高至少3倍)的血清稀釋度顯示出非常高的效價。另外，使用基於小鼠L929細胞的分析(參見2.2.3)評定不同兔血清抑制TNFα之生物活性的能力。所有三種血清均抑制小鼠L929纖維母細胞之TNFα誘導的細

胞凋亡。3號兔顯示最強的中和活性，且在1:155,000之血清稀釋度下達到50%抑制(IC<sub>50</sub>)。相比於3號兔，2號兔及1號兔分別顯示低約3倍及21倍的活性，分別在1:55,500及1:7,210之血清稀釋度下達到50%抑制。

選擇自所有三個動物之脾臟分離的淋巴細胞用於後續命中鑑別(hit identification)程序。基於在L929分析中抑制TNF $\alpha$ 之生物活性的效能對動物進行優先排序。因此，所培養的最高命中數源自3號兔，且最低命中數源自1號兔。

## 1.2 命中鑑別

### 1.2.1 命中分選

在命中鑑別程序之前，開發一種基於流動式細胞測量術的分選程序，其專門偵測且允許分離結合B細胞之高親和力TNF $\alpha$  (參見2.1)。

在兩個獨立的分選活動中表徵源自所有三隻兔子的總共 $33 \times 10^6$ 個淋巴細胞(對應於所分離之總淋巴細胞的1.5%)。在所分析的 $33 \times 10^6$ 個細胞中，分離出總共3452個表現TNF $\alpha$ 特異性抗體(IgG)之B細胞。三隻兔子所選殖的淋巴細胞之數目不同，因為自L929分析中血清顯示出強TNF $\alpha$ 抑制的兔子分離到的細胞較多。在經分離之B細胞中，792個純系源自1號兔，1144個純系源自2號兔且1408個純系源自3號兔。108個純系所對應的兔來源未知，因為其源自來自所有3隻兔子之剩餘淋巴細胞的混合物，從而實現少量淋巴細胞自小瓶的最佳回收。

### 1.2.2 命中篩選

在篩選階段獲得的結果係基於用來自抗體分泌細胞(ASC)之培養上清液的未經純化之抗體進行的分析，因為高產量規模的培養不允許純化個別兔抗體。此類上清液用於對大量抗體相對於彼此進行評級，但是除了結合

親和力以外不提供絕對值(例如，關於TNF $\alpha$ 之生物活性之抑制)。在高產量ELISA中篩選結合至重組性人類TNF $\alpha$ 之ASC上清液。進一步藉由ELISA表徵結合TNF $\alpha$ 之上清液與食蟹猴TNF $\alpha$ 的結合、表徵其結合動力學及其在L929分析中中和人類TNF $\alpha$ 之生物活性的潛能。除結合動力學之外，所報導的高產量篩選值應該理解為係基於單點量測(無劑量反應)的「是」或「否」回答。分析選擇用來對抗體重鏈及輕鏈可變域進行擴增及定序的所有102個純系對食蟹猴及小鼠TNF $\alpha$ 的親和力。

#### 1.2.2.1 與人類TNF $\alpha$ 之結合

初級篩選之目的係為了鑑別產生對人類TNF $\alpha$ 具有特異性之抗體的ASC純系。為此目的，藉由ELISA (參見2.2.1)分析3452個ASC純系之細胞培養上清液中針對人類TNF $\alpha$ 之抗體的存在情況。然而，用於評定與重組性人類TNF $\alpha$ 結合之IgG亞型抗體之「數量」的ELISA方法不提供關於抗體之親和力或濃度的資訊。在此分析中，894個ASC純系之上清液產生明顯高於背景的信號。1號兔與2號兔的篩選命中率相似，其中1號兔自792個中鑑別到153個命中(19.3%)且2號兔自1144個中鑑別到225個命中(19.7%)。3號兔顯示顯著更高的命中率34.4%，自1408個中鑑別到484個命中。藉由SPR (二級篩選)量測在此初級篩選中鑑別到的所有894個命中的結合動力學。

#### 1.2.2.2 TNF $\alpha$ 結合動力學

二級篩選之目的係為了藉由表面電漿子共振(SPR，參見2.2.2)獲得關於初級篩選之各命中的目標結合品質的定量資訊。相比於在初級篩選期間所用的ELISA，此方法評定目標結合隨時間而變的動力學。此允許測定抗體與其目標之結合( $k_a$ )及解離( $k_d$ )速率常數。比率 $k_d/k_a$ 提供平衡解離常數

( $K_D$ )，其反映抗體與其目標之親和力。在初級篩選中所鑑別到的894個命中中，可以測定839個單株兔抗體對人類TNF $\alpha$ 之結合親和力。剩餘的55個抗體親和力可以不量測，因為ASC上清液中之抗體濃度低於SPR儀器對應設置的偵測極限。可以量測的839個抗TNF $\alpha$ 抗體顯示解離常數( $K_D$ )在低於 $1.36 \times 10^{-13}$  M至 $1.14 \times 10^{-8}$  M的範圍內。所有經分析抗體中69%的 $K_D$ 低於0.5 nM。

自2號兔及3號兔鑑別到的篩選命中的中值 $K_D$   $2.21 \times 10^{-10}$  M及 $2.09 \times 10^{-10}$  M係相近的，而1號兔顯示的值高約2倍，其中中值 $K_D$ 係 $4.65 \times 10^{-10}$  M。當僅考慮中和篩選命中時，所有三個動物的親和力分佈係相似的，且中值 $K_D$ 值較低(中值 $K_D$ 介於 $1.4 \times 10^{-10}$  M與 $1.27 \times 10^{-10}$  M之間)。關於1號兔、2號兔及3號兔之篩選命中之5%分別量測到低於0.041 nM、0.029 nM及0.026 nM的親和力。關於上清液之2%，親和力甚至在低皮莫耳(picomolar)範圍內(低於6.2 pM、7.9 pM及11 pM)。由二級篩選產生的極佳產量的高親和力抗體為選擇最恰當的抗體進行人類化及重新格式化提供了廣泛的基礎。

#### 1.2.2.3 效能

關於效能之評定，已研發基於細胞之分析(L929分析) (參見2.2.3)。894個所選擇的抗體中的506個(56.6%)在L929分析中抑制TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡超過50%。與在效價分析期間獲得的結果一致，最高的中和命中百分比源自3號兔，命中率係62.8%；其次係2號兔，命中率係56.4%；且1號兔命中率最低，係39.9%。此等中和抗體之親和力範圍在 $1.36 \times 10^{-13}$ 至 $1.19 \times 10^{-9}$  M之間。

#### 1.2.2.4 物種交叉反應性(食蟹猴)

藉由ELISA (參見2.2.1)分析在初級篩選中鑑別到的所有894個命中與食蟹猴TNF $\alpha$ 之物種交叉反應性。此額外篩選之目的係為了選擇已知與食蟹猴TNF $\alpha$ 交叉反應的ASC純系。然而，用於評定與重組性食蟹猴TNF $\alpha$ 結合之IgG亞型抗體之「數量」的ELISA方法不提供關於抗體之親和力或濃度的資訊。來自414個(46%) ASC純系之上清液產生清除信號(clear signal) (光密度(OD)  $\geq 1$ )。1號兔及3號兔與食蟹猴TNF $\alpha$ 交叉反應之命中百分比係相似的，其中1號兔自153個中鑑別到81個命中(52.9%)，且3號兔自484個中鑑別到236個命中(48.8%)。2號兔顯示略低的交叉反應命中百分比37.8%，自225個中鑑別到82個命中。

#### 1.2.2.5 為RT-PCR選擇純系

作為兔抗體之命中確認、基因序列分析及後續人類化的前提條件，需要擷取編碼兔抗體可變域之基因資訊。此係藉由將各別信使RNA反轉錄(RT)成互補DNA (cDNA)，隨後藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增雙股DNA來進行。經歷RT-PCR之ASC純系的選擇主要係基於親和力及中和活性。至於額外標準，考慮與食蟹猴TNF $\alpha$ 之交叉反應性。選擇總共102個ASC純系藉由RT-PCR進行基因選殖。首先選擇在L929分析中抑制TNF $\alpha$ 之生物活性超過50%且顯示與食蟹猴TNF $\alpha$ 顯著結合的93個評級最佳的ASC(就親和力而言)，其K<sub>D</sub>低於80 pM。另外，仍然亦選擇中和TNF $\alpha$ 活性超過50%，但不與食蟹猴TNF $\alpha$ 結合的所有9個評級最佳的ASC純系，其K<sub>D</sub>低於20 pM。自1號兔、2號兔及3號兔分別成功地擴增且定序總共12、13及66個ASC純系。

#### 1.2.2.6 鑑別具有所要特性的相關純系

為了表徵一組經分離ASC純系之基因多樣性，提取互補決定區

(CDR)之序列且對其進行多重序列比對，從而允許序列在系統樹(phylogenetic tree)中聚類(clustering)。

雖然此分析一方面允許選擇一組多樣化的純系序列進行人類化及重新格式化實驗，但是其亦鑑別似乎共用兔中之常見親本B細胞純系的同源純系序列簇。此等序列簇之特點係CDR中之高序列同源性及一致的藥效學特性模式。一簇八個純系的此等特徵均概述於表2及表3中。儘管此序列簇之功能保守，但是表3中之共同序列揭示，CDR之某些變異性係耐受的，同時仍產生所要的藥效學概況。

表2：ASC上清液中之單株抗體的藥效學特性.

| ASC SN<br>純系ID | 對人類TNF $\alpha$ 之親和力                     |                          |           | 對食蟹猴TNF $\alpha$ 之親和力                    |                          |           | L929<br>分析<br>抑制% |
|----------------|------------------------------------------|--------------------------|-----------|------------------------------------------|--------------------------|-----------|-------------------|
|                | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $K_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (M) | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $K_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (M) |                   |
| 16-12-B11      | 3.22E+06                                 | 1.87E-04                 | 5.82E-11  | 2.15E+06                                 | 1.37E-03                 | 6.34E-10  | 71                |
| 16-13-C08      | 1.77E+06                                 | 9.41E-05                 | 5.33E-11  | 1.80E+06                                 | 1.77E-04                 | 9.82E-11  | 93                |
| 16-13-E05      | 2.78E+06                                 | 8.27E-05                 | 2.97E-11  | 2.53E+06                                 | 2.99E-04                 | 1.18E-10  | 94                |
| 16-16-B08      | 2.27E+06                                 | 4.53E-05                 | 1.99E-11  | 2.35E+06                                 | 1.52E-04                 | 6.45E-11  | 73                |
| 16-16-H10      | 2.03E+06                                 | 1.59E-04                 | 7.85E-11  | 2.20E+06                                 | 4.61E-04                 | 2.10E-10  | 70                |
| 16-22-H05      | 1.90E+06                                 | 7.26E-05                 | 3.82E-11  | 2.17E+06                                 | 6.97E-05                 | 3.21E-11  | 67                |
| 17-13-G07      | 7.87E+05                                 | 1.37E-06                 | 1.73E-12  | 7.80E+05                                 | 7.34E-05                 | 9.41E-11  | 109               |
| 17-20-E06      | 1.19E+06                                 | 3.59E-06                 | 3.03E-12  | 1.45E+06                                 | 3.27E-05                 | 2.26E-11  | 101               |

表3：針對以上純系獲得關於CDR之以下序列資料：

| CDR    | 純系        | 序列*              | SEQ ID NO: |
|--------|-----------|------------------|------------|
| CDR L1 | 16-22-H05 | QASQSIFSGLA      | 7          |
|        | 16-12-B11 | QASQSI SNYLA     | 16         |
|        | 16-13-C08 | QASQSISTALA      | 17         |
|        | 16-13-E05 | QASQSIGRNLA      | 18         |
|        | 16-16-B08 | QASQSI SNSLA     | 19         |
|        | 16-16-H10 | QASQSI YSGLA     | 20         |
|        | 17-13-G07 | QASQSIGSNLA      | 21         |
|        | 17-20-E06 | QASQSI SSSLA     | 22         |
|        |           | QASQSIXXXLA      | 1          |
| CDR L2 | 16-22-H05 | GASKLAS          | 8          |
|        | 16-12-B11 | RASTLAS          | 23         |
|        | 16-13-C08 | RASTLES          | 24         |
|        | 16-13-E05 | QASKLAS          | 25         |
|        | 16-16-B08 | RASTLAS          | 23         |
|        | 16-16-H10 | GASKLAS          | 8          |
|        | 17-13-G07 | RASTLAS          | 23         |
|        | 17-20-E06 | RASKLAS          | 26         |
|        |           | XASXLXS          | 2          |
| CDR L3 | 16-22-H05 | QSYYYSSSSSDG SYA | 9          |
|        | 16-12-B11 | QSYYYSSSSSDG FFA | 27         |

|        |           |                   |    |
|--------|-----------|-------------------|----|
|        | 16-13-C08 | QSYYYSSSSSDGSFA   | 28 |
|        | 16-13-E05 | QSYYYSSSNSDGLA    | 29 |
|        | 16-16-B08 | QSYYYSSISSDGSYA   | 30 |
|        | 16-16-H10 | QSYYYSSSSSDGSYA   | 9  |
|        | 17-13-G07 | QSYYYSSSSSDGSVA   | 31 |
|        | 17-20-E06 | QSYYYTSSTSDGSYA   | 32 |
|        |           | QSYYYXSXXSDGXXA   | 3  |
| CDR H1 | 16-22-H05 | GIDFNNGIG         | 10 |
|        | 16-12-B11 | GIDFSNYGIC        | 33 |
|        | 16-13-C08 | GIDFSNYGIS        | 34 |
|        | 16-13-E05 | GIDFSNYGIC        | 33 |
|        | 16-16-B08 | GIDFNNGIG         | 10 |
|        | 16-16-H10 | GIDFNNGIG         | 10 |
|        | 17-13-G07 | GIDFSTYGIS        | 35 |
|        | 17-20-E06 | GIDFSNYGIG        | 36 |
|        |           | GIDFXXYGIX        | 4  |
| CDR H2 | 16-22-H05 | YIYPGFAITNFANSVKG | 11 |
|        | 16-12-B11 | YIYPGFGITNYANSVKG | 37 |
|        | 16-13-C08 | YIYPGFGIRNYAHSVKG | 38 |
|        | 16-13-E05 | YIYPGFGIRNYANSLKG | 39 |
|        | 16-16-B08 | YIYPGFAIRNYANSVKG | 40 |
|        | 16-16-H10 | YIYPGFGITNFANSVKG | 41 |
|        | 17-13-G07 | YIYPGFGITNYANSVKG | 37 |
|        | 17-20-E06 | YIYPGFAIRNYANSVKG | 40 |
|        |           | YIYPGFXIXNXAXSXXG | 5  |
| CDR H3 | 16-22-H05 | DPVYATSSGYFDL     | 12 |
|        | 16-12-B11 | DPIYASSSGYLDL     | 42 |
|        | 16-13-C08 | DPVYSSDWGYFNL     | 43 |
|        | 16-13-E05 | DPVYASSSGYLDL     | 44 |
|        | 16-16-B08 | DPLYATSSGYFDL     | 45 |
|        | 16-16-H10 | DPVYASSSGYFDL     | 46 |
|        | 17-13-G07 | DPVYASSSAYYNL     | 47 |
|        | 17-20-E06 | DPLYSTSSGYFNL     | 48 |
|        |           | DPXYXXXXXXYXXL    | 6  |

\*命名為「X」之胺基酸具有如隨附序列表中所定義之含義。

1.2.2.7 與食蟹猴TNFα之交叉反應性(藉由SPR)

因為強力中和TNFα之高親和力命中的量大，所以為了便於選擇ASC純系進行命中確認，評定所有經歷RT-PCR之單株兔抗體的物種交叉反應性。藉由如上所述之SPR量測(亦參見2.2.2)以類似方式測定對食蟹猴TNFα之親和力。93個測試抗體對食蟹猴TNFα之親和力在 $9.6\times10^{-12}$ 至 $2.1\times10^{-9}$  M的範圍內。93個交叉反應抗體中之38個以類似的親和力( $K_D$ 差異小於兩倍)結合人類及食蟹猴TNFα。此外，對於93個交叉反應抗體中之79個而言，人類與食蟹猴之間的親和力差異小於20倍，且對於其中的62

個而言小於10倍，這使得該等抗體對於在食蟹猴中之臨床前發展而言係可接受的。

## 2. 方法

### 2.1 分選分析

如由Lalor等人(Eur J Immunol.1992;22.3001-2011)所概述般進行基於流動式細胞測量術之分選程序以自兔淋巴組織分離抗原特異性B細胞。

### 2.2 篩選分析

#### 2.2.1 TNF $\alpha$ 結合ELISA (人類及食蟹猴TNF $\alpha$ )

將重組性人類TNF $\alpha$  (Peprotech，目錄號300-01)塗佈於96孔微量滴定 ELISA 盤上。藉由經 HRP 標記之二級抗兔 IgG (JacksonImmuno Research，目錄號111-035-046)偵測ASC培養上清液中之兔抗體與固定TNF $\alpha$ 之結合。添加TMB受質(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，KPL，目錄號53-00-00)且藉由添加H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止呈色反應。使用微量滴定盤讀取器(Infinity讀取器M200 Pro, Tecan)在450 nm之波長下讀取培養盤。

藉由市售陽性對照抗TNF $\alpha$ 兔多株抗體(AbD Serotec，目錄號9295-0174)監測篩選活動期間的分析效能。為此目的，以100及250 ng/ml在各篩選培養盤雙重複地測試陽性對照抗體。監測各培養盤之陽性對照反應的穩健性及精確性。在最終分析條件下，250 ng/ml陽性對照的信號/背景之比在30至40之間，且陽性對照之變異係數(CV)低於10%。相對於250 ng/ml陽性對照而言光密度 $\geq 100\%$ 之信號視為主要篩選命中。

關於血清效價測定，使用與上文所述相同的ELISA設置。當免疫血清之結合信號比未經處理之不相關動物的信號高至少3倍時，血清稀釋度視為陽性。

使用與上文所述類似的ELISA測定與食蟹猴之物種交叉反應性。將重組性食蟹猴TNF $\alpha$  (Sino Biological，目錄號90018-CNAE)塗佈於96孔微量滴定ELISA盤上。藉由如上文所說明的經HRP標記之二級抗體偵測ASC培養上清液中之兔抗體與固定食蟹猴TNF $\alpha$ 之結合。以1:80,000及1:320,000之稀釋度使用2號兔之免疫血清作為陽性對照。監測各培養盤之陽性對照反應的穩健性及精確性。在最終分析條件下，稀釋度為1:80,000之陽性對照的信號/背景之比在20至30之間，且陽性對照之CV低於10%。

#### 2.2.2 藉由SPR量測TNF $\alpha$ 之結合動力學(人類及食蟹猴)

藉由表面電漿子共振(SPR)，使用MASS-1 SPR儀器(Sierra Sensors)量測抗體對人類TNF $\alpha$ 之結合親和力。藉助於標準參考溶液以及藉由分析參考抗體-抗原相互作用，諸如英利昔單抗-TNF $\alpha$ 相互作用，對儀器效能做出合格鑑定。

關於親和力篩選，使用標準胺偶聯程序將對兔IgG之Fc區(Bethyl Laboratories，目錄號A120-111A)具有特異性的抗體固定於感測器晶片(SPR-2親和力感測器，高容量胺，Sierra Sensors)上。藉由固定的抗兔IgG抗體捕捉ASC上清液中之兔單株抗體。在捕捉單株抗體之後，將人類TNF $\alpha$  (Peprotech，目錄號300-01)以90 nM之濃度歷經3分鐘注射至流槽中，且使感測器晶片上由IgG捕捉到的蛋白質解離5分鐘。在各注射循環之後，藉由10 mM甘胺酸鹽酸鹽之兩個注射使表面再生。採用MASS-1分析軟體(分析器，Sierra Sensors)，使用一對一朗謬結合模型(one-to-one Langmuir binding model)，計算表觀解離( $k_d$ )及結合( $k_a$ )速率常數以及表觀解離平衡常數( $K_D$ )，且基於相對 $\chi^2$  ( $\chi^2$ 針對外推得到的最大分析物結合量標準化)監控擬合品質，相對 $\chi^2$ 係曲線擬合品質之量度。就大多數命中

而言，相對 $\chi^2$ 值係低於15%。若配體結合之反應單位(RU)係抗體捕捉之RU的至少2%，則認為結果係有效的。配體結合之RU小於抗體捕捉之RU之2%的樣品視為不顯示TNF $\alpha$ 與所捕捉抗體之特異性結合。

使用相同的分析設置及TNF $\alpha$ 濃度且應用相同的品質量度來量測與食蟹猴TNF $\alpha$  (Sino Biological，目錄號90018-CNAE)之物種交叉反應性。所分析的ASC上清液中之大多數的相對 $\chi^2$ 係低於15%。

### 2.2.3 L929纖維母細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡

使用小鼠L929纖維母細胞(ATCC/LGC標準，目錄號CCL-1)評定來自ASC培養上清液之兔IgG中和重組性人類TNF $\alpha$ 之生物活性的能力。藉由添加1  $\mu$ g/ml放線菌素D (actinomycin D)使L929細胞敏化發生TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡。在96孔平底微量滴定盤中在50% ASC培養上清液及100 pM (5.2 ng/ml)人類TNF $\alpha$  (Peprotech，目錄號300-01)存在下培養細胞24小時。相比於經純化之抗體，在ASC上清液存在下，必須使用更高濃度之TNF $\alpha$ 來進行命中篩選。藉由比色分析，使用WST-8 (2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑鎢單鈉鹽)細胞增殖試劑(Sigma Aldrich，目錄號96992)測定細胞存活率。WST-8經細胞去氫酶還原為橙色甲臍產物。甲臍產量與活細胞數成正比。使用四參數對數曲線擬合，使用Softmax 資料分析軟體(Molecular Devices)分析資料，且將TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡中和50%所需的英利昔單抗之濃度(IC<sub>50</sub>)經過計算係36.2 ng/ml之濃度。因此，針對此分析所估計之偵測下限係在30至40 ng/ml之間。此值僅僅係偵測極限的粗略估計值，因為TNF $\alpha$ 之阻斷潛能不僅視單株抗體之濃度而定，而且亦視抗體對目標之親和力而定。然而，該分析之敏感度足以篩選ASC上清液，因為大多數ASC上清液中之IgG濃度

係高於40 ng/ml之濃度。TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡得到50%中和的上清液視為陽性。

為了確保在篩選活動期間穩健的分析效能，以115 ng/ml (0.8 nM)及58 ng/ml (0.4 nM)在各篩選培養盤上雙重複地測試陽性對照抗體英利昔單抗。監測各篩選培養盤之陽性對照反應的抑制百分比及精確性。各培養盤之接受準則設定如下：在115 ng/ml之濃度下，陽性對照抗體達成至少60%抑制，且變異係數(CV)低於20%。

## 實例2：scFv之人類化及產生

### 1. 結果

#### 1.1 命中確認及用於人類化之命中選擇

在命中篩選期間擷取73組獨特的親本兔輕鏈及重鏈可變域且藉由序列比對進行分析。基於篩選分析結果及個別兔IgG純系之序列同源性，選擇30個候選者進行命中確認。製造29個單株抗體且選擇就親和力及效能而言表現最佳的純系進行人類化及主導候選者產生。純系選擇準則係i) L929分析中人類TNF $\alpha$ 之中和，ii)對人類TNF $\alpha$ 之高親和力，iii)與食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之交叉反應性，及iv)序列多樣性。已選擇一個純系(16-22-H05)進行人類化：就L929分析中中和人類TNF $\alpha$ 之效能而言評級最佳的IgG中之一者。關於結合強度，期望可能的最佳的親和力，因為作為人類化及重新格式化為scFv形式的結果，需要考慮到一定程度的親和力損失。

IgG純系第16-22-H05號之資料概述於表4中。

表4：經純化之單株抗體(16-22-H05)的活體外結合及活性特性

| 對人類TNF之親和力                  |                       |           | 對食蟹猴TNF之親和力                 |                       |           | 對恆河猴TNF之親和力                 |                       |           | 在L929分<br>析中TNF<br>之中和          | TNF-<br>TNFR1相互<br>作用之阻斷        | TNF-<br>TNFR2相<br>互作用之<br>阻斷    |
|-----------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------------|-----------------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| $k_a$<br>( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$<br>( $s^{-1}$ ) | KD<br>(M) | $k_a$<br>( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$<br>( $s^{-1}$ ) | KD<br>(M) | $k_a$<br>( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$<br>( $s^{-1}$ ) | KD<br>(M) | 相對IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> | 相對IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> | 相對IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> |
| 4.04E+06                    | 1.31E-04              | 3.25E-11  | 3.50E+06                    | 4.89E-06              | 1.40E-12  | 2.01E+06                    | 5.31E-04              | 2.65E-10  | 9.95                            | 1.02                            | 0.88                            |

\*：IC<sub>50</sub>,英利昔單抗/IC<sub>50</sub>,測試樣品

1.2 人類化scFv片段之產生及選擇

如WO 2014/206561中所述，藉由將CDR環移植到人類可變域架構序列上，電腦模擬(in silico)轉移編碼互補決定區(CDR)之序列。此外，針對每個兔純系產生第二構築體，其自供體序列中與免疫球蛋白域及CDR定位具有結構相關性的位置處轉移了額外胺基酸。(自相應可變輕鏈及重鏈)合成編碼各別人類化單鏈抗體Fv (scFv)之人工基因(針對細菌表現採用最佳化密碼子使用)。隨後產生多肽且隨後使用與在命中確認期間所述類似之分析進行表徵。

1.2.1 人類化scFv (API)之人類化及製造

選定純系之人類化包含將兔CDR轉移至Vκ1/VH3型scFv接受體構架上，如WO 2014/206561中所述。在此過程中，該過程示意性地示出在圖1中，鑑別供體序列(兔mAb)上之六個CDR區之胺基酸序列且將其移植至接受體架構序列中，得到稱為「CDR移植物」之構築體。

另外，設計第二移植物，其包括對兔供體位置L15、L22、L48、L57、L74、L87、L88、L90、L92、L95、L97、L99及H24、H25、H56、H82、H84、H89、H108 (AHo編號)進行額外胺基酸修飾，該等修飾已經描述可能影響CDR定位且由此影響抗原結合(Borras等人, JBC. 2010; 285:9054-9066)。此等人類化構築體係稱為「結構(STR)移植

物」。倘若這兩種初始構築體之表徵資料的比較揭示STR構築體具有顯著優點，則設計組合了CDR移植VL與STR移植VH的額外變異體。此組合已證明通常足以保持STR移植物之活性(Borras等人 2010, JBC, 285:9054-9066)且通常係較佳的，因為人類接受體架構中較少的非人類更改降低了穩定性減弱風險且亦降低了免疫原性可能性。

一旦先前部分中所述之電腦模擬構築體設計完成，即合成相應基因且構建細菌表現載體。在DNA水準上確認表現構築體之序列且根據通用表現及純化方案製造構築體。

用大腸桿菌作為不溶性包涵體進行蛋白質之異源表現。表現培養物接種指數生長起始培養物。在搖瓶中在定軌振盪器中使用市售豐富培養基 (rich media)進行培養。使細胞生長至所限定的OD<sub>600</sub>為2，且藉由用1 mM 異丙基 $\beta$ -D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)表現隔夜進行誘導。在醱酵結束時，藉由離心收集細胞且藉由音波處理均質化。此時藉由SDS-PAGE分析細胞溶解產物測定不同構築體之表現量。藉由離心方案自均質化細胞集結粒分離包涵體，離心方案包括若干洗滌步驟以移除細胞碎片及其他宿主細胞雜質。將經純化之包涵體溶解於變性緩衝劑(100 mM Tris/HCl pH 8.0、6 M Gdn-HCl、2 mM EDTA)中且藉由可調式再摺疊方案再摺疊scFv，產生毫克量之天然摺疊的單體scFv。採用標準化方案來純化scFv，其包括以下步驟。藉由親和性層析法捕捉再摺疊後之產物，親和性層析法採用Capto L瓊脂糖(GE Healthcare)，產生經純化之scFv。藉由拋光尺寸排阻層析，使用HiLoad Superdex75管柱(GE Healthcare)進一步純化滿足初始測試中之親和力及效能準則的主導候選者。在純化方案之後，在緩衝鹽水溶液中調配蛋白質且藉由各種生物物理學、蛋白質相互作用及生物方

法進行表徵，如下文所述。藉由測定批次中經純化蛋白質之最終產量且針對1 L再摺疊體積標準化此值來比較不同構築體之可生產性。

1.2.2 人類化scFv之生物物理學表徵

將scFv之關於穩定性及可生產性的生物物理學表徵編輯於表5中。如後續部分中所論述，藉由不同報告點表徵scFv構築體之可生產性及穩定性。

關於某些準則研究scFv，如下文所解釋。

可生產性準則應確保選定scFv實體可以按足以支持主導分子之後續發展的量表現、再摺疊及純化。規定的準則係每公升醱酵液(fermentation broth)中scFv之表現量，如藉由SDS-PAGE所評定；及在通用實驗室規模製程中所達成之純化量，如藉由UV光譜法量測經純化蛋白質之量所評定，計算回到1公升再摺疊溶液。

穩定性準則意欲評定分子在製造製程期間之聚集傾向及其在儲存及進一步處理期間的結構完整性。藉由SE-HPLC測定之單體含量允許評定分子在純化製程(2.2.3)期間的膠體穩定性。在後續穩定性研究中，以1及10 mg/mL且在4°C、-20°C及<-65°C下儲存，測試4週持續時間內的單體含量。另外，在5個凍融循環之後測試蛋白質之膠體穩定性。作為額外的穩定性指示參數，藉由差示掃描螢光測定法(DSF) (2.2.4)測定熱去摺疊之中點，提供主導候選者之構形穩定性的讀出。

表5：人類化scFv之生物物理學表徵資料的概述.

|                | 純系ID      | 構築體     | 穩定性   |       |     |     | 可生產性 |       |      |      |
|----------------|-----------|---------|-------|-------|-----|-----|------|-------|------|------|
|                |           |         | Tm    | 儲存    | 凍/融 | 純度  | 表現   | 純化量   |      |      |
|                |           |         | [°C]  | [Δ%]  |     |     |      |       |      |      |
|                |           |         | -65°C | -25°C |     |     |      |       | 4°C  |      |
| 16-22-H05-sc01 |           | CDR     | 74.2  | nd    | nd  | nd  | 98.0 | nd    | 19.1 |      |
| 16-22-H05-sc02 | 16-22-H05 | STR     | 71.3  | 0.0   | 0.0 | 0.2 | 0.0  | 99.9  | 0.27 | 29.8 |
| 16-22-H05-sc04 |           | CDR/STR | 72.6  | 0.2   | 0.1 | 0.4 | 0.0  | 100.0 | 0.26 | 24.1 |

1.2.2.1 可生產性評定

主導候選者scFv分子藉由搖瓶醱酵按分批模式表現且藉由通用實驗室規模的製程純化，得到用於進一步表徵之蛋白質樣品。在此製程期間，監測一些關鍵效能參數來比較候選分子且確定可能難以發展構築體。

在藉由離心收集細胞之後，在粗製大腸桿菌溶解產物之水準上測定表現效價。在收集期間，預期有少量細胞損失，然而在計算表現量時選擇忽略此因素，支持較為保守的生產力估算。關於溶解產物中之scFv產物之定量，選擇經庫馬斯(coomassie)染色的還原性SDS-PAGE (2.2.1)，因為該方法之高特異性允許區分樣品中之產物與宿主細胞蛋白質。

用於評定可生產性之第二準則係針對每公升再摺疊溶液所計算的scFv之純化量。此參數解決了包括蛋白質再摺疊步驟之預期製造製程的潛在瓶頸。因為已經證明再摺疊程序之效率在類似的製造製程中係受限制的，所以已決定關於針對規定的再摺疊體積標準化之可生產性來比較不同構築體之效能。關於產量之計算，藉由UV吸光度(2.2.2)定量各批次的最終蛋白質樣品且除以各別純化之實際再摺疊體積(表6)。

表6：兩個人類化scFv之可生產性資料的概述.藉由針對生產結束細胞(end-of-production cell)之溶解產物的定量SDS-PAGE測定表現效價。藉由最終純化庫之UV吸光度量測來測定批次產量。按每公升再摺疊體積之經純化scFv來計算純化量。

| 構築體ID          | 表現效價<br>[g/L] | 可生產性         |              |               |
|----------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
|                |               | 批次產量<br>[mg] | 再摺疊體積<br>[L] | 純化量<br>[mg/L] |
| 16-22-H05-sc02 | 0.27          | 14.3         | 0.48         | 29.8          |
| 16-22-H05-sc04 | 0.26          | 11.9         | 0.49         | 24.1          |

1.2.2.2 穩定性評定

scFv構築體之構形穩定性、單分散性及結構完整性之評定係關於可

發展性對不同分子進行評級所必須的組成部分。不同構築體之有意義的比較的前提條件係製備品質類似的經純化分子。準則藉由SE-HPLC測定之「單體純度」意欲確保不同測試物質之相容性品質。除了SE-HPLC分析之外，進行SDS-PAGE來測定蛋白質純度及一致性，從而確認所測試製劑之類似品質。

兩個scFv之SE-HPLC結果揭示，所有製劑均可以純化至 $\geq 99\%$ 之單體含量(圖2)。

藉由差示掃描螢光測定法(DSF)測試主導候選者之熱去摺疊行為，以允許關於分子之預期構形穩定性對分子進行評級。螢光原始資料之標準化曲線圖顯示於圖3中，其描繪各樣品之雙重複量測。觀察到合作去摺疊行為。兩個分子16-22-H05-sc02及16-22-H05-sc04所示之 $T_m$ 分別係 $71.3^\circ\text{C}$ 及 $72.6^\circ\text{C}$ 。

在第二組穩定性評定中，監測不同溫度下4週持續時間內分子之單分散性。穩定性研究之結果及所得單體含量顯示於圖4中。在 $10\text{ mg/mL}$ 之濃度下，兩個分子(16-22-H05-sc02及16-22-H05-sc04)均以最少超過 $95\%$ 單體之單體含量開始且相對於對應的起始值，單體損失小於 $5\%$ 。在 $-20^\circ\text{C}$ 及 $<-65^\circ\text{C}$ 下之冷凍狀態，樣品隨時間推移僅顯示出極小的差異。在最苛刻的條件( $4^\circ\text{C}$ )下，分子16-22-H05-sc02在4週期間單體損失少至 $0.2\%$ 。此外，在 $37^\circ\text{C}$ 之溫度及 $10\text{ mg/mL}$ 之scFv濃度下進行壓力穩定性研究，持續長達4週。預期在此條件下可更嚴格地區分不同構築體之聚集傾向。圖6中所概述之所得資料揭示在28天後單體損失 $15\%$ 。兩個scFv均證明在壓力條件下的良好單體穩定性。在 $4^\circ\text{C}$ 下之穩定性研究的層析圖提供在圖5中，其中顯示了第0天及在 $4^\circ\text{C}$ 下28天後的樣品。在此層析圖重疊圖中，亦顯示了凍/

融穩定性之結果。關於研究的這個部分，使樣品反覆地凍融，總共5個循環。藉由分析型SE-HPLC得到的單體含量之所得定量揭示兩個樣品無任何改變(表5)。

對兩個scFv進行SDS-PAGE分析，從而產生用於藉由UV吸光度進行定量的支持性資料，確認樣品製備之純度且從而賦予含量定量專一性。在此分析之另一態樣中，SDS-PAGE結果揭示在穩定性研究(在4°C及10 mg/ml之濃度下28天，相比於在<-65°C下儲存的第0天樣品)期間不存在蛋白質降解，從可發展性的角度來看，此係重要特徵。

重要的是應注意到，在此評定範圍內進行的不同研究處理蛋白質穩定性之不同機制態樣。蛋白質之熱去摺疊溫度之測定將為在高溫下儲存時藉由SE-HPLC量測單分散性提供互補結果。雖然兩種方法均設計成用於提供潛在的產品存放期限及穩定性的估算，但是所處理的機制大不相同。藉由熱去摺疊評定之轉變中點( $T_m$ )係蛋白質結構域穩定性之定性量度(不允許熱力學測定 $\Delta G$ )。非常穩定的蛋白質結構域(高 $T_m$ )不大可能在環境溫度下自發地去摺疊且因此由未摺疊之結構域相互作用驅動的不可逆聚集/沈澱的傾向較小。高結構域穩定性指示胺基酸殘基之密集包裝，其亦與對蛋白酶裂解之抗性相關。另一方面，SE-HPLC評定定量測定單體部分之含量以及可溶性寡聚物/聚集體之含量。此類可溶性寡聚物時常受到正確摺疊的蛋白質之間的靜電或疏水相互作用的驅動而可逆地且相對鬆散地結合著。如藉由熱去摺疊所評定， $T_m$ 之間存在一些相關性；且如藉由SE-HPLC所評定，尤其是就具有「邊界線(border line)」穩定性的蛋白質而言，存在形成寡聚物/聚集體的傾向。超過某個臨限值約60°C之 $T_m$ ，抗體可變域通常足夠穩定以抵抗在環境溫度下因為部分結構域去摺疊所導致的

聚集/沈澱及蛋白水解降解。然而，仍然可能存在由表面殘基之疏水性及/或靜電相互作用驅動的寡聚。重要的是，在高溫(例如，37°C)下之加速(壓力)穩定性研究中，可以同時存在寡聚物形成及沈澱之各種機制。

### 1.2.3 人類化scFv之活體外結合及活性之表徵

在下文中，活體外表徵人類化scFv之目標結合特性及效能。分析與人類TNF $\alpha$ 之結合動力學( $k_a$ 、 $k_d$ 及KD)及中和L929纖維母細胞之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能。另外藉由ELISA及與TNF $\alpha$ 之結合優於與TNF $\beta$ 之結合的目標選擇性測定抑制食蟹猴(食蟹獼猴)及恆河猴(恆河獼猴) TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能以及抑制人類TNF $\alpha$ 與TNFRI/TNFRII之間的相互作用的效能。

為了理解以下結果，重要的是應注意到，兔CDR至人類可變域架構上之轉移以及全尺寸IgG相對於scFv片段之形式改變均可能影響藥理學特性。舉例而言，某些親和力損失通常係與人類化有關。此外，因為scFv之大小比IgG小，所以scFv經由位阻干擾相互作用搭配物之能力大大降低。最後但不是最不重要的，應該注意到，因為其與同源三聚TNF $\alpha$ 之二價結合模式，所以有報導稱母體IgG之親和力可能過高(SPR假影)。因此，當在親本二價兔IgG與人類化單價scFv之間比較親和力時，可能過高估計了所報導的「親和力損失」。

#### 1.2.3.1 親和力

藉由SPR量測(亦參見2.1.1)測定人類化scFv對人類TNF $\alpha$ 之親和力。使用各別scFv之2倍連續稀釋液測定親和力。scFv係源自兔單株抗體。產生兩個scFv變異體，命名為「CDR」(CDR)及「結構移植物」(STR)。為了評定輕鏈及重鏈中之構架取代之相對份額及可能減少引入人類構架中之

兔胺基酸殘基之數目，進行結構域改組實驗。因此，關於純系16-22-H05，產生含有CDR移植輕鏈及結構移植重鏈(CDR/STR)之scFv構築體。

最高等級的scFv 16-22-H05-sc02 (STR) 及 16-22-H05-sc04 (CDR/STR)之結合親和力分別係 $4.5 \times 10^{-11}$  及  $1.1 \times 10^{-10}$  M。16-22-H05-sc04當與其「結構移植物」變異體(16-22-H04-sc02)進行比較時顯示親和力僅略微降低(參見表7)。此等結果說明，人類化scFv之親和力主要視引入人類重鏈構架中之若干兔胺基酸而定。

### 1.2.3.2 效能

使用L929分析(亦參見2.1.2)分析人類化scFv中和人類TNF $\alpha$ 之能力。分析16-22-H5衍生之scFv中和TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能(IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>)且與參考抗體英利昔單抗之效能進行比較，以允許直接比較來自不同分析培養盤之IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值。以英利昔單抗及scFv之質量單位(ng/ml)計算相對IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值。在不同日期對不同批次之抗體片段進行若干次效能分析。圖7顯示兩個scFv中之每一者自一個實驗之代表性劑量反應曲線。複製量測之平均值顯示於表7中(標準差概述於表之備註中)。

人類化scFv抑制TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值低於英利昔單抗(參見表7)。與SPR結果一致，結構域改組變異體16-22-H05-sc04 (CDR/STR)在與結構移植物16-22-H05-sc02 (STR)進行比較時展現同等效能。scFv 16-22-H05-sc04及16-22-H05-sc02顯示極佳的TNF $\alpha$ 中和活性，IC<sub>50</sub>值分別比英利昔單抗好14.6及13.1倍。16-22-H05-sc04及16-22-H05-sc02之IC<sub>90</sub>值分別比英利昔單抗好13.1及12.6倍。如親本兔單株抗體所觀察到，抗體之親和力與效能之間不存在明確相關性(未顯示相關性)。然而，源自16-22-H05、顯示最高親和力之scFv (16-22-H05-sc02 (STR))

及16-22-H05-sc04 (CDR/STR))亦顯示最高效能。另外，中和分析結果表明，需要達成某些臨限親和力以便有效抑制TNF $\alpha$ 信號傳導。舉例而言，scFv 16-14-D08-sc01 (CDR)、16-15-C09-sc01 (CDR)、16-24-H07-sc01 (CDR)及17-20-G01-sc01 (CDR)全部以高於1 nM之親和力與TNF $\alpha$ 結合，顯示了中和TNF $\alpha$ 之可能性弱(未示出)。

### 1.2.3.3 物種交叉反應性(食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ )

藉由兩種方法測定最高等級的scFv之物種交叉反應性：1)在L929分析中中和食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之效能及2)藉由SPR獲得的對食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之親和力。如上文關於人類TNF $\alpha$ 所述，分別使用食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ ，藉由L929分析以類似方式測定中和不同物種之TNF $\alpha$ 的效能(亦參見2.1.2)。來自兩個物種之TNF $\alpha$ 所顯示出來的誘導L929細胞凋亡之效能非常類似(資料未示出)。因此，使用相同濃度之人類及猴TNF $\alpha$ 進行物種交叉反應性測試。另外，使用與針對人類TNF $\alpha$ 類似的分析測定與食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之結合動力學(藉由SPR) (亦參見2.1.1)。

源自純系16-22-H05之所有scFv皆顯示與食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之交叉反應性(參見表7)。對食蟹猴及恆河猴之親和力係相近的，亦即分別係 $2.0 \times 10^{-10}$ 及 $2.3 \times 10^{-10}$  M。人類與猴TNF $\alpha$ 之間的親和力差異係約5倍。中和食蟹猴、恆河猴及人類TNF $\alpha$ 之效能與針對相應的TNF $\alpha$ 之親和力非常相關。因此，源自16-22-H05之兩個純系顯示對猴TNF $\alpha$ 之效能比對人類TNF $\alpha$ 低5至7倍(參見表7及圖8)。總而言之，兩個scFv顯示與食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ 之物種交叉反應性。

### 1.2.3.4 人類TNF $\alpha$ -TNFRI/II相互作用之阻斷

除了L929分析之外，藉由ELISA評定各人類化scFv抑制人類TNF $\alpha$ 與

TNFR1/II之間的相互作用的效能(參見2.1.3)。類似於L929分析，針對沿各培養盤取得之參考分子英利昔單抗之 $IC_{50}$ 校準各培養盤之個別 $IC_{50}$ 值且以英利昔單抗及scFv之質量單位(ng/ml)計算相對 $IC_{50}$ 及 $IC_{90}$ 值。

當且僅當目標阻斷抗體以高於效能分析中所用之目標濃度的平衡結合常數(KD)結合其目標時(KD>目標濃度)，中和分析才可以區分目標阻斷抗體之效能。關於L929分析，使用5 pM之TNF $\alpha$ 濃度；而在TNFR1/II抑制ELISA中，使用960 pM之TNF $\alpha$ 濃度。因此，理論上，L929分析可以區分KD > 5 pM的scFv之間的效能，而抑制ELISA僅可以區分KD > 960 pM的scFv之間的效能。因為所分析的所有scFv均顯示低於960 pM之KD，所以僅可以在L929分析中區分具有不同親和力(但是作用機制類似)的scFv之間的效能。

16-22-H5-sc02及16-22-05-sc04所顯示的阻斷TNF $\alpha$ -TNFR1相互作用之效能比英利昔單抗高出介於2.8倍與3.5倍之間，而在L929分析中之效能明顯更高於英利昔單抗(高13.1及14.6倍)。當比較親本兔IgG之相對 $IC_{50}$ 值(參見表2)與人類化scFv之相對 $IC_{50}$ 值(表7)時，scFv之效能一般略高於親本IgG，但是親和力一般在與親本兔IgG相同的範圍內。因為抗體及scFv之效能係以質量單位比較，所以就各濃度下之價數(TNF $\alpha$ 結合位點)之數目而言，單價scFv相較於重超過五倍但是二價的IgG而言高約2.9倍。結合親和力極高的scFv產生的TNF $\alpha$ 與TNFR1/II相互作用之阻斷更強效，因為親合力之缺乏不再係活性的關鍵。相比之下，在低親和力單價結構域之情況下，公開的內容相反(Coppieters等人 Arthritis & Rheumatism, 2006; 54:1856-1866)。出於以上所提及之原因，抑制ELISA之結果不用於對不同抗體之間的效能進行評級，而是主要用於比較抗體阻斷與TNFR1對比與

TNFR<sub>II</sub>之相互作用的可能性。在兩種TNF $\alpha$ 受體之間，所研究之scFv係以類似的效能阻斷相互作用(表9、圖9及圖10)。

#### 1.2.3.5 目標特異性(與TNF $\alpha$ 結合對比與TNF $\beta$ 結合之選擇性)

藉由評定TNF $\beta$ 相比於TNF $\alpha$ 半數最大限度地抑制TNF $\alpha$ 與各scFv之結合的相對可能性來確認兩個scFv (16-22-H05-sc02及16-22-H05-sc04)對TNF $\alpha$ 優於對TNF $\beta$ 之特異性，且在競爭ELISA中進行量測(亦參見2.1.4)。已由蛋白質之製造商分析了重組性人類TNF $\beta$ 之品質：1)藉由SDS-page及HPLC分析純度，及2)在小鼠L929細胞毒性分析中分析生物活性。如圖11中所示，未標記之TNF $\alpha$ 以在60至260 ng/ml範圍內的IC<sub>50</sub>值阻斷scFv中之每一者與經生物素標記之TNF $\alpha$ 之間的相互作用，而TNF $\beta$ 即使在所測試之最高TNF $\beta$ 濃度(1250  $\mu$ g/ml)下亦不顯示任何顯著作用。因此，所分析之所有scFv均特異性結合至TNF $\alpha$ ，但不結合至其最近的同源物TNF $\beta$ 。TNF $\beta$ 在所測試之濃度下不顯示TNF $\alpha$ 與scFv之結合的任何顯著抑制。因此，半數最大限度地抑制TNF $\alpha$ 結合所需的TNF $\beta$ 濃度應顯著高於分析中所用的最高TNF $\beta$ 濃度(1250  $\mu$ g/ml)。當比較半數最大限度地抑制TNF $\alpha$ 與scFv之結合所需的TNF $\alpha$ 及TNF $\beta$ 之濃度時，就所測試的所有片段而言，與TNF $\alpha$ 之結合優於與TNF $\beta$ 之結合的選擇性顯著高於約5000至20,000倍(亦參見表7)。因此，scFv中之任一者都極不可能出現脫靶結合。

上文所述實驗之結果概述於表7至表9中。

**表7.** 人類化scFv之活體外結合及活性特性.CDR：「CDR移植物」，STR：「結構移植物」。在不同日期用不同批次之抗體片段進行若干次效能分析，且標準差如下：16-22-H05-sc02 (n=3)：相對IC<sub>50</sub>=13.1 ± 1.8且相對IC<sub>90</sub>=12.6 ± 3.5；16-22-H05-sc04 (n=2)：相對IC<sub>50</sub>=14.6 ± 0.6且相對IC<sub>90</sub>=13.1 ± 2.4。

| scFv           | 設計      | 對人類TNF $\alpha$ 之親和力                                 |                                      |           | 對食蟹猴TNF $\alpha$ 之親和力                                |                                      |           | 對恆河猴TNF $\alpha$ 之親和力                                |                                      |           | 效能   | 物種特異性<br>IC <sub>50</sub><br>[ng/mL]    |                            |        | TNF $\beta$ 對比<br>TNF $\alpha$ 之目標選擇性相對IC <sub>50</sub> |             |
|----------------|---------|------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|------|-----------------------------------------|----------------------------|--------|---------------------------------------------------------|-------------|
|                |         | 對人類TNF $\alpha$ 之親和力                                 |                                      |           | 對食蟹猴TNF $\alpha$ 之親和力                                |                                      |           | 對恆河猴TNF $\alpha$ 之親和力                                |                                      |           |      | 物種特異性<br>IC <sub>50</sub><br>[ng/mL]    |                            |        |                                                         |             |
|                |         | k <sub>a</sub><br>(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | k <sub>d</sub><br>(s <sup>-1</sup> ) | KD<br>(M) | k <sub>a</sub><br>(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | k <sub>d</sub><br>(s <sup>-1</sup> ) | KD<br>(M) | k <sub>a</sub><br>(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | k <sub>d</sub><br>(s <sup>-1</sup> ) | KD<br>(M) |      | 相<br>對<br>IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> | 相<br>對<br>IC <sub>90</sub> | 人<br>類 |                                                         | 食<br>蟹<br>猴 |
| 16-22-H05-sc02 | STR     | 9.6E+05                                              | 4.3E-05                              | 4.5E-11   | 4.9E+05                                              | 9.6E-05                              | 2.0E-10   | 6.7E+05                                              | 1.5E-04                              | 2.3E-10   | 13.1 | 12.6                                    | 0.6                        | 2.9    | 3.0                                                     | >> 10,000   |
| 16-22-H05-sc04 | CDR/STR | 6.8E+05                                              | 7.1E-05                              | 1.1E-10   | nd                                                   | nd                                   | nd        | nd                                                   | nd                                   | nd        | 14.6 | 13.1                                    | 0.5                        | 3.5    | 2.9                                                     | >> 10,000   |

\*: IC<sub>50</sub>, 英利普單抗 (ng/mL)/ IC<sub>50, scFv</sub> (ng/mL)

&: IC<sub>90</sub>, 英利普單抗 (ng/mL)/ IC<sub>90, scFv</sub> (ng/mL)

**表8.** 本發明之人類化scFv之規格.

| 表現             |       | 可生產性   |        | 穩定性                             |                |
|----------------|-------|--------|--------|---------------------------------|----------------|
| 表現量            |       | 再摺疊量   |        | 熱去摺疊                            |                |
| [g/L]          | [g/L] | [mg/L] | [mg/L] | 在10 g/L下在4°C (-65、-20)下4週後的單體損失 | 5個凍/融循環後的單體損失  |
| 16-22-H05-sc02 | 0.26  | 29.8   | 29.8   | 71.3                            | 0.2 (0.0, 0.0) |
| 16-22-H05-sc04 | 0.26  | 24.1   | 24.1   | 72.6                            | 0.4 (0.2, 0.1) |

表9. scFv阻斷TNFα-TNFR1及TNFα-TNFR2相互作用之效能.

| scFv           | TNFα-TNFR1相互作用之阻斷               |                                     |                             |                             | TNFα-TNFR2相互作用之阻斷               |                                     |                             |                             |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                | 相對IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> | 相對IC <sub>90</sub> <sup>&amp;</sup> | IC <sub>50</sub><br>[ng/mL] | IC <sub>90</sub><br>[ng/mL] | 相對IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> | 相對IC <sub>90</sub> <sup>&amp;</sup> | IC <sub>50</sub><br>[ng/mL] | IC <sub>90</sub><br>[ng/mL] |
| 16-22-H05-sc02 | 3.5                             | 2.4                                 | 13.9                        | 39.8                        | 5.7                             | 3.3                                 | 20.0                        | 56.9                        |
| 16-22-H05-sc04 | 2.8                             | 2.1                                 | 17.7                        | 45.3                        | 3.5                             | 1.5                                 | 32.6                        | 127                         |

<sup>\*</sup> : IC<sub>50</sub>, 英利昔單抗 (ng/mL)/ IC<sub>50,scFv</sub> (ng/mL)

<sup>&</sup> : IC<sub>90</sub>, 英利昔單抗 (ng/mL)/ IC<sub>90,scFv</sub> (ng/mL)

## 2. 方法

### 2.1 主導表徵分析

#### 2.1.1 結合動力學及物種交叉反應性，藉由SPR

藉由表面電漿子共振(SPR)，使用MASS-1 SPR儀器(Sierra Sensors)量測scFv對人類TNF $\alpha$ 之結合親和力。藉由分析參考抗體抗原相互作用，諸如賽妥珠單抗-TNF $\alpha$ 相互作用，對SPR分析之效能做出合格鑑定。選擇聚乙二醇化Fab片段賽妥珠單抗作為參考，因為其單價結合模式類似於scFv之結合模式。使用與scFv之親和力量測相同的分析設置，測定賽妥珠單抗對TNF $\alpha$ 之親和力值係 $9.94 \times 10^{-11}$  M。此值非常符合所公開的K<sub>D</sub>值 $9.02 \pm 1.43 \times 10^{-11}$  M (BLA賽妥珠單抗；BLA編號：125160；提交日期：2007年4月30日)。

關於scFv之親和力量測，藉由胺偶聯將人類TNF $\alpha$  (Peprotech，目錄號300-01)固定於感測器晶片 (SPR-2親和力感測器，胺，Sierra Sensors) 上以達到50至100 RU之固定量(在SPR分析期間達成之固定量係在40至120 RU之間)。在第一步中，使用僅一個scFv濃度(90 nM)進行scFv之親和力篩選。在第二步中，關於表現最佳的scFv，藉由將六個不同濃度之分析物樣品同時注入MASS-1系統中之八個平行通道中之每一者中，自單注射循環量測單注射循環動力學(Single Injection Cycle Kinetics；SiCK)。關於親和力篩選，將人類化scFv以90 nM之濃度歷經三分鐘注射至流槽中且監測解離，持續12分鐘。關於後續更精確的親和力測定，將在45至1.4 nM範圍內的scFv之兩倍連續稀釋液歷經三分鐘注射至流槽中且使蛋白質與固定於感測器晶片上之TNF $\alpha$ 解離12分鐘。採用MASS-1分析軟體(分析器，Sierra Sensors)，使用一對一朗謬結合模型，計算表觀解離(k<sub>d</sub>)及結

合( $k_a$ )速率常數以及表觀解離平衡常數( $K_D$ )，且基於相對 $\chi^2$ 監控擬合品質，相對 $\chi^2$ 係曲線擬合品質之量度。 $\chi^2$ 值愈小，與一對一朗謬結合模型之擬合愈準確。關於親和力篩選，若針對所分析之濃度， $\chi^2$ 低於10，則認為結果係有效的。在分析若干個scFv濃度之情況下，若所測試之所有濃度之平均 $\chi^2$ 低於10，則認為結果係有效的。所測試之所有scFv均滿足接受準則。

使用與上文關於人類TNF $\alpha$ 所述相同的分析設置且應用相同的品質量度來量測與食蟹猴(Sino Biological，目錄號90018-CNAE)及恆河猴(R&D Systems，目錄號1070-RM-025/CF) TNF $\alpha$  (Peprotech，目錄號315-01A)之物種交叉反應性。關於食蟹猴及恆河猴TNF $\alpha$ ，所達成之固定量分別在50至180 RU及90至250 RU之範圍內。使用在45至1.4 nM之濃度範圍內的兩倍連續稀釋液分析scFv。所測試之所有scFv的平均 $\chi^2$ 值均低於10。

### **2.1.2 L929纖維母細胞中之TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡(藉由scFv中和人類、非人類靈長類動物及TNF $\alpha$ )**

使用小鼠L929纖維母細胞(ATCC/LGC標準，目錄號CCL-1)評定scFv中和重組性人類TNF $\alpha$ 之生物活性的能力。藉由添加1  $\mu$ g/ml放線菌素D使L929細胞敏化發生TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡。將抗TNF $\alpha$ 參考抗體或scFv(3000至0.05 ng/ml)及5 pM重組性人類TNF $\alpha$  (Peprotech，目錄號300-01)之三倍連續稀釋液在室溫下預培育1小時。所用TNF $\alpha$ 濃度(5 pM)誘導次最大L929細胞凋亡(EC<sub>90</sub>)。在添加促效劑/抑制劑混合物之後，培育細胞24小時。藉由比色分析，使用WST-8 (2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑鎢單鈉鹽)細胞增殖試劑(Sigma Aldrich，目錄號96992)測定細胞存活率。WST-8經細胞去氫酶還原為橙

色甲醯產物。甲醯產量與活細胞數成正比。使用四參數對數曲線擬合，使用Softmax資料分析軟體(Molecular Devices)分析資料，且計算將TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡中和50%及90%所需的參考抗體或scFv之濃度(IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>) (亦參見圖7)。為了使得在不同日期或不同分析培養盤上進行的實驗之間的IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值可以直接比較，針對參考抗體英利昔單抗校準IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值。為了控制反應之精確性，雙重複地分析劑量反應曲線。計算各量測點之標準差及CV (CV < 20%)。

使用與上文關於人類TNF $\alpha$ 所述相同的分析設置且應用相同的品質量度來量測與食蟹猴(Sino Biological，目錄號90018-CNAE)及恆河猴(R&D Systems，目錄號1070-RM-025/CF) TNF $\alpha$ 之物種交叉反應性。類似於人類對應物，使用誘導次最大L929細胞凋亡之TNF $\alpha$ 濃度(EC<sub>90</sub>)進行物種交叉反應性測試。來自兩個物種之TNF $\alpha$ 均顯示與人類TNF $\alpha$ 誘導L929小鼠纖維母細胞細胞凋亡非常類似的效能。因此，關於所測試之物種，使用相同濃度之TNF $\alpha$  (5 pM)。在物種交叉反應性測試期間，大多數雙重複量測點之CV低於10%。

### 2.1.3 TNF $\alpha$ 抑制ELISA

使用ELISA評定scFv對配體結合之抑制作用，ELISA係一種單獨再現TNF $\alpha$ 與TNFRI及TNFRII之間的相互作用的生化方法。

關於第一抑制ELISA，將與人類IgG之Fc區(R&D Systems，目錄號372-RI)融合的TNFRI之細胞外域以0.5  $\mu$ g/ml之濃度塗佈於96孔Maxisorp ELISA上。關於第二抑制ELISA，以2  $\mu$ g/ml之濃度塗佈與人類IgG之Fc區(R&D Systems，目錄號726-R2)融合的TNFRII之細胞外域。兩個分析之所有後續步驟係相同的。為了偵測TNF $\alpha$ 與TNFRI及TNFRII之結合，在

TNF $\alpha$ 使用之前，對其進行生物素標記。經生物素標記之人類TNF $\alpha$  (960 pM, 50 ng/ml)首先與經過3倍連續稀釋之人類化抗TNF $\alpha$  scFv及英利昔單抗(10,000 ng/ml至0.2 ng/ml)一起在室溫下培育1小時。將TNF $\alpha$ /抗體片段混合物轉移至TNF受體固定之培養盤中且在室溫下與結合生物素之抗生蛋白鏈菌素-HRP (SDT試劑，目錄號SP40C)一起培育20分鐘之後偵測未阻斷之TNF $\alpha$ 與所固定之TNF $\alpha$ 受體的結合。添加3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)受質，產生比色讀出，其與TNF $\alpha$ 與TNFR I及TNFR II之結合成比例。在用於競爭ELISA中之前，在L929分析中確認經生物素標記之TNF $\alpha$ 之生物活性。經生物素標記之TNF $\alpha$ 之EC<sub>50</sub>類似於未標記之TNF $\alpha$ 之EC<sub>50</sub>(資料未示出)。類似於上文所述之L929分析，使用四參數對數曲線擬合，使用Softmax資料分析軟體(Molecular Devices)分析資料，且計算將TNF $\alpha$ 及TNFR之相互作用抑制50%及90%所需的scFv之濃度(IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>)。為了使得在不同日期或不同分析培養盤上進行的實驗之間的IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值可以直接比較，針對參考抗體英利昔單抗校準IC<sub>50</sub>及IC<sub>90</sub>值。

為了控制反應之精確性，雙重複地分析劑量反應曲線。計算各量測點之標準差及CV (CV < 25%)。

#### 2.1.4 目標特異性

為了確認抗TNF $\alpha$  scFv之特異性，評定與大多數同源家族成員TNF $\beta$ 之結合。藉由競爭ELISA分析未標記之TNF $\beta$  (Peprotech, 目錄號300-01B)及TNF $\alpha$  (Peprotech, 目錄號300-01)抑制經生物素標記之TNF $\alpha$ 與scFv之相互作用的潛能。為此目的，將scFv以1  $\mu$ g/ml之濃度塗佈於96孔Maxisorp ELISA培養盤上。使用如上所述之結合生物素之抗生蛋白鏈菌素-HRP (SDT試劑，目錄號SP40C)偵測經生物素標記之TNF $\alpha$  (75 ng/ml)

與所塗佈之 scFv 在經過 5 倍連續稀釋之未標記之 TNF $\alpha$  (50  $\mu$ g/ml - 0.00013  $\mu$ g/ml) 或 TNF $\beta$  (1250  $\mu$ g/ml - 0.00013  $\mu$ g/ml) 存在下的結合。關於與 TNF $\alpha$  之劑量-反應曲線，使用四參數對數曲線擬合，使用 Softmax 資料分析軟體 (Molecular Devices) 分析資料，且計算將經生物素標記之 TNF $\alpha$  與所塗佈之 scFv 之相互作用阻斷 50% 所需的未標記之 TNF $\alpha$  之濃度 (IC<sub>50</sub>)。TNF $\beta$  對經生物素標記之 TNF $\alpha$  與 scFv 之間的相互作用不顯示任何顯著抑制 (亦參見圖 11)。為了定量 TNF $\beta$  相比於 TNF $\alpha$  抑制 TNF $\alpha$  與各 scFv 之結合的相對潛能，計算 TNF $\beta$  相對於 TNF $\alpha$  抑制相互作用之 IC<sub>50</sub>。因為在以比 TNF $\alpha$  之 IC<sub>50</sub> 高約 5,000 至 20,000 倍的濃度使用 TNF $\beta$  時未觀察到顯著抑制，所以確定與 TNF $\alpha$  之結合優於與 TNF $\beta$  之結合的選擇性顯著高於 5,000 至 20,000 倍。為了控制反應之精確性，雙重複地分析劑量反應曲線。計算各量測點之標準差及 CV (對於所測試之 TNF $\alpha$ / $\beta$  濃度中除了一個濃度外的所有濃度而言，CV < 25%)。所有 scFv 均滿足此準則。

## 2.2 CMC 分析

### 2.2.1 還原性 SDS-PAGE

十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 係一種用於定性表徵蛋白質及控制蛋白質純度的分析技術。根據美國藥典 (*United States Pharmacopeia* ; USP) (USP 第 1056 章)，分析型凝膠電泳係一種用於鑑別及評定藥物中之蛋白質之均一性的恰當且常規的方法。

該方法係用於對來自大腸桿菌溶解產物之 scFv 產物之量進行定量，從而推導出醱酵後的表現量。該方法之另一應用係基於測試物質之分子量相對於理論值證實測試物質之身分。出於支持性目的，此方法係用於相對於製程相關雜質 (宿主細胞蛋白質) 及產物相關雜質 (降解產物或加合物) 定

量測試樣品之純度。

用自Bio-Rad Laboratories Inc.獲得之市售預鑄凝膠系統「Mini Protean」進行SDS-PAGE分析。在「任何kD」拆分凝膠(#456-9036)上分析人類化scFv。在兩種情況下均使用由製造商推薦的Tris/甘胺酸緩衝劑系統。關於蛋白質條帶之偵測，採用SimplyBlue™染色溶液(Life Technologies Corp., #LC6060)進行庫馬斯染色或採用Pierce銀染色套組(Thermo Fisher Scientific Inc., #24612)進行銀染色。關於染色程序，遵循各別供應商之方案。

用文件記錄系統ChemiDoc XRS系統(Bio-Rad Laboratories Inc., #170-8265)及軟體Image Lab 4.0.1版(Bio-Rad Laboratories Inc., # 170-9690)進行染色蛋白質凝膠之文件記錄及分析。

#### 溶解產物樣品之效價測定

SDS-PAGE允許特異性偵測宿主細胞蛋白質混合物中之相關蛋白質。在每個凝膠上包括在該方法之線性範圍(其提前測定)內的參考標準稀釋系列。條帶強度(藉由密度測定法量測)對比參考標準之標稱濃度的線性回歸用於計算標準曲線，其又用於外推樣品中之scFv含量。

在不同稀釋液(至少1:10於稀釋緩衝劑中)中加載未知產物濃度之溶解產物樣品，得到至少一個在該方法之線性範圍內的scFv濃度。基於scFv之所量測的條帶強度計算產物量且使用樣品製備之稀釋係數確定濃度。對標準曲線之線性範圍內的所有樣品的值取平均。

作為溶解產物樣品定量方法之適用性的額外測試，藉由向溶解產物樣品中外加已知量的參考標準進行抑制/增強測試。計算在稀釋緩衝劑中1:10之樣品稀釋度下的加標回收率，得到值95.4%，其與稀釋緩衝劑中之

參考標準所觀察到精確性水準相同。因此，在細胞溶解產物中未觀察到顯著的基質干擾且認為該方法適合於定量細胞溶解產物中之scFv含量。

### 蛋白質純度及含量

為了顯示該方法用於測定測試樣品之含量且從而亦測定純度的適用性，(藉由鑑別蛋白質條帶)目測確定參考scFv在0.02 µg之標稱加載量下的偵測下限(LOD)，各別泳道之強度直方圖之評估在此加載量下顯示約2之信雜比。另外，藉由用密度測定法分析主要條帶確定定量線性範圍。

用線性回歸擬合資料，產生0.9998之決定係數( $R^2$ )，由此指示良好的擬合品質。除了整體擬合品質之外，測定各個別資料點之相對誤差，以文件記錄該方法在所選範圍中之適用性。所有資料點之相對誤差均低於10%，指示此方法之良好準確性。

### 2.2.2 在280 nm下之UV吸光度

該方法在280 nm下之UV吸光度係如USP第1057章中所概述之總蛋白質分析。蛋白質溶液因為存在芳族胺基酸，所以吸收280 nm波長下之UV光。UV吸光度係蛋白質中之酪胺酸及色胺酸殘基之含量的函數且與蛋白質濃度成比例。未知蛋白質溶液之吸光度可以根據USP第851章，根據光譜學，藉由應用比爾定律(Beer's law)： $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ 來測定，其中吸光度(A)等於莫耳吸收率( $\epsilon$ )、吸收路徑長度及物質濃度之乘積。scFv之莫耳吸收率用軟體Vector NTI® (Life Technologies Corporation)計算。

UV吸光度之量測係用配備有Nanoquant plate的Infinity讀取器M200 Pro (Tecan Group Ltd.)進行。蛋白質樣品之吸光度係在280 nm及310 nm下量測，其中後一個波長充當參考信號，由280 nm信號減去參考信號。為了顧及樣品基質之潛在干擾，對各量測進行空白扣除。使用所得蛋白質

樣品之最終吸光度信號，使用朗伯-比爾定律(Lambert-Beer's law)計算蛋白質濃度。

所有量測係在由儀器規格指定的範圍內在0-4 OD之量測範圍內進行，其中製造商指定< 1%之再現性及< 3%之均一性。

### 2.2.3 SE-HPLC (尺寸排阻高壓液相層析)

SE-HPLC係一種基於固體固定相及液體移動相的分離技術，如USP第621章所概述。此方法利用疏水性固定相及水性移動相，基於分子之大小及形狀來分離分子。分子之分離發生在特定管柱之空隙體積( $V_0$ )與總滲透體積( $V_T$ )之間。藉由SE-HPLC之量測係基於Chromaster HPLC系統(Hitachi High-Technologies Corporation)進行的，其配備有自動化樣品注射及偵測波長設定為280 nm之UV偵測器。用軟體EZChrom Elite(Agilent Technologies，版本3.3.2 SP2)控制設備，該軟體亦支持所得層析圖之分析。蛋白質樣品藉由離心澄清且在注射之前在自動進樣器中保持在6°C的溫度下。關於scFv樣品之分析，採用管柱Shodex KW402.5-4F(Showa Denko Inc., #F6989201)與標準化緩衝鹽水移動相(50 mM乙酸鈉 pH 6.0、250 mM氯化鈉)，建議流動速率係0.35 mL/min。每次注射，目標樣品加載量係5 µg。藉由UV偵測器在280 nm之波長下偵測樣品且藉由適合軟體套件記錄資料。在 $V_0$ 至 $V_T$ 之範圍內分析所得層析圖，因此不包括溶離時間>10 min之基質相關峰。

為了確保該方法之中間精確性，常規地在各HPLC程序開始時及結束時量測參考標準。用於此系統適用性測試之參考標準係已製造成一批且等分以用於各量測時間點的scFv。

### 2.2.4 DSF (差示掃描螢光測定法)

方法DSF係一種用於量測溫度依賴性蛋白質去摺疊的非藥典方法。用MX3005P qPCR機器(Agilent Technologies)藉由DSF量測熱去摺疊溫度，該機器係由MX Pro套裝軟體(Agilent Technologies)控制且配備有設定在492/610 nm下的激勵/發射濾光片。在Thermo fast 96白色PCR培養盤(Abgene; #AB-0600/W)中建立反應。關於蛋白質去摺疊之偵測，以1:1,000之最終稀釋度使用染料SYPRO橙(Molecular Probes; # S6650)之市售儲備溶液。關於去摺疊量測，將蛋白質樣品在標準化緩衝鹽水溶液中稀釋至50 µg/mL之最終濃度。藉由以下溫度程式進行熱去摺疊：在25°C下開始，以1°C步長，30秒之持續時間逐漸升高至96°C。在溫度程式期間，記錄各樣品之螢光發射。用套裝Microsoft Excel模板(Niesen, Nature Protocols 2007, 第2卷第9期)處理且評估所記錄的原始資料，且使用程式GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.)，用波茲曼方程式擬合螢光資料，以獲得轉變中點( $T_m$ )。

為了產生可靠且穩健的去摺疊中點量測，進行至少雙重複量測。關於資料品質，僅考慮擬合優度( $R^2$ ) > 0.9900且 $T_m$ 之95%信賴區間小於0.5%的量測。

關於中間精確性之評定，每一次量測均包括參考標準(已知經表徵之scFv)，從而允許比較不同日期之分析效能。

### 2.2.5 穩定性研究

為了評定不同scFv構築體作為此等分子之可發展性之讀出的穩定性，設計一個短期穩定性研究方案。將蛋白質構築體在單一緩衝鹽水調配物(參見上文)中濃縮至1及10 mg/mL之目標濃度。藉由SE-HPLC測定單體含量，以確認純度超過> 95%之成功準則。隨後將蛋白質樣品在< -65、

-20、4及37°C下儲存4週持續時間，且在各個時間點分析等分試樣。主要讀出係SE-HPLC之分析，其允許定量較高分子量的可溶性寡聚物及聚集體。作為支持性量測，藉由在280 nm下之UV吸光度測定蛋白質含量，其提供在儲存階段期間是否因為沈澱而損失了大量蛋白質的指示。關於儲存，使用螺旋蓋試管(Sarstedt，目錄號72.692.005)，且每等分試樣之填充量係30-1500 µg。另外藉由SDS-PAGE測定純度，其指示構築體在降解或共價多聚化方面之穩定性。

### 實例3：人類化雙功能抗體及IgG之產生

藉由以VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA組態配置可變域來設計單鏈雙功能抗體構築體。在此等構築體中，VLA及VHA及VLB及VHB結構域共同形成TNF $\alpha$ 之結合位點。連接可變域之肽連接子L1至L3係由甘胺酸/絲胺酸重複序列構築。兩個短連接子L1及L3係由單一G<sub>4</sub>S重複序列組成，而長連接子L2係由序列(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>組成。編碼人類化可變域之核苷酸序列(實例2；1.2.1.)係重新合成且選殖至基於pET26b(+)骨架(Novagen)的經調適載體中用於大腸桿菌表現。表現及純化係如實例2；1.2.1中關於scFv所描述般進行。

藉由將可變域選殖至適合短暫性異源表現的哺乳動物表現載體中來構築人類化IgG，該載體含有前導序列及相應的恆定域，例如pFUSE-rIgG載體(Invivogen)。功能性IgG之短暫表現係藉由編碼重鏈及輕鏈之載體的共轉染，藉由FreeStyle™ MAX系統在CHO S細胞中進行。在培養若干天之後，回收抗體分泌細胞之上清液進行純化。隨後藉由蛋白A瓊脂糖凝膠(GE Healthcare)對所分泌之IgG進行親和力純化。藉由SDS-PAGE、280 nm下之UV吸光度及SE-HPLC分析溶離部分。

使用如在實例2中在2.1.1)下所述之Biacore儀器測定抗體分子之親和力。

表10

|      | $k_a (M^{-1}s^{-1})$ | $k_d (s^{-1})$        | $K_D (M)$              |
|------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| IgG  | $1.90 \times 10^6$   | $7.92 \times 10^{-5}$ | $4.17 \times 10^{-11}$ |
| scDb | $9.40 \times 10^5$   | $2.02 \times 10^{-5}$ | $2.15 \times 10^{-11}$ |
| scFv | $8.93 \times 10^5$   | $3.38 \times 10^{-5}$ | $3.79 \times 10^{-11}$ |

在L929分析(該方法描述於實例2中2.1.2下)中測定抗體分子之效能。

表11

|      | 效能 $IC_{50}$ (nM) |
|------|-------------------|
| IgG  | 0.02              |
| scDb | 0.01              |
| scFv | 0.03              |

實例4：測定TNFα結合之化學計量

使用SE-HPLC測定16-22-H5與TNFα之結合化學計量。16-22-H5-scFv及TNFα係以兩種不同的莫耳比培育，亦即以1:1及4.5:1之莫耳比。因為TNFα以三聚體形式存在於溶液中，所以所指示之莫耳比係指TNFα<sub>三聚體</sub>。因此，以4.5:1之比率，16-22-H5-scFv過量且將佔據所有的TNFα<sub>三聚體</sub>結合位置，得到1個TNFα<sub>三聚體</sub>與3個scFv之複合物。然而，在等莫耳條件下，沒有足夠的scFv來飽和所有3個理論TNFα結合位點。因此，預期亦存在結合有不到3個scFv之複合物變體。將TNFα及16-22-H5-scFv在室溫下培育2小時以允許複合物形成。隨後使樣品在4℃下離心10分鐘。在SE-HPLC上分析10 μL各樣品。用50 mM磷酸鹽緩衝劑pH 6.5、300 mM NaCl作為溶離劑，以0.35 mL/min之流動速率進行SE-HPLC分析。在280 nm之波長下偵測經溶離蛋白質峰。提前使用來自GE Healthcare (LMW, HMW)之凝膠過濾校準套組校準管柱以便測定表觀分子量。

圖12之下圖顯示等莫耳量之scFv及TNF $\alpha$ 的溶離概況，其上覆蓋有單獨的TNF $\alpha$ 三聚體及單獨的scFv的概況。因為TNF $\alpha$ 在溶液中三聚化，所以理論上在各三聚體上存在三個等效的scFv結合位點且因此scFv分子受到限制。在此等條件下，鑑別所有三種複合物物種(3:1、2:1、1:1)。圖12之上圖顯示scFv過量情況下之複合物的溶離概況。過剩的未結合scFv在預計的滯留時間溶離。TNF $\alpha$ 峰關於複合物形成而定量地消耗且完全消失。此複合物之峰朝著較低的滯留時間偏移，且與等莫耳設置之最大分子量的峰之滯留時間非常相關。出於此原因，可得出以下結論：若存在過量scFv，則TNF $\alpha$ 上的所有可用的結合位點均被scFv佔據，且因此結合化學計量係3:1 (scFv:TNF $\alpha$ )。

進一步關於此等定性觀察結果，亦基於如藉由SE-HPLC所測定的16-22-H5-scFv:TNF $\alpha$ 複合物之表觀MW計算表觀結合化學計量。基於滯留時間，計算出表觀MW係139.7 kDa。根據以下方程式(1)，計算出表觀結合化學計量係3.3。此與TNF $\alpha$ 三聚體上scFv可用三個等效的結合位點理論數及測定3:1結合化學計量的以上觀察結果非常相關。

$$\text{方程式(1): 結合化學計量(scFv:TNF}\alpha\text{)} = \frac{MW(\text{複合物表觀}) - MW(\text{TNF}\alpha\text{理論})}{MW(\text{scFv理論})}$$

MW (複合物表觀)：139.7 kDa

MW (TNF $\alpha$ 理論)：52.2 kDa

MW (scFv理論)：26.5 kDa

#### 實例5：TNF $\alpha$ :抗體複合物之形成(TNF $\alpha$ 之交聯)

在Biacore T200儀器上在含有10 mM HEPES、150 mM NaCl及0.05% Tween之HEPES緩衝劑中測試16-22-H5-scDb同時結合兩個TNF $\alpha$ 分子之能力。使用生物素捕捉套組(GE Healthcare)，根據製造商之說明

書經由經生物素標記之ssDNA寡核苷酸捕捉經生物素標記之TNF $\alpha$  (Acro Biosystems)。以10  $\mu$ L/min之流動速率注入0.25  $\mu$ g/mL經生物素標記之TNF $\alpha$ ，持續3分鐘，達到約200至300 RU (共振單位)之捕捉量。將抗體16-22-H5-scDb及作為對照之16-22-H5-scFv以30  $\mu$ L/min之流動速率以90 nM之濃度注入TNF $\alpha$ 固定表面上，持續2分鐘。在抗體片段結合之後，以30  $\mu$ L/min之流動速率以90 nM注入TNF $\alpha$  (Peprotech)，持續5分鐘。選擇接近結合飽和度之抗體及TNF $\alpha$ 濃度。在25°C下進行量測。圖13說明，二價16-22-H5-scDb能夠同時結合兩個TNF $\alpha$ 分子，而正如所預計的，單價16-22-H5-scFv僅結合至一個TNF $\alpha$ 分子。

此外，在不同比率之TNF $\alpha$ 及16-22-H5抗體形式下使用SE-HPLC評定TNF $\alpha$ -抗體複合物之形成。將16-22-H5-IgG (150 kDa)及16-22-H5-scDb (52 kDa)與TNF $\alpha$  (52 kDa)一起關於結合位點以不同莫耳比(1:3、1:1、3:1)培育。因此，IgG及scDb具有2個結合位點且TNF $\alpha$ 具有3個結合位點。將抗體-TNF $\alpha$ 混合物在37°C下培育至少30分鐘，在室溫下冷卻10分鐘且在2°C-8°C下儲存隔夜。將5至10  $\mu$ L濃度為約1 mg/mL之蛋白質混合物注入至TOSHO TSKgel UP-SW3000管柱上。用150 mM磷酸鹽緩衝劑pH 6.8、100 mM NaCl作為溶離劑，以0.3 mL/min之流動速率進行分析。在214 nm之波長下偵測經溶離蛋白質峰。提前使用BEH450 SEC蛋白質標準混合物(Waters)校準管柱以便測定複合物之近似分子量。圖14A顯示16-22-H5-IgG:TNF $\alpha$ 複合物之形成。 $\geq 600$  kDa之複合物指示由 $\geq 2$ 個TNF $\alpha$ 及 $\geq 3$ 個IgG分子組成的複合物之形成。圖14B顯示16-22-H5-scDb:TNF $\alpha$ 複合物之形成。 $\geq 300$  kDa之複合物指示由 $\geq 2$ 個TNF $\alpha$ 及 $\geq 3$ 個scDb分子組成的複合物之形成。

實例6：抑制細胞增殖

在混合淋巴細胞反應(MLR)中測試不同抗體形式之16-22-H5及阿達木單抗抑制外周血液單核細胞(PBMC)之增殖的能力。將來自2個健康供體之PBMC以1:1之比率在96孔盤中在37°C /5% CO<sub>2</sub>下培養(RPMI1640) 48小時。在活化之後，用抗TNF $\alpha$ 抗體或IgG對照抗體(全部以10  $\mu$ g/mL之最終濃度)在37°C /5% CO<sub>2</sub>下再六重複地處理細胞5天。在培育結束之前24 h，向各孔中添加BrdU (20微升/孔)且藉由使用市售細胞增殖ELISA (Roche Diagnostics)量測BrdU吸收來測定增殖。藉由計算經抗體處理之細胞與經絲裂黴素C (25 ng/mL)處理之細胞之間的BrdU吸收比來確定刺激指數。表12及圖15說明，16-22-H5之所有測試的抗體形式均顯著抑制T細胞增殖，與阿達木單抗相當。

表12

|               | 濃度<br>( $\mu$ g/ml) | 刺激指數  |     |
|---------------|---------------------|-------|-----|
|               |                     | 平均值   | SD  |
| IgG對照         | 10                  | 5.2   | 0.5 |
| 阿達木單抗         | 10                  | 2.6** | 0.6 |
| 16-22-H5-IgG  | 10                  | 2.5** | 0.6 |
| 16-22-H5-scDb | 10                  | 4.1*  | 0.7 |
| 16-22-H5-scFv | 10                  | 4.0** | 0.6 |

\*p < 0.05；\*\*p < 0.01

實例7：抑制LPS誘導之細胞介素分泌

將RPMI1640中之CD14<sup>+</sup>單核球接種至96孔盤中且在含濕氣培育箱中在37°C /5% CO<sub>2</sub>下培育16 h。隨後採用抗TNF $\alpha$ 抗體或IgG對照抗體，使用在2至2000 ng/mL範圍內的最終抗體濃度雙重複地處理細胞1 h。將單核球用細胞培養基洗滌3次且隨後與LPS (100 ng/mL)一起在37°C /5% CO<sub>2</sub>下培育4 h。使用市售ELISA套組(R&D Systems)測定細胞培養上清液中之IL-1 $\beta$ 及TNF $\alpha$ 濃度。結果顯示於表13及表14以及圖16A及圖16B中。使用

四參數對數曲線擬合測定IC<sub>50</sub>。關於IL-1β之分泌，16-22-H5-IgG、16-22-H5-scDb、16-22-H5-scFv及阿達木單抗之IC<sub>50</sub>值概述於下表13中。

表13. IL-1β之分泌

|               | IC <sub>50</sub> (pg/mL) | IC <sub>50</sub> (nM) |
|---------------|--------------------------|-----------------------|
| 阿達木單抗         | 121.3                    | 0.81                  |
| 16-22-H5-IgG  | 81.55                    | 0.54                  |
| 16-22-H5-scDb | 30.51                    | 0.59                  |
| 16-22-H5-scFv | 16.98                    | 0.65                  |

關於TNFα分泌，16-22-H5-IgG、16-22-H5-scDb、16-22-H5-scFv之所測定的IC<sub>50</sub>值概述於表14中。

表14. TNFα之分泌

|               | IC <sub>50</sub> (pg/mL) | IC <sub>50</sub> (nM) |
|---------------|--------------------------|-----------------------|
| 阿達木單抗         | 174.0                    | 1.16                  |
| 16-22-H5-IgG  | 120.5                    | 0.80                  |
| 16-22-H5-scDb | 17.18                    | 0.33                  |
| 16-22-H5-scFv | 13.48                    | 0.52                  |

表15. Vκ1共同序列(重排)

|       | 根據Kabat之位置： | SEQ ID NO: | 序列                              |
|-------|-------------|------------|---------------------------------|
| 構架I   | 1至23        | 56         | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC         |
| 構架II  | 35至49       | 57         | WYQQKPGKAPKLLIY                 |
| 構架III | 57至88       | 58         | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC |

表16：基於Vλ生殖系之構架IV序列

| SEQ ID NO: | 序列         |
|------------|------------|
| 59         | FGTGTKVTVL |
| 60         | FGGGTKLTVL |
| 61         | FGGGTQLIIL |
| 62         | FGSGTKVTVL |

<110> 瑞士商狄洛茲藥廠公司 (Tillotts Pharma AG)

<120> 抗TNF $\alpha$ 抗體及其功能性片段

<130> PW000278TIL

<150> EP16160907.8

<151> 2016-03-17

&lt;160&gt; 62

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$  1

|                       |    |
|-----------------------|----|
| $\langle 210 \rangle$ | 1  |
| $\langle 211 \rangle$ | 11 |

<212> PRT

<213> 人口序列

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> CDR

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> MISC FEATURE

<222> (7)...(7)

<223> Xaa: Phe、Ser、Gly或Tyr

<220>

<221> MISC FEATURE

$\langle 222 \rangle$  (8), (8)

<223> Xaa係Ser、Asn、Thr或Arg

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> MISC\_FEATURE

$\langle 222 \rangle$  (9) .. (9)

<223> Xaa除Gly、Tyr、Ala、Asn或Ser

<400> 1

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala  
1                    5                    10

<210> 2

 $\langle 211 \rangle$  7

<212> PRT

<213> 人口序列

$\langle 220 \rangle$

<223> CDR

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) . . (1)  
<223> Xaa條Gly、Arg或Gln

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) . . (4)  
<223> Xaa條Lys或Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) . . (6)  
<223> Xaa條Ala或Glu

<400> 2  
  
Xaa Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser  
1 5

<210> 3  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 入口序列

<220>  
<223> CDR

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) . . (6)  
<223> Xaa條Ser或Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) . . (8)  
<223> Xaa條Ser或Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) . . (9)  
<223> Xaa條Ser、Thr或Asn

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (13) . . (13)  
<223> Xaa條Ser或Phe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (14) . . (14)  
<223> Xaa條Tyr、Phe、Leu或Val

<400> 3

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

<210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa係Asn或Ser

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa係Asn或Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa係Gly、Cys或Ser

<400> 4

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

<210> 5  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa係Ala或Gly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa係Thr或Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11) .. (11)  
<223> Xaa(係Phe或Tyr  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (13) .. (13)  
<223> Xaa(係Asn或His  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (15) .. (15)  
<223> Xaa(係Val或Leu  
  
<400> 5  
  
Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Xaa Ile Xaa Asn Xaa Ala Xaa Ser Xaa Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 6  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人口序列  
  
<220>  
<223> CDR  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa(係Val、Ile或Leu  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa(係Ala或Ser  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa(係Thr或Ser  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa(係Asp或Ser  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) . . (8)  
<223> Xaa(條Trp或Ser)  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) . . (9)  
<223> Xaa(條Gly或Ala)  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11) . . (11)  
<223> Xaa(條Phe、Leu或Tyr)  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (12) . . (12)  
<223> Xaa(條Asp或Asn)  
  
<400> 6  
  
Asp Pro Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Leu  
1 5 10

<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 入口序列

<220>  
<223> CDR

<400> 7  
  
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala  
1 5 10

<210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 入口序列

<220>  
<223> CDR

<400> 8  
  
Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser  
1 5

<210> 9  
<211> 15  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 9

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

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

<220>  
<223> CDR

<400> 10

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

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

<220>  
<223> CDR

<400> 11

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

Gly

<210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 12

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

<210> 13  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 純系16-22-H05-sc02及純系16-22-H05-sc04之人類化VH域

<400> 13  
  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr  
20 25 30  
  
Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
  
Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val  
50 55 60  
  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
  
Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp  
100 105 110  
  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 純系16-22-H05-sc02之人類化VL域  
  
<400> 14

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

Leu Gly

<210> 15  
<211> 257  
<212> PRT  
<213> 人ロ序列  
  
<220>  
<223> 純系16-22-H05-sc02之人類化scFv  
  
<400> 15

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15  
Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser  
20 25 30  
Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

|                         |                                 |                                     |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 50                      | 55                              | 60                                  |
| Gly 65                  | Ser Gly Ser Gly Thr 70          | Glu Phe Thr Leu Thr 75              |
|                         | Ile Ser Gly Leu Gln 80          |                                     |
| Pro Ala Asp Phe 85      | Ala Thr Tyr Tyr Cys 90          | Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser 95      |
| Ser Ser Ser Asp 100     | Gly Ser Tyr Ala Phe 105         | Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr 110     |
| Val Leu Gly 115         | Gly Gly Gly Ser Gly 120         | Gly Gly Ser Gly Gly Gly 125         |
| Gly Ser Gly 130         | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu 135 | Val Glu Ser Gly Gly 140             |
| Gly Leu Val Gln Pro 145 | Gly Gly Ser Leu Arg Leu 150     | Ser Cys Lys Ala Ser 155 160         |
| Gly Ile Asp Phe 165     | Asn Asn Tyr Gly Ile Gly 170     | Trp Val Arg Gln Ala Pro 175         |
| Gly Lys Gly 180         | Leu Glu Trp Ile Thr Tyr 185     | Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile 190     |
| Thr Asn Phe 195         | Ala Asn Ser Val Lys 200         | Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp 205 |
| Asn Ser Lys 210         | Asn Thr Val Tyr Leu 215         | Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 220 |
| Asp Thr Ala Val Tyr 225 | Tyr Cys Ala Arg Asp 230         | Pro Val Tyr Ala Thr Ser 235 240     |
| Ser Gly Tyr Phe 245     | Asp Leu Trp Gly Gln 250         | Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 255     |
| Ser                     |                                 |                                     |

<210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 16

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

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

<220>  
<223> CDR

<400> 17

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 18  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 18

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

<210> 19  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 19

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ser Leu Ala  
1 5 10

<210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 20

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

<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 21

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

<210> 22  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 22

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

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 23

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 24  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 24

Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser  
1 5

<210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 25

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser  
1 5

<210> 26  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 26

Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser  
1 5

<210> 27  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 27

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Phe Phe Ala

1 5 10 15

<210> 28  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 28

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

<210> 29  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 29

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

<210> 30  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 30

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

<210> 31  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 31

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

<210> 32  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 32

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

<210> 33  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 33

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

<210> 34  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 34

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

<210> 35  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 35

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

<210> 36  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 36

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

<210> 37  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 37

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

Gly

<210> 38  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 38

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

Gly

<210> 39  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 39

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Arg Asn Tyr Ala Asn Ser Leu Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 40  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 40

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

Gly

<210> 41  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDR

<400> 41

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

Gly

<210> 42

<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人白序列

<220>  
<223> CDR

<400> 42

Asp Pro Ile Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Leu  
1 5 10

<210> 43  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人白序列

<220>  
<223> CDR

<400> 43

Asp Pro Val Tyr Ser Ser Asp Trp Gly Tyr Phe Asn Leu  
1 5 10

<210> 44  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人白序列

<220>  
<223> CDR

<400> 44

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

<210> 45  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人白序列

<220>  
<223> CDR

<400> 45

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

<210> 46  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人 口 序 列

<220>  
<223> CDR

<400> 46

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

<210> 47  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人 口 序 列

<220>  
<223> CDR

<400> 47

Asp Pro Val Tyr Ala Ser Ser Ser Ala Tyr Tyr Asn Leu  
1 5 10

<210> 48  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人 口 序 列

<220>  
<223> CDR

<400> 48

Asp Pro Leu Tyr Ser Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asn Leu  
1 5 10

<210> 49  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人 口 序 列

<220>  
<223> scFv中之連接子序列

<400> 49

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

Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 50  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 雙功能抗體中之連接子序列

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 51  
<211> 503  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 純系16-22-H05之人類化雙功能抗體

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala  
130 135 140

Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala  
165 170 175

Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser  
180 185 190

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr  
210 215 220

Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
225 230 235 240

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
260 265 270

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser  
275 280 285

Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
290 295 300

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val  
305 310 315 320

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr

325 330 335

Ile Ser Gly Leu Gln Pro Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser  
340 345 350

Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly  
355 360 365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln  
370 375 380

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

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly  
405 410 415

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile  
420 425 430

Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg  
435 440 445

Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met  
450 455 460

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp  
465 470 475 480

Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
485 490 495

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
500

<210> 52  
<211> 221  
<212> PRT  
<213> 人口序列

<220>  
<223> 純系16-22-H05之人類化IgG之輕鏈

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
115 120 125

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

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

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

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

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

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

| 210                                                             | 215 | 220 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| <210> 53                                                        |     |     |
| <211> 452                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人H序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 純系16-22-H05之人類化IgG之重鏈                                     |     |     |
| <400> 53                                                        |     |     |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |
| Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |
| Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |
| Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp |     |     |
| 100 105 110                                                     |     |     |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro |     |     |
| 115 120 125                                                     |     |     |
| Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr |     |     |
| 130 135 140                                                     |     |     |
| Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr |     |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |     |
| Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro |     |     |
| 165 170 175                                                     |     |     |

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

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

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

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

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

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

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

Ser Pro Gly Lys  
450

|       |      |
|-------|------|
| <210> | 54   |
| <211> | 114  |
| <212> | PRT  |
| <213> | 人口序列 |

<220>  
<223> 純系16-22-H05-sc04之人類化VL

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly

<210> 55  
 <211> 257  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 純系16-22-H05-sc04之人類化scFv

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro  
165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile  
180 185 190

Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp  
195 200 205

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser  
225 230 235 240

Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
245 250 255

Ser

<210> 56  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 入口序列

<220>  
<223> 構架I之Vk1共同序列(Kabat位置1-23)

<400> 56

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  
20

<210> 57  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 入口序列

<220>  
<223> 構架II之Vk1共同序列(Kabat位置35-49)

<400> 57

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 58  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人H序列

<220>  
<223> 構架III之Vk1共有序列(Kabat位置57-88)

<400> 58

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 59  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人H序列

<220>  
<223> 構架IV之基於V $\lambda$ 生殖系之序列

<400> 59

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

<210> 60  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人H序列

<220>  
<223> 構架IV之基於V $\lambda$ 生殖系之序列

<400> 60

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

<210> 61  
<211> 10  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 構架IV之基於Vλ生殖系之序列

<400> 61

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu  
1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 構架IV之基於Vλ生殖系之序列

<400> 62

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
1 5 10

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種能夠結合至人類腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )的抗體或其功能性片段，其中該抗體或功能性片段包含(i) V<sub>L</sub>域，其具有如SEQ ID NO: 14中所示胺基酸序列；及(ii) V<sub>H</sub>域，其具有如SEQ ID NO: 13中所示胺基酸序列。

### 【第2項】

如請求項1之抗體或其功能性片段，其中該抗體或功能性片段

(i) 以小於125 pM之解離常數(K<sub>D</sub>)結合至人類TNF $\alpha$ ；

(ii) 與恆河獼猴(*Macaca mulatta*) (恆河猴(Rhesus)) TNF $\alpha$ 及與食蟹獼猴(*Macaca fascicularis*) (食蟹猴(*Cynomolgus*)) TNF $\alpha$ 交叉反應；

(iii) 如藉由L929分析所測定，所具有的抑制TNF $\alpha$ 誘導之細胞凋亡的效能大於英利昔單抗(infliximab)；

(iv) 藉由差示掃描螢光測定法測定，包含具有至少70°C之熔融溫度的可變域，及/或

(v) 能夠以至少2的化學計量(抗體:TNF $\alpha$ 三聚體)結合至人類TNF $\alpha$ 三聚體。

### 【第3項】

如請求項1之抗體或其功能性片段，其係以小於50 pM之K<sub>D</sub>結合至人類TNF $\alpha$ 。

### 【第4項】

如請求項1之抗體或其功能性片段，其中該功能性片段係單鏈可變片段(scFv)。

### 【第5項】

如請求項4之抗體或其功能性片段，其中該scFv具有如SEQ ID NO: 15中所示胺基酸序列。

**【第6項】**

如請求項1之抗體或其功能性片段，其中該抗體係免疫球蛋白G (IgG)。

**【第7項】**

一種核酸，其編碼如請求項1至6中任一項之抗體或其功能性片段。

**【第8項】**

一種載體或質體，其包含如請求項7之核酸。

**【第9項】**

一種細胞，其包含如請求項7之核酸或如請求項8之載體或質體。

**【第10項】**

一種製備如請求項1至6中任一項之抗體或其功能性片段的方法，其包含在培養基中在允許編碼該抗體或功能性片段之該核酸表現的條件下培養如請求項9之細胞，及自該等細胞或自該培養基回收該抗體或功能性片段。

**【第11項】**

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至6中任一項之抗體或其功能性片段，及醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑。

**【第12項】**

如請求項1至6中任一項之抗體或其功能性片段，其係用於治療TNF $\alpha$ 相關病症的方法中。

**【第13項】**

如請求項12之抗體或其功能性片段，其中該TNF $\alpha$ 相關病症係發炎病症。

**【第14項】**

如請求項13之抗體或其功能性片段，其中該發炎病症係胃腸道之發炎病症。

**【第15項】**

如請求項14之抗體或其功能性片段，其中該胃腸道之發炎病症係發炎性腸病。

**【第16項】**

如請求項14之抗體或其功能性片段，其中該胃腸道之發炎病症係克羅恩氏病(Crohn's disease)或潰瘍性結腸炎。

**【第17項】**

一種如請求項1至6中任一項之抗體或其功能性片段之用途，其係用於製備治療TNF $\alpha$ 相關病症的藥物。

**【第18項】**

如請求項17之用途，其中該TNF $\alpha$ 相關病症係發炎病症。

**【第19項】**

如請求項18之用途，其中該發炎病症係胃腸道之發炎病症。

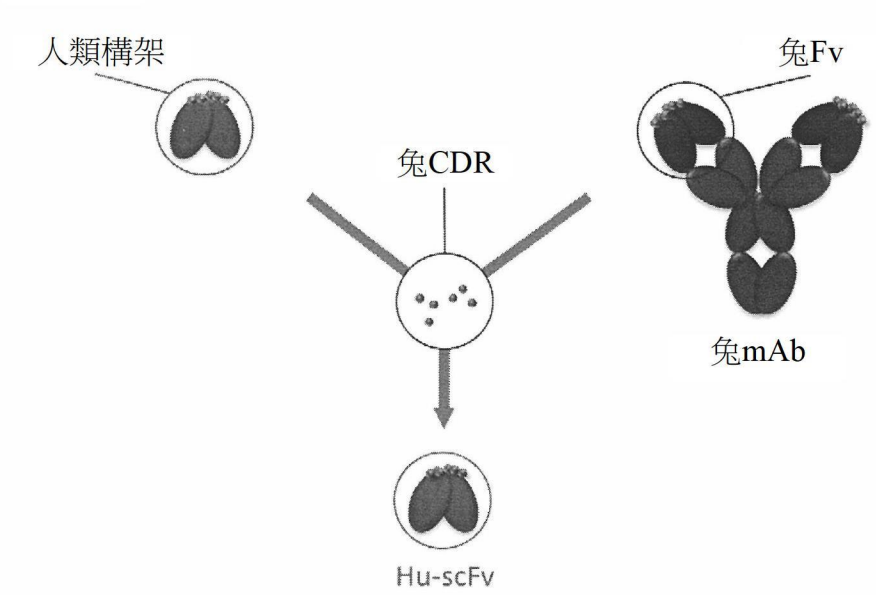
**【第20項】**

如請求項19之用途，其中該胃腸道之發炎病症係發炎性腸病。

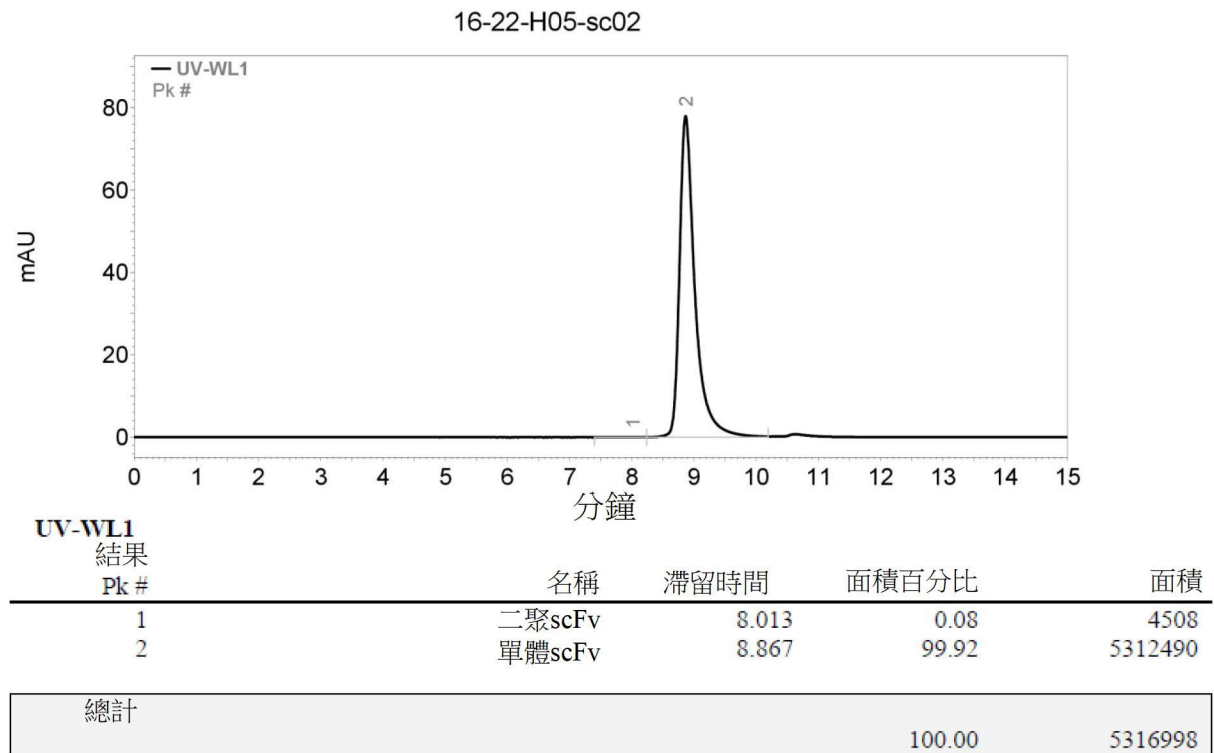
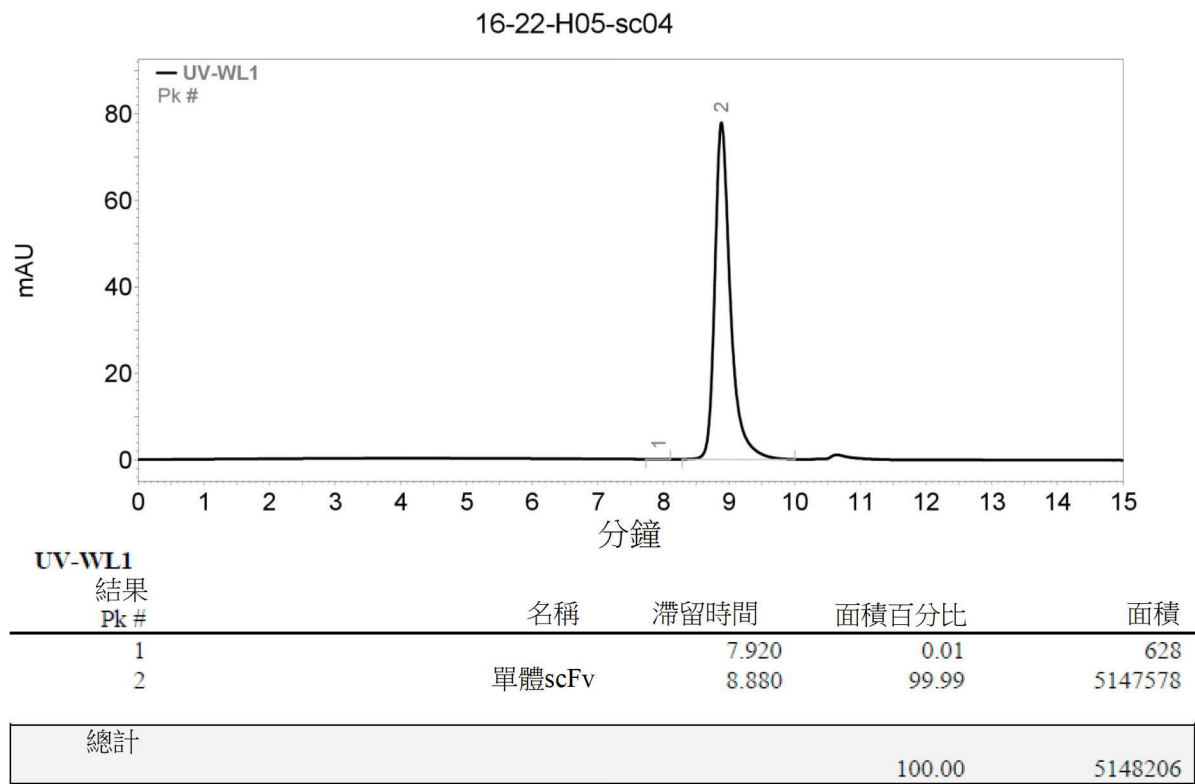
**【第21項】**

如請求項19之用途，其中該胃腸道之發炎病症係克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎。

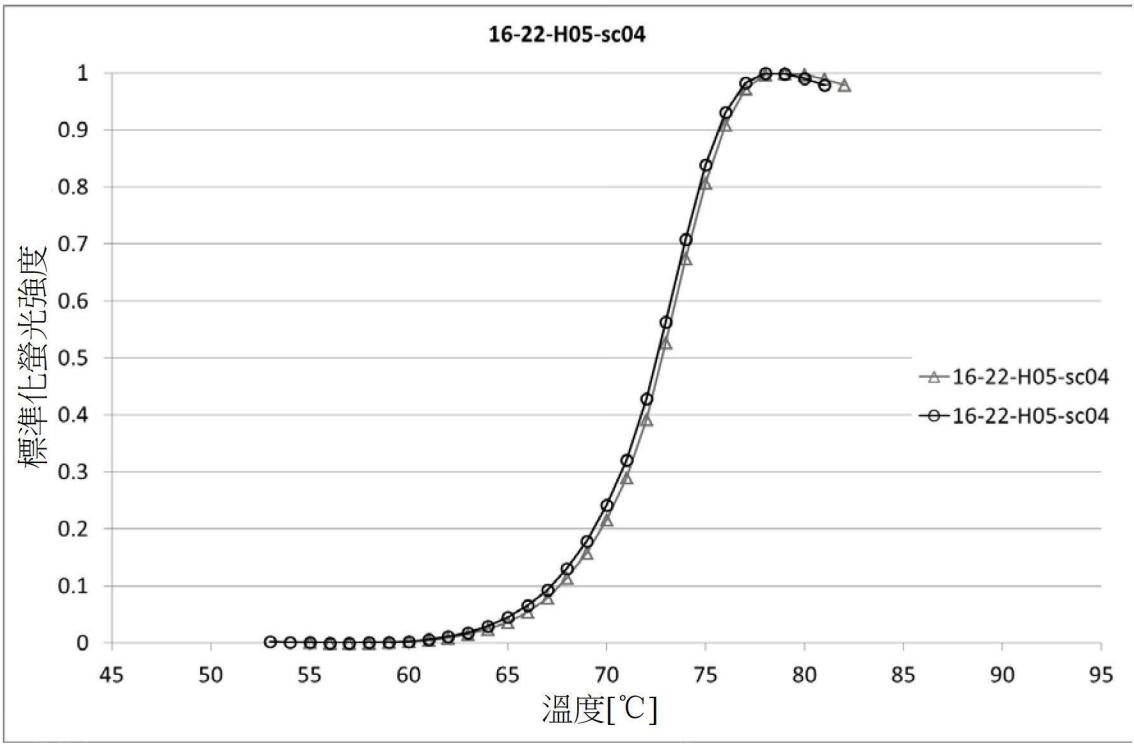
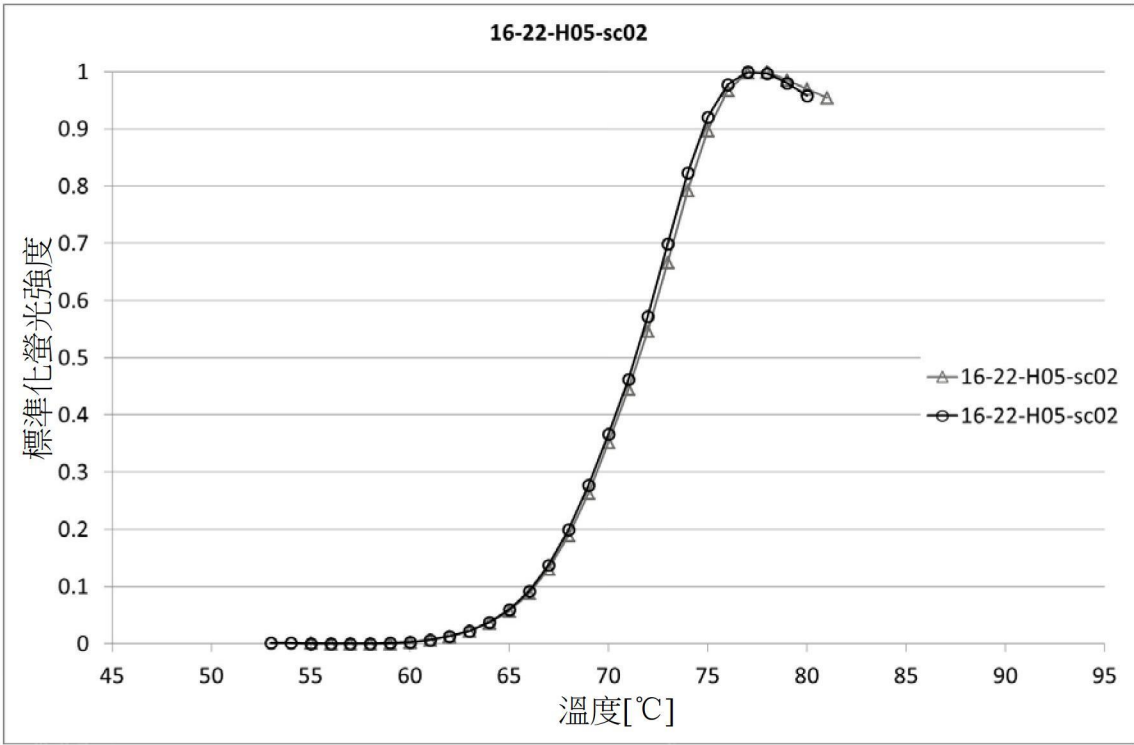
【發明圖式】



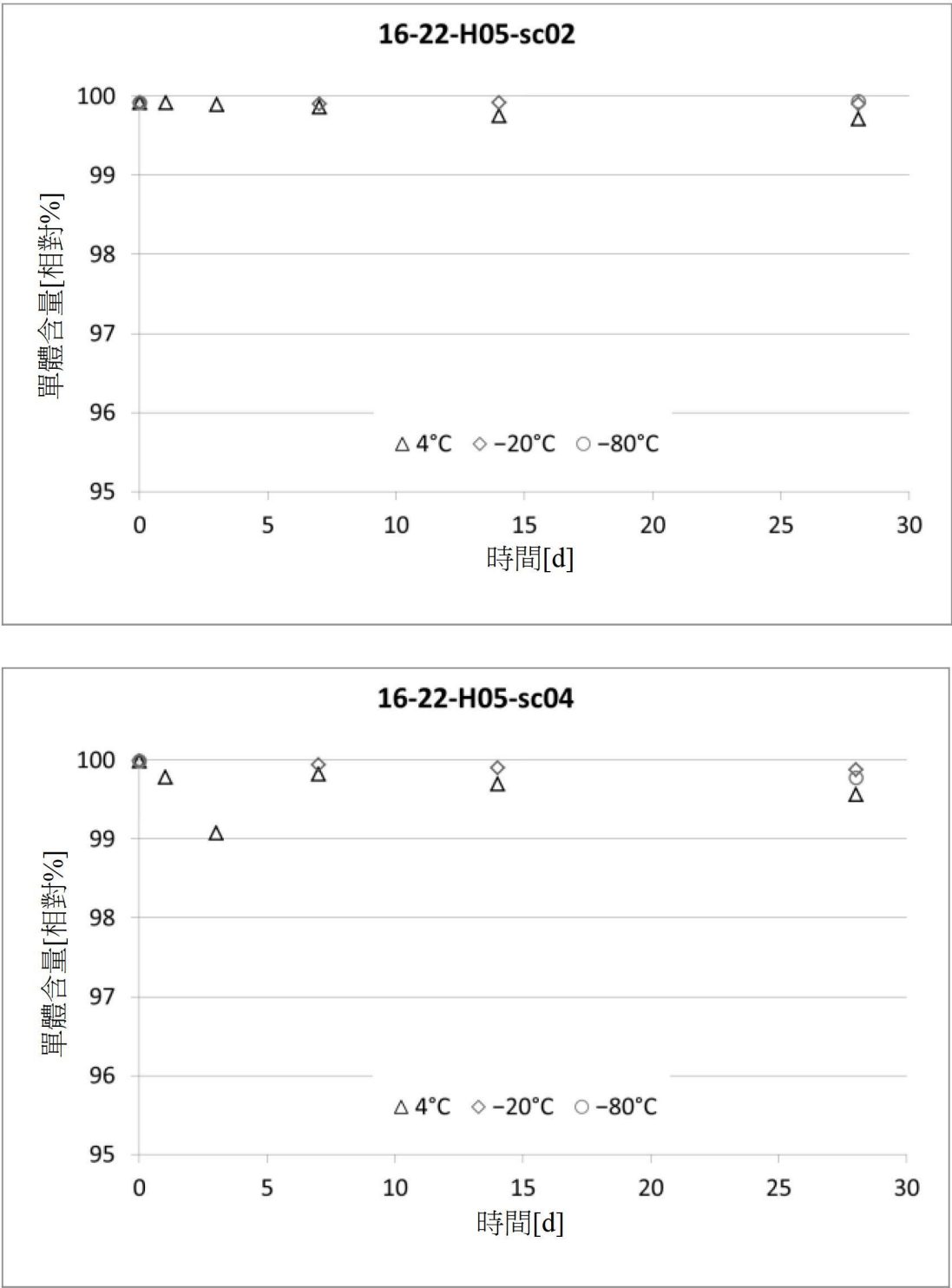
【圖1】



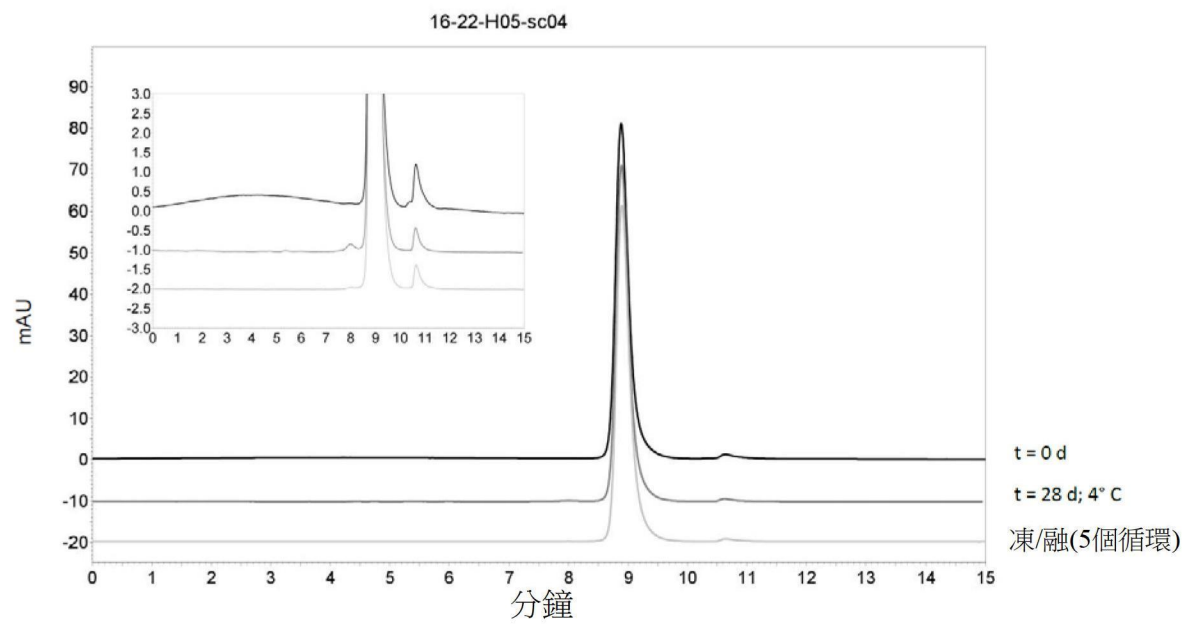
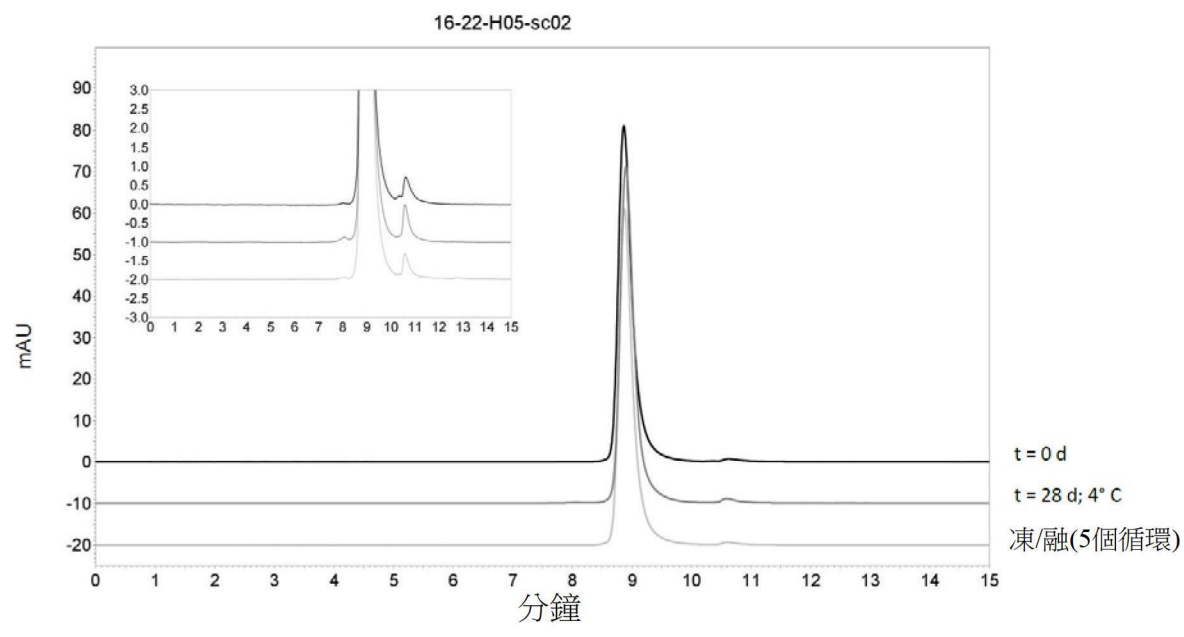
【圖2】



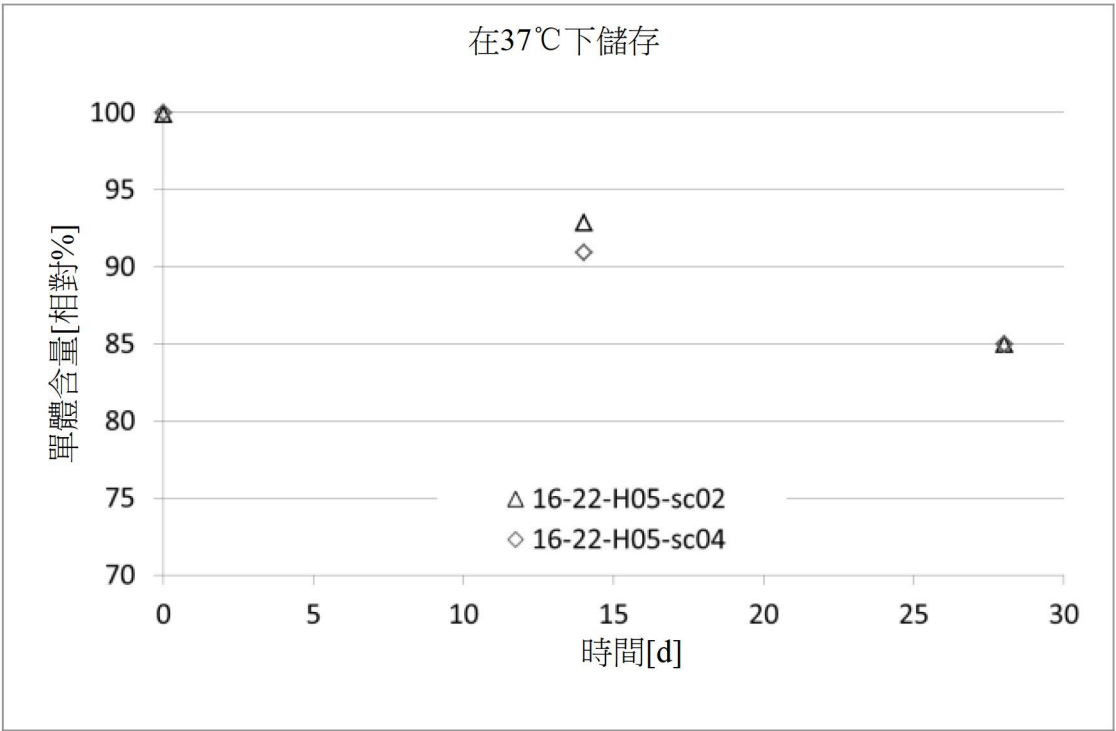
【圖3】



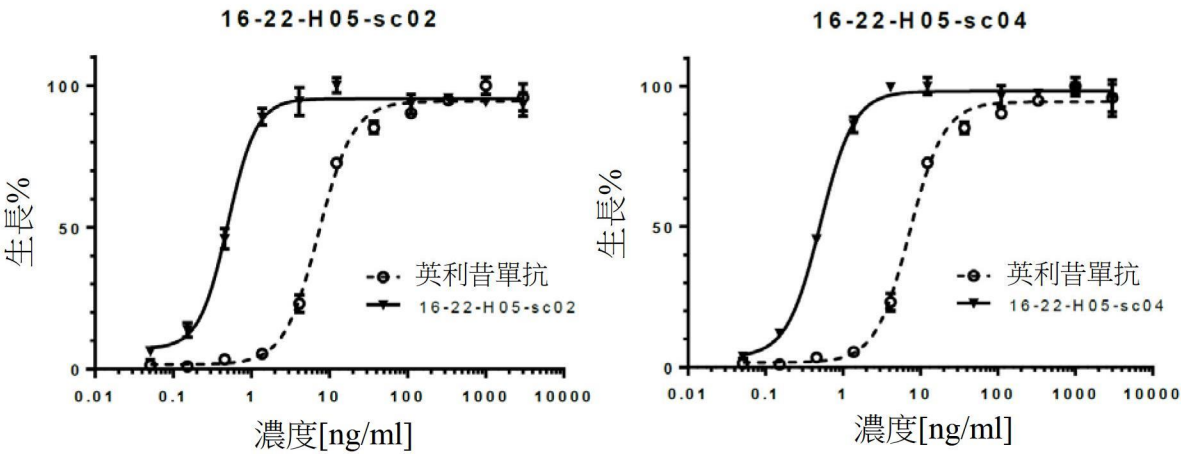
【圖4】



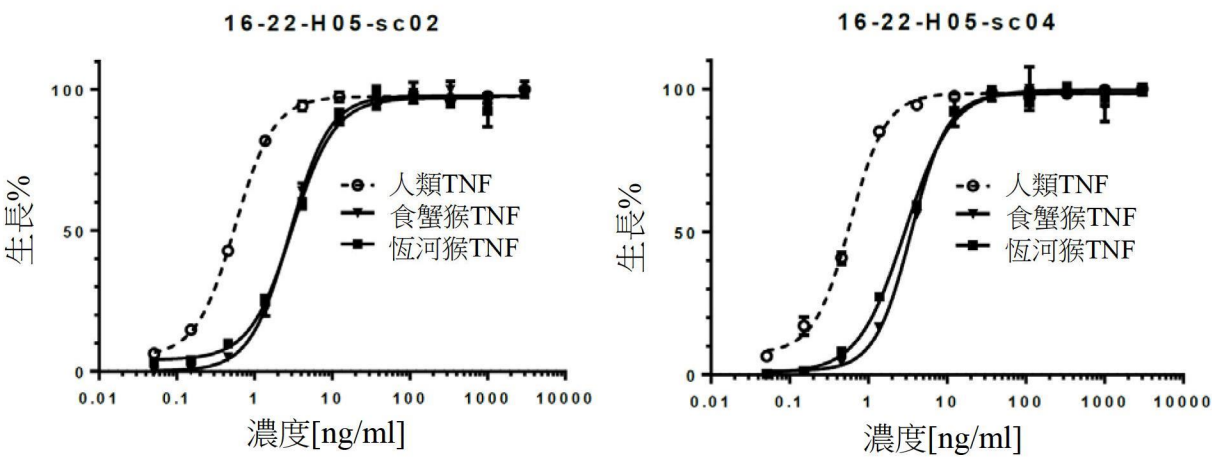
【圖5】



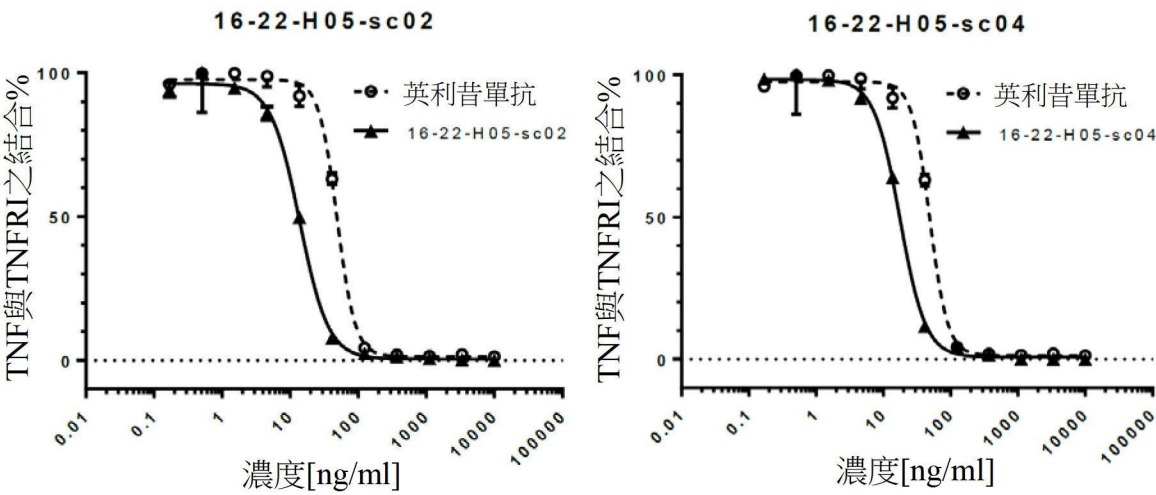
【圖6】



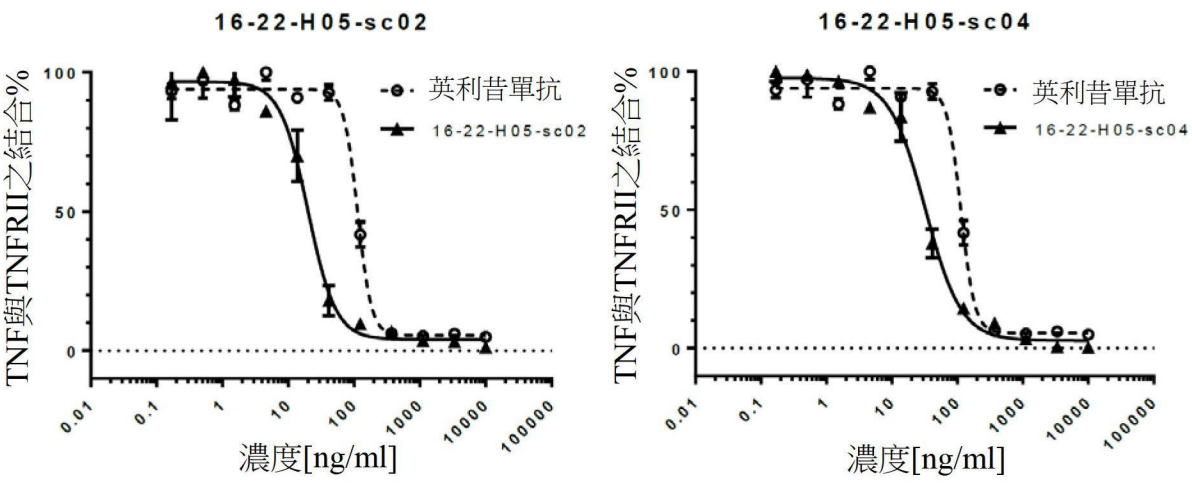
【圖7】



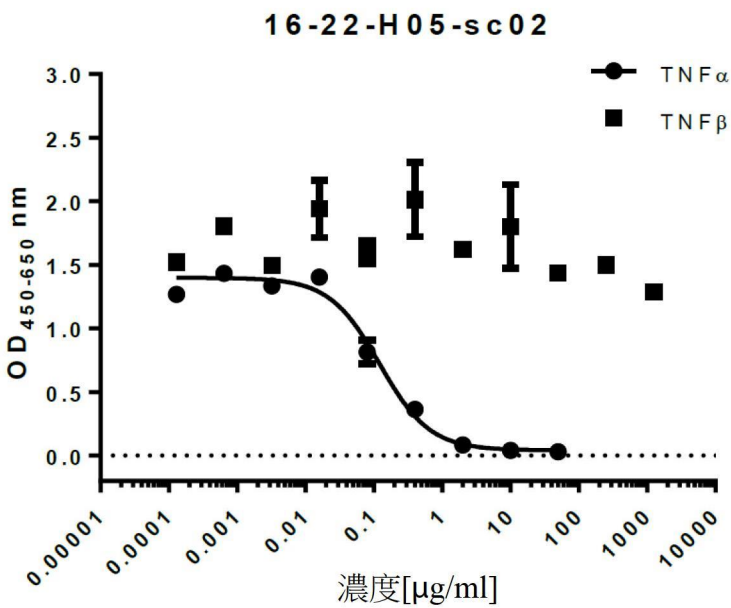
【圖8】



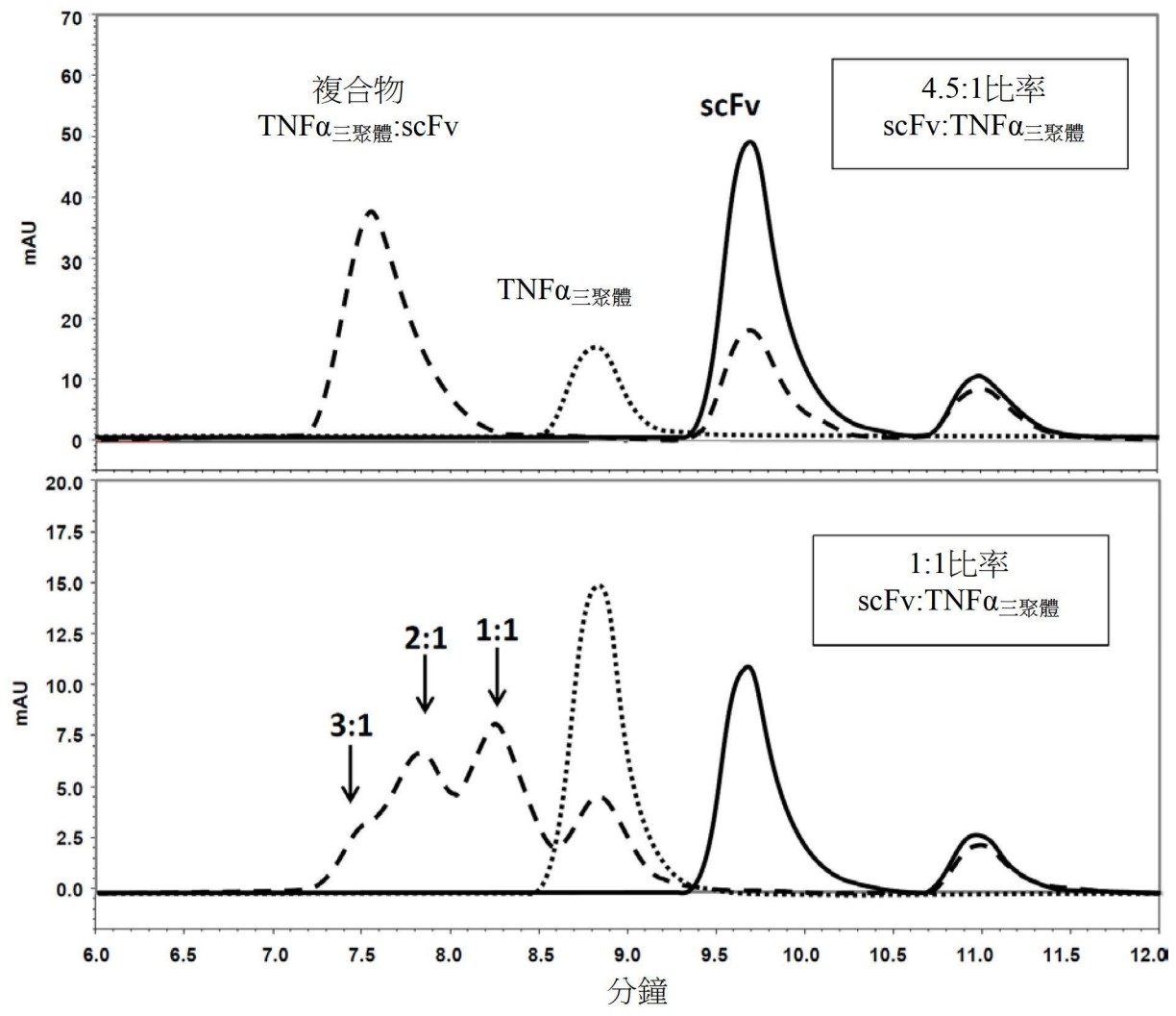
【圖9】



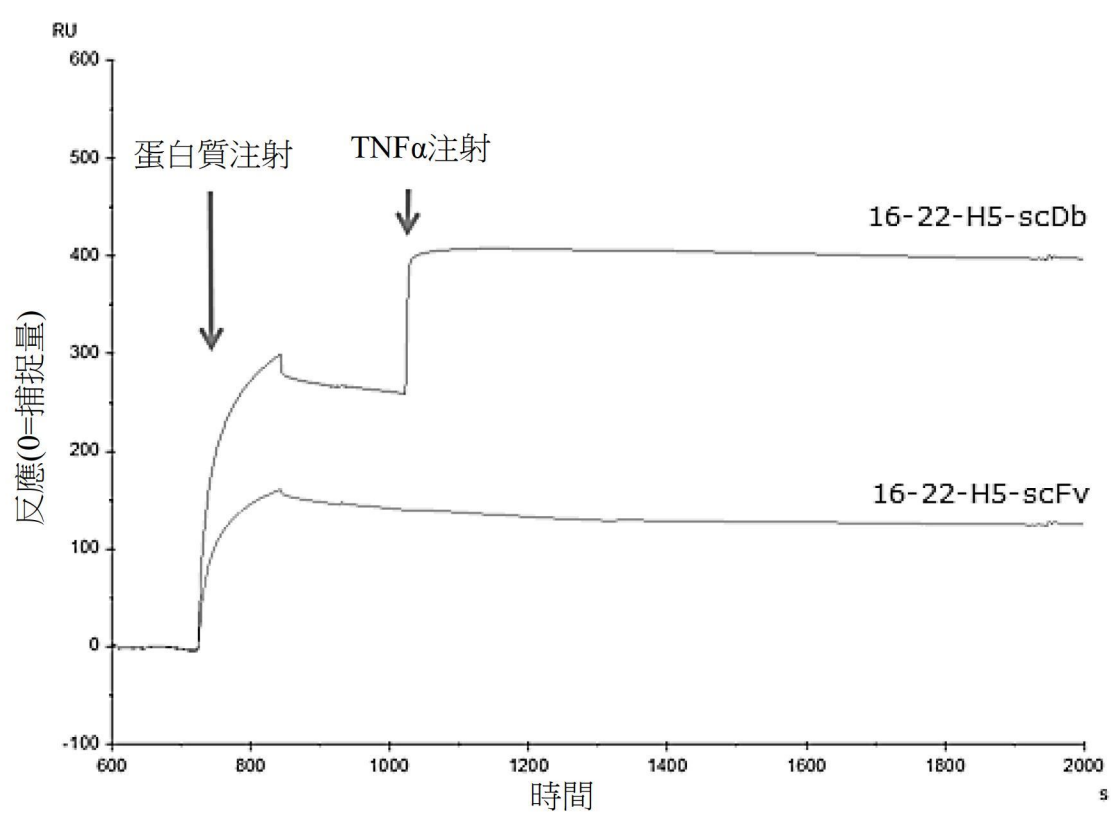
【圖10】



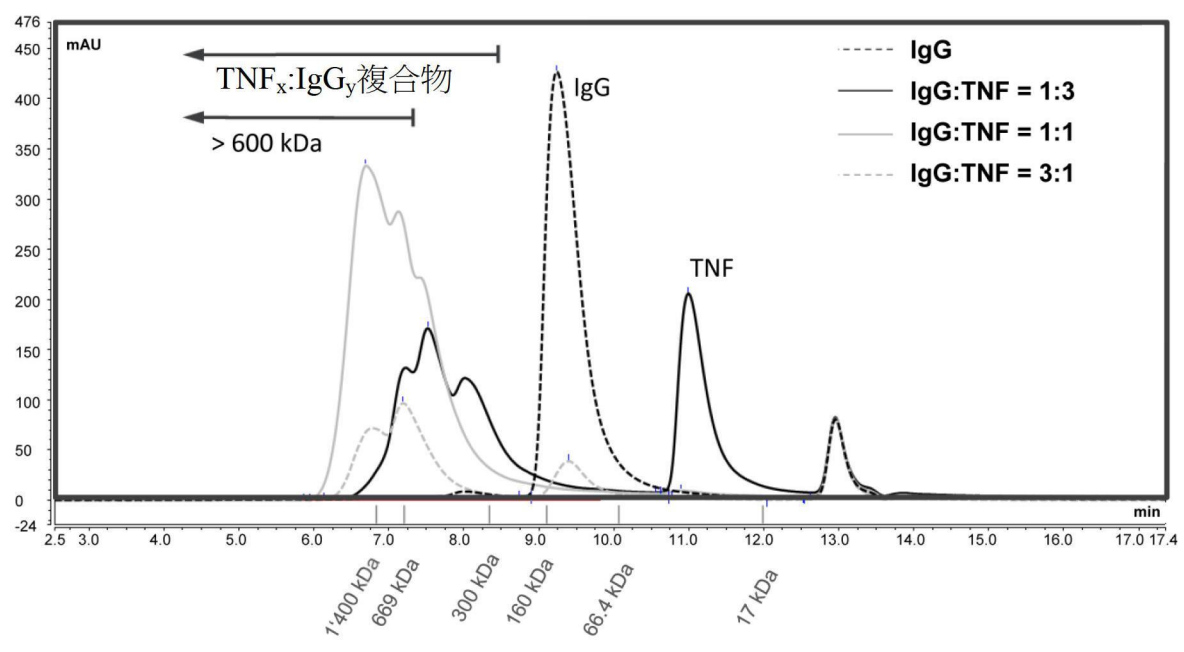
【圖11】



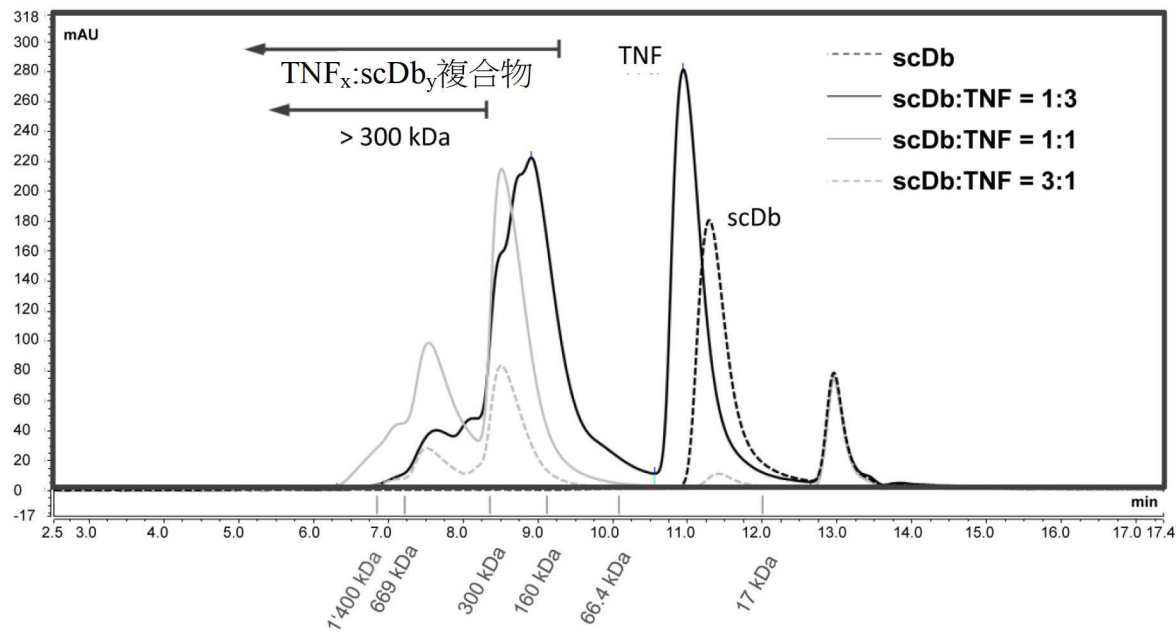
【圖12】



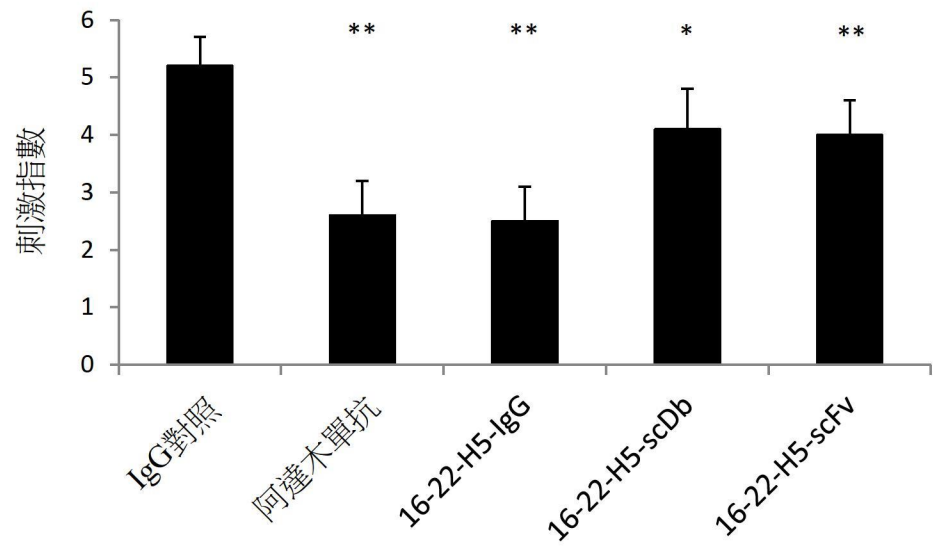
【圖13】



【圖14A】

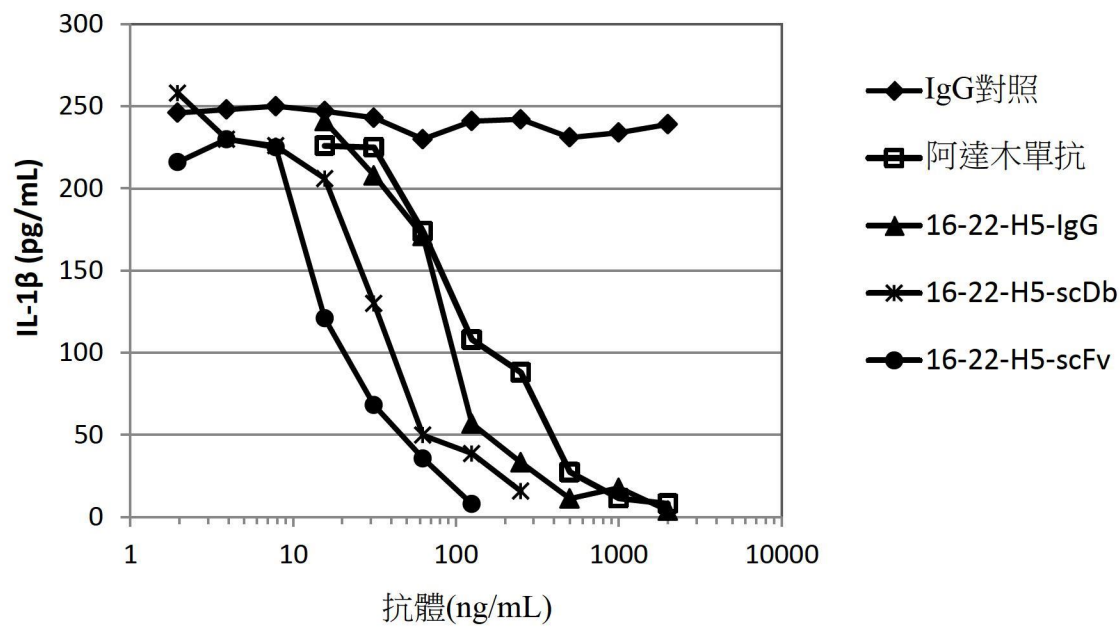


【圖14B】

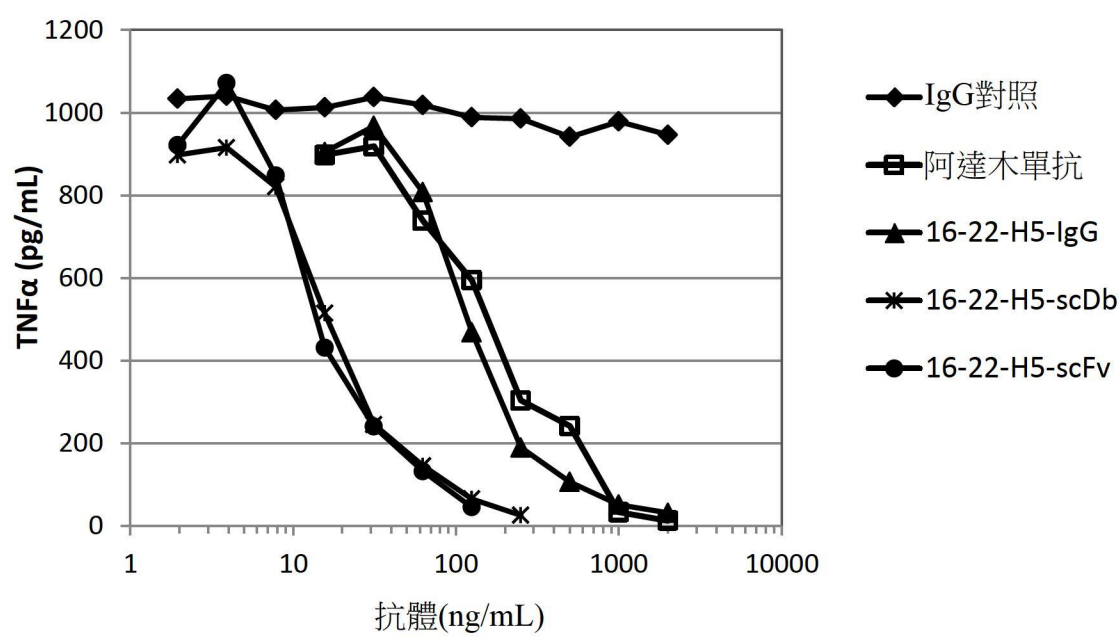


\*: p < 0.05  
\*\*: p < 0.01

【圖15】



【圖16A】



【圖16B】