



(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 I538918 B

(45) 公告日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 21 日

(21) 申請案號：099135701

(22) 申請日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 20 日

(51) Int. Cl. : C07K16/30 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

(71) 申請人：財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72) 發明人：邱偉鈞 CHIU, WEI CHUN (TW)；周民元 CHOU, MIN YUAN (TW)

(74) 代理人：洪澄文；顏錦順

(56) 參考文獻：

WO 2009073533A2

Wei Zhang, Humanization of an anti-human TNF-antibody by variable region resurfacing with the aid of molecular modeling, 2005, Molecular Immunology, Vol.42, Pages 1445-1451

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：7 共 60 頁

(54) 名稱

人源化之單株抗體、其核苷酸序列與其用途

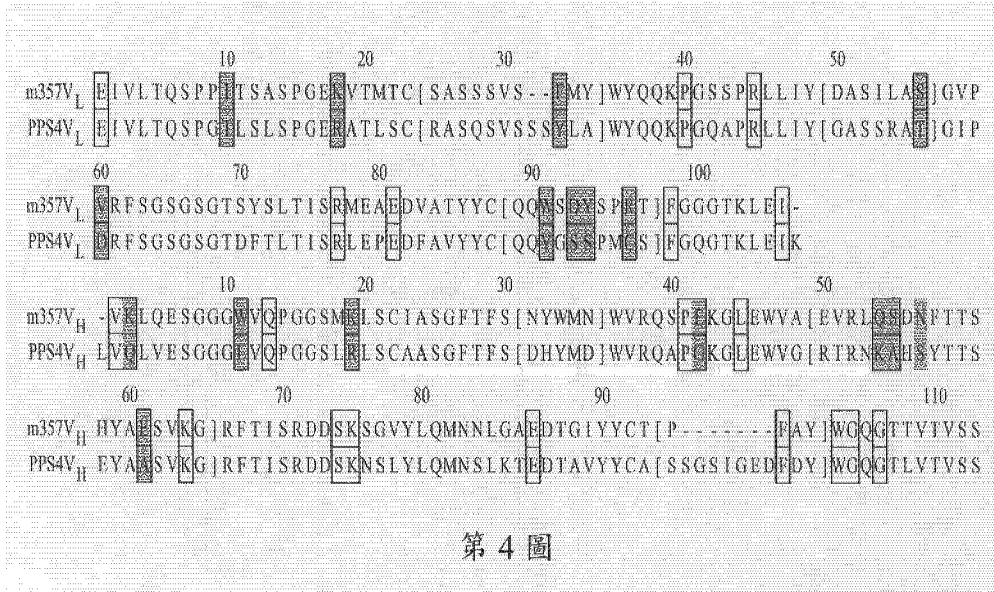
HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODY, NUCLEOTIDE SEQUENCE THEREOF, AND USE THEREOF

(57) 摘要

本發明提供一種人源化之單株抗體的胺基酸序列，包括：一輕鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：6 的序列，其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

The invention provides an amino sequence of a humanized monoclonal antibody, including: an amino sequence of a variable region of a light chain including SEQ ID. No.: 5; and an amino sequence of a variable region of a heavy chain including SEQ ID. No.: 6, wherein the humanized monoclonal antibody binds to tumor necrosis factor-alpha.

指定代表圖：



體之輕鏈變異區胺基酸序列與重鏈變異區胺基酸序列。在一實施例中，與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體可包括一鼠源單株抗體。此鼠源單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：1 之序列，而重鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：2 之序列。

接著，根據前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列與重鏈變異區胺基酸序列來建立前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區與重鏈變異區的分子模擬結構，並且標定出其非保守表面殘基。在一實施例中，分子模擬結構可以電腦輔助同源性模擬方式來進行。

之後，搜尋與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之變異區胺基酸序列相似度最高之人類序列，並將兩者進行比對而決定出此與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之變異區胺基酸序列的可置換殘基。最後，將此與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之變異區胺基酸序列的可置換殘基置換為對應於此殘基位置之前述人類序列的胺基酸殘基，以獲得與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體之輕鏈變異區的胺基酸序列與重鏈變異區的胺基酸序列。

在一實施例中，前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：1 之序列且重鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：2 之序列，而與前述非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列

及重鏈變異區胺基酸序列相似度最高之的人類序列為 PPS4 之輕鏈變異區胺基酸序列（序列辨識號：3）與重鏈變異區胺基酸序列（序列辨識號：4）。在此實施例中，可對前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區與重鏈變異區的胺基酸序列進行的置換則至少包括下列之一：序列辨識號：1 之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為羥丁胺酸、序列辨識號：1 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸、序列辨識號：2 之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺、序列辨識號：2 之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸、序列辨識號：2 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸與序列辨識號：2 之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸。因此，所獲得之與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體的胺基酸序列可含有包括序列辨識號：1 之輕鏈變異區胺基酸序列及包括序列辨識號：2 之重鏈變異區胺基酸序列，且序列辨識號：1 之序列與序列辨識號：2 之序列具有至少下列置換之一：序列辨識號：1 之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為羥丁胺酸、序列辨識號：1 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸、序列辨識號：2 之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺、序列辨識號：2 之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸、序列辨識號：2 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸與序列辨識號：2 之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸。

在另一實施例中，前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：1

之序列而重鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：2 之序列，而與前述非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列及重鏈變異區胺基酸序列相似度最高之的人類序列為 PPS4 之輕鏈變異區胺基酸序列（序列辨識號：3）與重鏈變異區胺基酸序列（序列辨識號：4）。而在進行前述序列比對後，所獲得之與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體之輕鏈變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5，而重鏈變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6。

因此根據上述，在本發明另一態樣中，本發明也可提供上述本發明人源化單株抗體之核苷酸序列。上述人源化單株抗體之核苷酸序列可包括一輕鏈變異區之核苷酸序列與一重鏈變異區之核苷酸序列。在一實施例中，上述本發明人源化單株抗體之核苷酸序列為一免疫球蛋白 G (IgG) 抗體之核苷酸序列，其可包括一輕鏈變異區之核苷酸序列、一重鏈變異區之核苷酸序列與人類免疫球蛋白 G 保守區域核苷酸序列。

在一實施例中，上述人源化單株抗體之輕鏈變異區核苷酸序列可包括編碼出序列辨識號：5 之序列的核苷酸序列，而重鏈變異區核苷酸序列可包括編碼出序列辨識號：6 之序列的核苷酸序列。編碼出序列辨識號：5 之序列的核苷酸序列可為序列辨識號：7 之序列，而編碼出序列辨識號：6 之序列的核苷酸序列可為序列辨識號：8 之序列。

在本發明另一態樣中，本發明還可提供一人源化單株抗體，其中此人源化單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合，而

腫瘤壞死因子 α 可為人類腫瘤壞死因子 α 。上述人源化單株抗體可包括一輕鏈與一重鏈。在一實施例中，上述本發明人源化單株抗體為一免疫球蛋白 G (IgG) 抗體，其單側可包括一輕鏈變異區、一重鏈變異區與人類免疫球蛋白 G 保守區域。

在一實施例中，上述本發明人源化單株抗體可藉由下述步驟來獲得。

首先，取得一與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區核苷酸片段及其序列與重鏈變異區核苷酸片段及其序列。在一實施例中，可藉由抽取一產生上述非人類單株抗體融合瘤的總 RNA，並對此總 RNA 以分別對於輕鏈變異區與重鏈變異區之兩對引子進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應以獲得非人類單株抗體之輕鏈變異區與重鏈變異區的核苷酸片段 (cDNA)，且之後將輕鏈變異區與重鏈變異區的核苷酸片段進行定序以分別獲得輕鏈變異區與重鏈變異區的核苷酸序列。在一實施例中，與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體可包括一鼠源單株抗體。此鼠源單株抗體之輕鏈變異區核苷酸序列可包括序列辨識號：9 之序列，而重鏈變異區核苷酸序列可包括序列辨識號：10 之序列。

接著，根據非人類單株抗體之輕鏈變異區與重鏈變異區的核苷酸序列分別推知此非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列與重鏈變異區胺基酸序列。在一實施例中，輕鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：1 之序列，而重

鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：2之序列。

然後，根據前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列與重鏈變異區胺基酸序列來建立前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區與重鏈變異區的分子模擬結構，並且標定出其非保守表面殘基。在一實施例中，分子模擬結構可以電腦輔助同源性模擬方式來進行。

再來，搜尋與前述本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的單株抗體之變異區胺基酸序列相似度最高之人類序列，並將兩者進行比對而決定出此與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之變異區胺基酸序列的可置換殘基。最後，將編碼出前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之變異區胺基酸序列的核苷酸序列於上述可置換殘基的對應位置以定點突變方式置換為編碼出對應於此殘基位置之前述人類序列的胺基酸殘基的核苷酸，以獲得本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體之輕鏈變異區核苷酸片段與重鏈變異區的核苷酸片段。

之後，藉由本技術領域熟知的方法，將前述本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體之輕鏈變異區核苷酸片段與重鏈變異區的核苷酸片段與一已知人類保守區域核苷酸片段分別選殖進入合適的表現載體，並將此表現載體轉染進合適的宿主細胞，以使宿主細胞表現本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體。

在一實施例中，前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類

單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：1 之序列且重鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：2 之序列，而與前述非人類單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列及重鏈變異區胺基酸序列相似度最高之的人類序列為 PPS4 之輕鏈變異區胺基酸序列（序列辨識號：3）與重鏈變異區胺基酸序列（序列辨識號：4）。在此實施例中，可對前述與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體之輕鏈變異區與重鏈變異區的胺基酸序列進行的置換則至少包括下列之一：序列辨識號：1 之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為羥丁胺酸、序列辨識號：1 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸、序列辨識號：2 之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺、序列辨識號：2 之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸、序列辨識號：2 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸與序列辨識號：2 之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸。因此，本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體的胺基酸序列可含有包括序列辨識號：1 之輕鏈變異區胺基酸序列及包括序列辨識號：2 之重鏈變異區胺基酸序列，且序列辨識號：1 之序列與序列辨識號：2 之序列具有至少下列置換之一：具有至少下列置換之一：序列辨識號：1 之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為羥丁胺酸、序列辨識號：1 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸、序列辨識號：2 之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺、序列辨識號：2 之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸、序列辨識號：2 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精

射進入小鼠腹腔，使小鼠產生腫瘤與腹水。小鼠腹水中含有高量之與人類腫瘤壞死因子結合之鼠源單株抗體(m357 IgG)。上述步驟為委託台灣醣聯生技醫藥股份有限公司(GlycoNEX Inc.) (<http://www.glyconex.com.tw/>)進行。

接著將腹水自小鼠取出並將腹水通過蛋白質 A(protein A)管柱(GE Helth-care)來進行純化以獲得與人類腫瘤壞死因子結合之鼠源單株抗體(m357 IgG)。

2. 與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體(m357 IgG) cDNA 序列的獲得

(1) 抽取融合瘤細胞株 357-104-4 (ECACC No. 92030603)總 RNA (QIAGEN RNeasy Mini Kit)。

(2) 以 Amersham 公司所生產之 Light Primer Mix 與 Heavy Primers 兩組引子對總 RNA(total RNA)進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)以獲得鼠源 357 IgG 之輕鏈與重鏈的 cDNA。

(3) 將此輕鏈與重鏈的 cDNA 分別選殖進入 TOPO 載體上，可以得到兩個選殖體(clones)。

(4) 經由 DNA 定序後，可設計具有酵素切位之引子。

(5) 合成兩對具有酵素切位之引子。

用於輕鏈之引子對為：

357V_L'Asc primer：

5'-CAGGCGCGCCGAAATTGTGCTGACCCAGTC-3'

(序列辨識號：11)

357V_L3' Glink primer :

5'-CCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCC
AATTTCAGCTTGC-3' (序列辨識號 : 12)

用於重鏈之引子對為 :

357V_H5' Glink primer

5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG
GTGAAACTGCAGGA-3' (序列辨識號 : 13)

357V_H3' Not

5'-CAGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3'
(序列辨識號 : 14)

之後，對步驟(3)中所完成的選殖體中以此兩引子對進行聚合酶鏈鎖反應以獲得 m357 IgG 的輕鏈與重鏈之 cDNA。

B. 與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體(m357 IgG)的電腦模擬

使用 Discovery Studio Modeling 2.1 (Accelrys, Inc., San Diego, CA)來執行與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體 (m357 IgG) 的同源模擬程序 (homology modeling process)。對 m357 IgG 之輕鏈變異區 (V_L) 與重鏈變異區 (V_H) 執行兩個分開之 BLASTP 搜尋。經由在蛋白質資料銀行 (Protein Data Bank, PDB)

(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)中搜尋來分析序列以確認 m357 蛋白質序列的同源性。藉由根據鼠源抗乳癌抗體 Fab 片段之重鏈變異區 SM-3[PDB entry: 1SM3](Dokurno et al., 1998)與抗 *thermus aquaticus* DNA polymerase I 單株抗體之輕鏈變異區結構[PDB entry: 1AY1]結構的同源模擬來建構 m357 Fv 片段的三維(three-dimensional, 3D)結構。最終的三維模型為藉由 MODELLER 模組(Sali et al., 1995)來產生，其藉由滿足空間限制(satisfaction of spatial restraints)來執行來一比較蛋白質結構模擬(comparative protein structure modeling)的自動方法。其自動對 m357 IgG 執行蛋白質同源模擬與環模擬(loop modeling)。藉由使用 Model antibody Loops 模組以最高序列鑑別度自 PDB 資料庫選擇模板結構來執行 CDR 環(CDR loop)的模擬建構，且使用 Loop Refinement 模組來使 CDR 環的模擬建構完善以將空間碰撞(steric clash)最小化並確認正確鍵長度與鍵角。之後，藉由在 Discovery Studio Modeling 2.1 中之 CHARMM (B.R. Brooks, 1983)程式並以 Accelrys CHARMM forcefield 來進行結構的能量最小化，可使此整個模擬更加完善。將結構進行能量最小化於兩個步驟中，首先執行受限之最陡坡降最小化(restrained steepest descent minimization)的 5000 個步驟，接著，執行共軛梯度最小化(conjugated gradient minimization)的 5000 個步驟，直到當支架(framework)之 α 碳(alpha carbon)被維持固定於適當位置中。以 AREAIMOL 程式(CCP4, 1994)在

三維模擬上計算 m357 IgG 殘基的溶劑可接近表面積 (solvent-accessible surface areas)。將相對之可接近度大於 30% 之殘基定義為可接近的。

C. IgG 之建構、表現與純化

藉由 overlapping PCR 來獲得編碼出 m357 IgG 之人源化變異區的 cDNA 片段。接著將來自人類 IgG 之保守區序列與藉由 overlapping PCR 合成之變異區序列次選殖 (sub-cloning) 於哺乳動物表現載體 pSecTag2/Hygro (重鏈) (Invitrogen) 與 pcDNA3.3-TOPO TA (輕鏈) (Invitrogen) 中。之後利用 EcoRV 限制切點 (restriction site) 將兩個構築體 (construct) 融合，產生 pSec-pcDNA-h357-IgG。根據廠商之操作指南，使用 Effectene (Qiagen) 將含重鏈與輕鏈之基因的質體轉染 (transfect) 進入小鼠骨髓瘤 (myeloma) NS0 細胞 (European Collection of Animal Cell cultures, Salisbury, Wiltshire, UK)。在以 Hygromycin (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 篩選 4 週後，將穩定的選殖體 (clone) 以在一無血清化學定義培養基 (chemically-defined medium) HyQNS0 (Hyclone) 中 5×10^5 cells/ml 的起始接種密度培養於搖瓶中。於 37°C 收取培養基 5 天且藉由蛋白質 A (GE Health-care) 層析自上清液純化抗體。

D. 抗腫瘤壞死因子 α 中和效力分析

根據先前文獻 (Matthews N, 1987) 所敘述之方法以經

actinomycin D 處理之鼠源纖維母細胞(fibroblast) L929 細胞(ATCC Cat. No. CCL-1)來測量 m357 IgG 與人類腫瘤壞死因子 α 結合之人源化單株抗體(h35 IgG)對於人類腫瘤壞死因子 α 的中和活性。簡單而言，將 L929 細胞以 3×10^5 cells/well 三重複接種於一 96 孔盤中並將其培養於添加 10% (v/v)胎牛血清之 RPMI 1640 培養基中，16 小時。之後，將抗體的一些稀釋製備於含 actinomycin D ($2 \mu\text{g/ml}$)與腫瘤壞死因子 α (TNF- α) (100 ng/ml)的培養基中，且培養於 37°C ，16 小時。在移除表層懸浮物後，加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑鹽 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich)並培養於 37°C ，4 小時。之後將 SDS 溶液(10%)加至孔洞中。於室溫培養 24 小時後，藉由色度計(colorimeter)記錄於各孔洞中之任何顏色改變成紫色。於 570 nm 測定洗提物之光學密度(optical density, OD)，其與存活細胞之數目具有正相關。也於實驗中設計空白控制組(僅有培養物)、腫瘤壞死因子 α 控制組(僅有腫瘤壞死因子 α)與抗體控制組(僅有抗體)。使用 Sigma plot 軟體(Systat software, Inc. Richmond, CA)藉由複雜彎曲非線性回歸(complex sigmoid non-linear regression)分析來計算 ED_{50} 值。

E. 於 NS0 細胞上之穿膜腫瘤壞死因子 α 的穩定表現
如先前技術(Perez et al., 1990)所述，以定點突變

(site-directed mutagenesis)產生抵抗腫瘤壞死因子 α 轉換酵素(TNF- α converting enzyme, TACE)居間裂解之刪除型突變的穿膜腫瘤壞死因子 α 。於此非裂解形式之穿膜腫瘤壞死因子 α 中，刪除了天然穿膜腫瘤壞死因子 α 之胺基酸+1至+12。將不裂解形式之穿膜腫瘤壞死因子 α 基因選殖入pSecTag2/Hygro 哺乳動物表現載體(Invitrogen)並以Effectene將其轉染進入小鼠骨髓瘤 NS0 細胞以在細胞表面上表現穿膜腫瘤壞死因子 α 。

F. m357-IgG 與 h357-IgG 對穿膜腫瘤壞死因子 α 之飽和結合分析

將經穿膜腫瘤壞死因子 α 轉染之 NS0 細胞以 m357-IgG 及 h357-IgG 的連續指數稀釋物在含 2 %胎牛血清之磷酸鹽緩衝溶液(螢光活化細胞儲存緩衝溶液(fluorescence-activated cell sorting [FACS] buffer))中於 4°C 培養 1 小時。將細胞以螢光活化細胞儲存緩衝溶液清洗 3 次，之後分別以對 m357-IgG 反應之 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L)對 h357-IgG 之反應之 Alexa Fluor 647 山羊抗人類 IgG (H+L)來將細胞在 4°C 進行染色 1 小時。使用 FACSCalibur 流式細胞儀(flow cytometer)(Becton Dickinson, San Jose, CA)來測量螢光強度。

G. 抗體依賴型細胞介導毒殺作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)分析

h357-IgG 之抗體依賴型細胞介導毒殺作用的活性為藉由 LDH Cytotoxicity Detection Kit (Clontech) 來測量，其根據製造商操作指南之來測量釋放自受損細胞之細胞溶質 (cytosol) 的活性。簡單而言，將可高度表現穿膜腫瘤壞死因子 α 之細胞在不同濃之 h357 抗體存在的分析培養基中培養 1 小時於 5% CO₂ 培養箱，37°C，然後加入人類周邊血液單核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 為效應細胞 (effector cell) (效應細胞比目標細胞，20:1)。在額外於 37°C 培養 16 小時後，每孔洞獲得 100 μ l 之上清液並將其轉移至一新的 96-孔平底盤中。將 LDH 基質 (100 μ l) 加至各孔洞且以避光於室溫培養 30 分鐘。樣本之吸光值以 ELISA reader 於 490 nm 下測量。藉由分解溶液 (lysis buffer) 測定最大釋放。根據下列公式來計算特定分解 (specific lysis) 之百分比： $\% \text{ 細胞毒性} = [\text{實驗釋放} - \text{自然釋放}] / [\text{最大釋放} - \text{自然釋放}] \times 100$ 。

結果

A. 與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體 (m357 IgG)

1. 人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體之分析

將經純化之 m357 IgG 進行 SDS-PAGE 分析，結果如第 1 圖之 lane 1 與 lane 2 所示。lane 1 為非還原狀態，lane 2 為還原狀態。

2. 鼠源 357 IgG 的輕鏈與重鏈之 cDNA

將前述藉由聚合酶鏈鎖反應獲得之鼠源 357 IgG 的輕鏈與重鏈之 cDNA 進行電泳分析，結果如第 2 圖所示，其中 lane 1 為輕鏈之 cDNA (序列辨識號：9)，lane 2 為重鏈之 cDNA (序列辨識號：10)。

B. m357 變異片段之分子模擬

藉由 RT-PCR 來獲得編碼出源自融合瘤細胞株 357-101-4 (ECACC No. 92030603) 之抗腫瘤壞死因子 α 單株抗體 m357 IgG 的重鏈變異區及輕鏈變異區之 cDNA (資料未顯示)。藉由如“材料與方法”中所述之同源模擬 (program MODELLER) 來分別建構 m357 IgG 的重鏈變異區及輕鏈變異區之推演之胺基酸序列的三維結構。之後，以來自 PDB 之 1SM3 (享有序列相同度與相似度分別為 87% 與 93%) 模板結構以 1.95 Å 解析度與來自 PDB 之 1AY1 (享有序列相同度與相似度分別為 85% 與 91%) 模板結構以 2.20 Å 解析度分別模擬出 m357 IgG 的重鏈變異區及輕鏈變異區。經由 Discovery Studio modeling 2.1 program 獲得 m357 IgG 之重鏈變異區及輕鏈變異區的最終精確結構，如第 3A 圖中所示。

第 3A 圖顯示 m357 IgG 的變異區。藉由分別與對應於重鏈變異區之 1SM3 與對應於輕鏈變異區之 1AY1 的結晶結構進行比較的同源模擬來產生 m357 IgG 的三維結構。CDR 環以粗黑線顯示。第 3B 圖為 m357 IgG 分子表面模

擬，其顯示非類人類(non-human like)表面殘基與 CDR 環相關。以箭號指出之 17 個相對溶劑接近度大於 30% 的殘基，為非類人類表面殘基。CDR 環以粗黑線顯示。接近 CDR 環於 5Å 內（虛線圓圈）之殘基以虛線箭號顯示。較佳突變為“人類”胺基酸的 6 個殘基以實線箭號顯示。於重鏈變異區支架中應有 4 個殘基被人源化，而於輕鏈變異區支架中僅有 2 個殘基應被人源化。

C. m357 IgG 變異區片段之人源化

藉由變異區重組之人源化首先由 Padlan 於 1991 年提出，於此方法中排除了在抗體之支架區中之潛在抗原位(antigenic site)，而不影響抗原親和力(Padlan, 1991)。此方法係根據人類抗小鼠抗體僅對於來自表面殘基之變異區反應的前提，並且已被其他研究者(Fontayne et al., 2006; O'Connor et al., 1998; Staelens et al., 2006)採用與修飾。於本實施例中，以下列三個步驟來執行 m357 IgG 之變異區重組：首先，分別建構 m357 IgG 之重鏈變異區與輕鏈變異區；第二，使用 AREAIMOL 程式來計算溶劑可接近殘基以鑑定非類人類支架表面殘基，且最後根據人類支架之序列排列結果將這些表面殘基突變為人類之對應表面殘基。為了於變異區上置換鼠源 m357 IgG 的非類人類支架表面殘基，自人類目標序列選擇一組高度同源之表面殘基。搜尋 IMGT 資料庫(<http://imgt.cines.fr/>)，同時自搜尋結果排除噬菌體呈現(phage-display)或人源化抗體的序列，以鑑定出與

m357 IgG 之對應變異區具最高同源性之人類重鏈變異區與輕鏈變異區序列對。自人類序列所發現之最相同之表面殘基為 PPS4 之變異區(於價區中序列相似度分別為重鏈變異區;76%與輕鏈變異區:73%)(第 4 圖)。根據 AREAIMOL 程式之計算結果,於重鏈變異區中之 20 個表面殘基有 8 個為在人類與小鼠序列間為非保守的,而於輕鏈變異區中之 16 個表面殘基有 9 個為非保守的。這 17 個表面殘基為要被取代之候選者。然而,於 CDR 區中之重鏈 52BQ、重鏈 52CS、重鏈 54N、重鏈 61E、輕鏈 31F、輕鏈 55S、輕鏈 90W、輕鏈 92D、輕鏈 93Y 與輕鏈 96R 的取代可能潛在改變 CDR 的結構,且 V59,於輕鏈中接近 CDR2 於 5 Å 內之一額外非保守表面殘基也可能潛在影響結合親和力(第 3B 圖)。如結果所示,保留這 11 個鼠源殘基以維持抗原親和力。最後,選擇剩餘之 6 個殘基來取代為人類保守殘基:與 PPS4 比對,輕鏈變異區之第 10 個比對位置由異白胺酸置換為羥丁胺酸(m357 輕鏈變異區之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為羥丁胺酸)、第 18 個比對位置由離胺酸置換為精胺酸(m357 輕鏈變異區之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸);與 PPS4 比對,重鏈變異區第 3 個比對位置由離胺酸置換為穀胺醯胺(m357 重鏈變異區之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺)、第 11 個比對位置由色胺酸置換為白胺酸(m357 重鏈變異區之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸)、第 19 個比對位置離胺酸置換為精胺酸(重鏈變異區之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸)與

第 42 個比對位置胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸（重鏈變異區之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸）（第 4 圖）。

D. 人源化 357 (h357) IgG₁ 之構築與表現

分別將 m357 IgG 之人源化重鏈變異區與輕鏈變異區的胺基酸序列讀框內 (in-frame) 融合至人類 IgG₁ 之重鏈與 kappa 輕鏈保守區。為了表現一完整之人源化 357 (h357) IgG₁ 分子，使用兩種哺乳動物表現載體，pSecTag2/Hygro 與 pcDNA3.3-TOPO TA，以分別接受 h357 IgG 之人源化重鏈與輕鏈。之後將輕鏈表現框架 (expression cassette) 連接至重鏈表現 pSecTag2/Hygro 載體。重組 h357 IgG 之表現程度為 ~ 14 mg/L。藉由蛋白質 A 層析來分別純化含 m357 IgG 與 h357 IgG 兩者之培養基，並藉由 SDS-PAGE 來確認蛋白質純化物（第 1 圖）。如於第 1 圖中所示，在非還原環境下，兩抗體皆顯示具有 155 kDa 分子量之單一條帶 (lanes 1 與 3)。在還原環境下，兩抗體分別產生具有 55 kDa (重鏈) 與 26 kDa (輕鏈) 之分子量的兩蛋白質條帶 (lanes 2 與 4)。

E. 藉由 m357 IgG 與 h357 IgG 之腫瘤壞死因子 α 仲介細胞毒性的中和

為了試驗抗腫瘤壞死因子 α 抗體之功能活性，執行抗體抑制可溶性腫瘤壞死因子 α 的能力的測試。腫瘤壞死因子 α 引起對鼠源 L929 細胞之細胞毒性。藉由將抗體與重組

之人類腫瘤壞死因子 α 及細胞共培養，於 L929 分析中評估 m357 IgG 與 h357 IgG 兩者。如於第 5 圖中所示，於以 100 ng/ml 之人類腫瘤壞死因子 α 處理之 L929 細胞中的腫瘤壞死因子 α 仲介細胞毒性被 m357 IgG 與 h357 IgG 兩者以劑量依賴方式 (dose dependent manner) 有效中和，分別具有 3.07 nM 與 2.30 nM 之 ED₅₀ 值。結果指出人源化 357 IgG 在相似於鼠源 357 IgG 之濃度維持腫瘤壞死因子 α 中和活性。

F. h357 IgG 抗體對穿膜腫瘤壞死因子 α 的結合活性

腫瘤壞死因子 α 存在與膜連接之前驅物 (穿膜腫瘤壞死因子 α)，藉由腫瘤壞死因子 α 轉換酵素 (TNF-converting enzyme, TACE) 之蛋白酶切割 (proteolytic cleavage)，自穿膜腫瘤壞死因子 α 釋放成熟的可溶形式。已有許多研究指出具與穿膜腫瘤壞死因子 α 結合能力腫瘤壞死因子 α 對抗藥 (antagonist) 可導致由細胞凋亡、抗體依賴型細胞仲介毒殺作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、補體依賴細胞毒殺作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 與外至內訊號傳遞機制引起之細胞溶解 (Arora et al., 2009; Caron et al., 1999; Mitoma et al., 2008; Scallan et al., 1995)。為了分析 h357 IgG 對穿膜腫瘤壞死因子 α 的結合能力，將穿膜腫瘤壞死因子 α 之未裂解形式的 cDNA 轉染進 NS0 細胞以將其表現於細胞膜上，並使用流式細胞儀以評估 m357 IgG 與

h357 IgG 兩者之結合活性。於第 6 圖中之資料指出 m357 IgG 與 h357 IgG 兩者皆可以一濃度依賴方式與穿膜腫瘤壞死因子 α 結合，其 K_D 值分別為 12.0 nM 與 16.8 nM。相似之 K_D 值指出人源化過程並沒有改變對穿膜 TNF- α 之結合親和力。於奈米級莫爾濃度(nanomolar)範圍中之結合親和力指出 h357 IgG 可潛在引起更多經由穿膜腫瘤壞死因子 α 的作用功能(effector function)或細胞凋亡機制。

G. h357 IgG 對於仲介抗體依賴型細胞仲介毒殺作用的能力

先前文獻已報導，Infliximab 與 Adalimumab 對於穿膜腫瘤壞死因子 α 的結合親和力較佳於 Etanercept，其可藉由抗體依賴型細胞仲介毒殺作用、補體依賴細胞毒殺作用或細胞凋亡機制影響細胞表面表現穿膜腫瘤壞死因子 α 的細胞殺死作用，且此可為在臨床疾病上導致不同功效的原因之一(Taylor, 2010)。偏好細胞表面表現腫瘤壞死因子 α 的巨嗜細胞與單核球於肉芽腫性疾病(granulomatous disease)，例如克隆氏症(Crohn's disease)與韋格納肉芽腫(Wegener's granulomatosis)中扮演一非常重要的角色，且藉由抗體依賴型細胞仲介毒殺作用可將細胞直接殺死(Beenhouwer et al., 2004)。當腫瘤壞死因子 α 對抗藥與表現穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合時，這些細胞可被自然殺手細胞(natural killer cell)作為目標。具有來自人類 IgG₁ 之 Fc 區域的 h357 IgG，其可於腫瘤壞死因子 α 產生細胞中潛在

引起細胞分解。因此，為了評估 h357 IgG 對於伸介對表現穿膜腫瘤壞死因子 α 目標細胞的抗體依賴型細胞伸介毒殺作用的能力，於抗體依賴型細胞伸介毒殺作用分析中，以效應細胞對目標細胞為 (effector to target, E:T) 20:1 之比例使用經分離之人類周邊血液單核球。大於 20% 之腫瘤壞死因子 α 攜帶目標細胞在 h357 IgG 濃度為 6.25 ug/ml 時被分解 (第 7 圖)。這些資料指出經由與表現於細胞表面之穿膜腫瘤壞死因子 α 結合，h357 IgG 可伸介抗體依賴型細胞伸介毒殺作用，因此，相似於那些具 ADCC 能力的治療抗體，h357 IgG 具有被發展為一更有效之腫瘤壞死因子 α 中和抗體的潛力。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示經純化之 m357 IgG 與 h357 IgG 之 SDS-PAGE 分析結果。將 m357 IgG 與 h357 IgG 表現於小鼠 NS0 細胞中，並且藉由蛋白質 A 管柱自培養基中純化。將樣本在非還原狀態與還原狀態下以 MOPS 緩衝溶液於 4~12 % SDS/聚丙烯醯胺凝膠(Bis-Tris polyacrylamide gel) 進行電泳。M 為分子量標準品。

第 2 圖顯示 m357 IgG 之輕鏈與重鏈 cDNA 的電泳分析結果。

第 3A 圖顯示 m357 IgG 之重鏈變異區及輕鏈變異區的最終精確結構。

第 3B 圖顯示 m357 IgG 分子表面模擬。

第 4 圖顯示 m357 IgG 與 PPS4 之重鏈變異區(V_H)(A) 及重鏈變異區(V_L)(B)的胺基酸序列比對。將 PPS4 Fv 序列顯示為 PPS4 V_L 與 PPS4 V_H 以進行比較，其與用在 m357 IgG 人源化中當作人類表面殘基接受者的 m357 IgG Fv 同源度最高。CDR 殘基為在括號([])中。保守表面殘基以白色方框顯示，非保守表面殘基以灰方框顯示。根據 Kabat's 慣例 (Kabat, 1991)將胺基酸序列編碼。

第 5 圖顯示藉由 m357-IgG 抗體與 h357-IgG 抗體於 L929 細胞中之腫瘤壞死因子 α 仲介細胞毒性的中和。將各種濃度之 m357-IgG (●)抗體與 h357-IgG (○)抗體加至 L929 細胞與 100 ng/ml 之人類腫瘤壞死因子 α 培養。將細胞培養於 37°C, 16 小時，並使用比色 MTT 分析來分析細胞存活。

第 6 圖顯示 m357-IgG 抗體與 h357-IgG 抗體對在細胞

表面上之穿膜腫瘤壞死因子 α 的飽和分析。將經穿膜腫瘤壞死因子 α 轉染之 NS0 細胞以 m357-IgG 及 h357-IgG 的連續指數稀釋物於 4°C 培養 1 小時。將細胞清洗 3 次並分別以對 m357-IgG 反應之 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 與對 h357-IgG 之反應之 Alexa Fluor 647 山羊抗人類 IgG (H+L) 在 4°C 進行培養 1 小時。將細胞清洗並藉由 FACSCalibur 流式細胞儀 (flow cytometer) 來分析。

第 7 圖顯示 h357 IgG 對於仲介抗體依賴型細胞仲介毒殺作用的能力。將表現穿膜腫瘤壞死因子 α 之細胞在不同濃之 h357 抗體存在下培養 1 小時。然後將人類周邊血液單核球作為效應細胞 (effector cell)，且表現穿膜腫瘤壞死因子 α 之細胞作為目標細胞。藉由測量自細胞質中進入上清液中的 LDH 量來計算細胞毒性。結果顯示將以溶解溶液處理之細胞群組作為 100% 溶解之細胞溶解百分比。

【主要元件符號說明】

無。

Met Lys Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

20

25

30

Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

35

40

45

Glu Val Arg Leu Gln Ser Asp Asn Phe Thr Thr His Tyr Ala Glu Ser

50

55

60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gly Val

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gly Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr

85

90

95

Cys Thr Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> 人類

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His

20 25 30

Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala His Ser Tyr Thr Thr Ser Glu Tyr Ala

50 55 60

Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn

65 70 75 80

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Gly Ser Ile Gly Glu Asp Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人源化輕鏈變異區

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Thr Thr Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met

 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

 35 40 45

Asp Ala Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

 50 55 60

I538918

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65

70

75

80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Tyr Ser Pro Arg

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人源化重鏈變異區

<400> 6

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

1

5

10

15

Met Arg Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

20 25 30

Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

35 40 45

Glu Val Arg Leu Gln Ser Asp Asn Phe Thr Thr His Tyr Ala Glu Ser

50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gly Val

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gly Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr

85 90 95

Cys Thr Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人源化輕鏈變異區 DNA

<400> 7

gaaattgtgc tgaccagtc tccaccaacc acgtctgctt ctccagggga gagagtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt ttcattgtact ggtaccagca gaagccagga 120

tctccccca gactcctgat ttatgacgca tccatcctgg cttctggagt cctgttctgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240

gatgttgcca cttattactg ccaacaatgg agtgattact caccaggac gttcgggtgga 300

ggcaccaagc tggaaattaa a 321

<210> 8

<211> 340

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人源化重鏈變異區 DNA

<400> 8

gtgcagctgc aggagtctgg aggaggcttg gtgcaacctg gaggatccat gagactctcc 60

tgtattgcct ctggattcac ttcagtaac tactggatga actgggtccg ccagtctcca 120

gggaaggggc ttgagtgggt tgctgaagtt agattgcaat ctgataattt tacaacacat 180

tatgctggagt ctgtgaaagg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtgggtgc 240

tacctgcaaa tgaacaactt aggagctgaa gacactggca tttattattg taccccgttt 300

gcttattggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag 340

<210> 9

<211> 321

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 9

gaaattgtgc tgacccagtc tccaccaatt acgtctgctt ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt ttcattgtact ggtaccagca gaagccagga 120

tcctccccca gactcctgat ttatgacgca tccatcctgg cttctggagt cctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240

gatgttgcca cttattactg ccaacaatgg agtgattact caccaggac gttcgggtgga 300

ggcaccaagc tggaaattaa a 321

<210> 10

<211> 340

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 10

gtgaaactgc aggagtctgg aggaggctgg gtgcaacctg gaggatccat gaaactctcc 60

tgtattgcct ctggattcac tttcagtaac tactggatga actgggtccg ccagtctcca 120

gagaaggggc ttgagtgggt tgctgaagtt agattgcaat ctgataattt tacaacacat 180

tatgctggagt ctgtgaaagg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtgggtgc 240

tacctgcaaa tgaacaactt aggagctgaa gacactggca tttattattg taccocgttt 300

gcttattggg gcccaaggac cacggtcacc gtctcctcag 340

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工

<222>

<223> 人工引子

<400> 11

caggcgcgcc gaaattgtgc tgaccagtc 30

<210> 12

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工引子

<400> 12

ccagagccac ctccgctga accgctcca cccaatttcc agcttgc

47

<210> 13

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工

<222>

<223> 人工引子

<400> 13

tcaggcggag gtggctctgg cggtgccgga tcggtgaaac tgcagga

47

<210> 14

<211> 31

八、圖式：(如後所示)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種抗腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 的抗體，且特別關於一種具高度中和腫瘤壞死因子 α 之能力的人源化單株抗體與其變異區之序列。

【先前技術】

腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 為前發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokine)，其主要由包括巨噬細胞與單核球的免疫系統細胞所產生。腫瘤壞死因子 α 呈現為一同源三聚體 (homotrimeric) 蛋白質，於其中各次單元最初被轉譯為一個 26 kDa 之穿膜前驅物蛋白質。在腫瘤壞死因子 α 轉換酵素 (TNF- α converting enzyme, TACE) 於接近穿膜區域之位置進行切割後，釋出腫瘤壞死因子 α 之可溶三聚體形式，並經由與效應細胞 (effector cell) 上之結構區分 type I 與 type II 腫瘤壞死因子受器 (TNFRI 與 TNFRII) 結合而發揮其活性。

穿膜形式之腫瘤壞死因子 α 也以其獨特之生物功能而被熟知，例如以細胞-細胞接觸的方式產生生物毒性活性與 B 細胞的多細胞株活化 (polyclonal B-cell activation)，(Mitoma et al., 2008)。已證明腫瘤壞死因子 α 對於自體免疫過程具有特定影響，且已成為許多自體免疫疾病的關鍵治療標的 (Feldmann, 2001)。到目前為止，一些抗腫瘤壞死因子 α 之試劑，如 etanercept、adalimumab 與 infliximab 已

被美國食品及藥物管理局(Food and Drug Administration, FDA)所核准，且皆具有有效中和可溶形式之腫瘤壞死因子 α 為作用之主要生理機制的的能力。然而，這些對抗藥對於穿膜形式之腫瘤壞死因子 α 的結合功效並不同，其可能導致於臨床疾病上的不同結果(Taylor, 2010)。例如，etanercept對於其中穿膜形式之腫瘤壞死因子 α 扮演一關鍵角色的肉芽腫病(granulomatous disease)發病在臨床上並無功效(2008, Mitoma)。因此，是否抗腫瘤壞死因子 α 試劑可與穿膜形式之腫瘤壞死因子 α 結合對於引起抗體依賴型細胞介毒殺作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、補體依賴細胞毒殺作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC)、細胞凋亡與外至內訊號傳遞機制而言為必要條件。

鼠源動物之單株抗體於臨床實施上之主要阻礙為其可能在病患中引起人類抗鼠源動物抗體(human anti-murine antibody, HAMA)反應(Owens and Young, 1994; Sandhu, 1992; Schroff et al., 1985)。因此，為改善臨床使用的效能，已使用基因工程技術以將屬於鼠源動物之胺基酸殘基置換為人類對應的胺基酸殘基，並以減少於病患中之誘發致免疫原性(immunogenicity)的可能性。

理想的抗體人源化應可維持抗體對抗原的專一性與親和力，並儘可能減低致免疫原性。到目前為止，對於抗體人源化已使用許多方式來進行，例如由鼠源抗原結合變異區基因融合至人類抗體不變區所組成的嵌合抗體(chimeric

antibodies)為最早試圖用以減少致免疫原性(Morrison et al., 1984)。然而，嵌合抗體仍然產生非期望之抗變異區反應(Bruggemann et al., 1989)。互補決定區段移植法(complementarity determining region grafting, CDR-grafting)為另一方式，其包含將啮齒類抗體之互補決定區段轉移至人類抗體的 Fv 支架(Fv framework, FR)。不幸的是，介於互補決定區段與的 Fv 支架之間的介面嚴重妨礙與抗原的結合。最初的互補決定區段移植抗體傾向於失去來源抗體所具有的結合親和力，因此需要回復突變一些對於互補決定區段結構而言為必須的鼠源支架胺基酸的額外工作。藉由變異區表面重組(variable domain resurfacing)之人源化為可維持來源抗體之專一性與結合親和力的另一方式，經由將於鼠源 Fv 支架中暴露於表面之殘基取代為一般於人類抗體中發現之暴露於表面的殘基，可減少抗體之致免疫原性(Fontayne et al., 2006; Padlan, 1991; Roguska et al., 1994; Staelens et al., 2006; Zhang et al., 2005)。雖然現今之分子生物技術可使改變胺基酸之方法更易實行，然而，若無抗體之可靠電腦模型時，仍難以確認在溶劑中暴露於表面上之殘基。

【發明內容】

本發明提供一種人源化之單株抗體的胺基酸序列，包括：一輕鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：1 的序列；以及一重鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：2 的序列，其中序列辨識號：1 之序列與序列辨識

號：2 具有至少一置換，該置換係擇自由下列所組成之群組：序列辨識號：1 之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為羥丁胺酸、序列辨識號：1 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸、序列辨識號：2 之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺、序列辨識號：2 之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸、序列辨識號：2 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸與序列辨識號：2 之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸，且其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明提供另一種人源化之單株抗體的胺基酸序列，包括：一輕鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：6 的序列，其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明也提供一種人源化之單株抗體的核苷酸序列，包括：一輕鏈之變異區的核苷酸序列，其包括序列辨識號：7 的序列；以及一重鏈之變異區的核苷酸序列，其包括序列辨識號：8 的序列，其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明又提供一種人源化之單株抗體，包括：一輕鏈，該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：1 的序列；以及一重鏈，該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：2 的序列，其中序列辨識號：1 之序列與序列辨識號：2 之序列具有至少一置換，該置換係擇自由下列所組成之群組：序列辨識號：1 之第 10 個胺基酸由異白胺酸置換為

羥丁胺酸、序列辨識號：1 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸、序列辨識號：2 之第 2 個胺基酸由離胺酸置換為穀胺醯胺、序列辨識號：2 之第 10 個胺基酸由色胺酸置換為白胺酸、序列辨識號：2 之第 18 個胺基酸由離胺酸置換為精胺酸與序列辨識號：2 之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸，其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明另提供一種人源化之單株抗體，包括：一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明還提供一種人源化單株抗體用於中和可溶性腫瘤壞死因子 α 的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，且其中該人源化單株抗體與可溶性腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明提供一種人源化單株抗體用於引起抗體依賴型細胞介毒殺作用的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，且其中該人源化單株抗體與穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合。

本發明也提供一種人源化單株抗體人源化單株抗體用

於製備治療與穿膜型腫瘤壞死因子 α 相關之疾病的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，且其中該人源化單株抗體與穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【實施方式】

在本發明一態樣中，本發明提供一人源化單株抗體之胺基酸序列，其中此人源化單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合，而腫瘤壞死因子 α 可為人類腫瘤壞死因子 α 。上述人源化單株抗體之胺基酸序列可包括一輕鏈變異區之胺基酸序列與一重鏈變異區之胺基酸序列。在一實施例中，上述本發明人源化單株抗體之胺基酸序列為一免疫球蛋白 G (IgG) 抗體之胺基酸序列，其可包括一輕鏈變異區之胺基酸序列、一重鏈變異區之胺基酸序列與人類免疫球蛋白 G 保守區域的胺基酸序列。

在一實施例中，本發明人源化單株抗體之輕鏈變異區的胺基酸序列與重鏈變異區的胺基酸序列可藉由對與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗體執行變異區表面重組 (variable domain resurfacing) 來獲得。

首先，取得一與腫瘤壞死因子 α 結合的非人類單株抗

胺酸與序列辨識號：2 之第 41 個胺基酸由麩胺酸置換為甘胺酸。

在另一實施例中，前述本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的單株抗體之輕鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：1 之序列而重鏈變異區胺基酸序列可包括序列辨識號：2 之序列，且前述本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的單株抗體之變異區胺基酸序列相似度最高之人類序列為 PPS4 之輕鏈變異區序列（序列辨識號：3）與重鏈變異區序列（序列辨識號：4），而在進行前述序列比對後，所獲得之與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體之輕鏈變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 而重鏈變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6。因此，本發明與腫瘤壞死因子 α 結合的人源化單株抗體可含有包括序列辨識號：5 之輕鏈變異區胺基酸序列及包括序列辨識號：6 之重鏈變異區胺基酸序列。

可與本發明之人源化單株抗體結合之腫瘤壞死因子 α 包括可溶性腫瘤壞死因子 α 或穿膜型腫瘤壞死因子 α 。本發明之人源化單株抗體對可溶性腫瘤壞死因子 α 的親和力可為約 20-40 nM，較佳為約 10-20 nM。

又，本發明之人源化單株抗體對穿膜型腫瘤壞死因子 α 的親和力可為約 20-40 nM，較佳為約 10-20 nM。在一實施例中，本發明之人源化單株抗體對穿膜型腫瘤壞死因子 α 的親和力可為約 16.8 nM。

又，在一實施例中，本發明之人源化單株抗體可藉由與表現於細胞上之穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合，而引起抗

體依賴型細胞仲介毒殺作用。

目前已知，穿膜型腫瘤壞死因子 α 與許多疾病相關。例如偏好細胞表面表現之穿膜型腫瘤壞死因子 α 的巨噬細胞與單核球細胞在肉芽腫性疾病 (granulomatous disease)，例如克隆氏症 (Crohn's disease) 與韋格納肉芽腫 (Wegener's granulomatosis) 中扮演一非常重要的角色，且藉由抗體依賴型細胞仲介毒殺作用可將細胞直接殺死 (Beenhouwer et al., 2004)。

而根據上述，由於本發明之人源化單株抗體具有與穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合之能力且具有引起抗體依賴型細胞仲介毒殺作用的能力，因此，在本發明又另一態樣中，本發明可提供本發明之人源化單株抗體用於結合穿膜型腫瘤壞死因子 α 的用途以及用於引起抗體依賴型細胞仲介毒殺作用的用途。

此外，本發明之人源化單株抗體也可應用於製備治療與穿膜型腫瘤壞死因子 α 相關之疾病之藥物的用途。

【實施例】

材料與方法

A. 與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體

1. 與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體的獲得與純化

將產生與人類腫瘤壞死因子 α 結合之鼠源單株抗體的融合瘤 (hybridoma) 細胞株 357-104-4 (ECACC No. 92030603) (購自 European Collection of Cell Cultures) 注

序列表

【序列編號】

<110> 財團法人工業發展研究院

<120> 人源化之單株抗體、其核苷酸序列與其用途

<160> 14

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ile Thr Ser Ala Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met

20

25

30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35

40

45

Asp Ala Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65

70

75

80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Tyr Ser Pro Arg

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly Ser

1

5

10

15

10年11月1日修訂(換頁)

(原)

<212> DNA

<213> 人工

<222>

<223> 人工引子

<400> 14

cagcggccgc tgaggagacg gtgaccgtgg t

31

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99135701

※ 申請日：99.10.20

※IPC 分類：C07K16/30, C12N15/11

一、發明名稱：(中文/英文)

人源化之單株抗體、其核苷酸序列與其用途
/Humanized monoclonal antibody, nucleotide sequence thereof, and use thereof

二、中文發明摘要：

本發明提供一種人源化之單株抗體的胺基酸序列，包括：一輕鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：5 的序列；以及一重鏈之變異區的胺基酸序列，其包括序列辨識號：6 的序列，其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

三、英文發明摘要：

The invention provides an amino sequence of a humanized monoclonal antibody, including: an amino sequence of a variable region of a light chain including SEQ ID. No.: 5; and an amino sequence of a variable region of a heavy chain including SEQ ID. No.: 6, wherein the humanized monoclonal antibody binds to tumor necrosis factor-alpha.

七、申請專利範圍：

1. 一種人源化之單株抗體，包括：

一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及

一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，

其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之人源化之單株抗體，其中該腫瘤壞死因子 α 為人類腫瘤壞死因子。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之人源化之單株抗體，其中該腫瘤壞死因子 α 包括可溶性腫瘤壞死因子 α 或穿膜型腫瘤壞死因子 α 。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之人源化之單株抗體，其中該人源化之單株抗體對該穿膜型腫瘤壞死因子 α 之親和力為約 20-40 nM。

5. 一種人源化之單株抗體的核苷酸序列，包括：

一輕鏈之變異區的核苷酸序列，其包括序列辨識號：7 的序列；以及

一重鏈之變異區的核苷酸序列，其包括序列辨識號：8 的序列，

其中該單株抗體與腫瘤壞死因子 α 結合。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之人源化之單株抗體的核苷酸序列，其中該腫瘤壞死因子 α 為人類腫瘤壞死因子。

7. 一種人源化單株抗體用於體外中和可溶性腫瘤壞

死因子 α 的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：

一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及

一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，

且其中該人源化單株抗體與可溶性腫瘤壞死因子 α 結合。

8. 一種人源化單株抗體用於體外引起抗體依賴型細胞介毒殺作用的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：

一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及

一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，

且其中該人源化單株抗體與穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合。

9. 一種人源化單株抗體用於製備治療與穿膜型腫瘤壞死因子 α 相關之疾病之藥物的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：

一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及

一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，

且其中該人源化單株抗體與穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合。

10. 一種人源化單株抗體用於製備中和可溶性腫瘤壞死因子 α 之試劑的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：

一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及

一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，

且其中該人源化單株抗體與可溶性腫瘤壞死因子 α 結合。

11. 一種人源化單株抗體用於製備引起抗體依賴型細胞介質毒殺作用之試劑的用途，其中該人源化之單株抗體，包括：

一輕鏈，其中該輕鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：5 的序列；以及

一重鏈，其中該重鏈之變異區的胺基酸序列包括序列辨識號：6 的序列，

且其中該人源化單株抗體與穿膜型腫瘤壞死因子 α 結合。

19年12月18日修(更)正替換頁

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。