

**發明專利說明書**

PD1084404

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：**97134377**※ 申請日期：**P.7, P.8**

※IPC 分類：

C07K16/34 (2006.01)

C12N15/10 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

**一、發明名稱：**(中文/英文)

人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質

HUMAN GM-CSF ANTIGEN BINDING PROTEINS

**二、申請人：**(共 1 人)姓名或名稱：**(中文/英文)**

應用分子基因公司

AMGEN INC.

代表人：**(中文/英文)**

路易士奧德蘭伽德納/LOUISE AUDHLAM-GARDINER

住居所或營業所地址：**(中文/英文)**

美國加州 91320-1799 千橡安基中心道 1 號

One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799, U.S.A.

國籍：**(中文/英文)**

美國/United States of America

**三、發明人：**(共 5 人)姓名：**(中文/英文)**

1. 多芙尼包羅尼/BARONE, DAUPHINE

2. 肯尼士 A. 布萊瑟/BRASEL, KENNETH A.

3. 約瑟卡洛斯艾斯寇巴/ESCOBAR, JOSE CARLOS

4. 賈桂琳 A. 柯克納/KIRCHNER, JACQUELINE A.

5. 卡拉奧爾森/OLSON, KARA

國籍：(中文/英文)

1.~5.美國/United States of America

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- |      |           |            |
|------|-----------|------------|
| 1.美國 | 2007/9/18 | 60/994,343 |
| 2.美國 | 2008/8/8  | 61/087,551 |

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

(說明：本案專利說明書已詳載所利用之生物材料易於取得之事實。)

國籍：(中文/英文)

1.~5.美國/United States of America

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- |      |           |            |
|------|-----------|------------|
| 1.美國 | 2007/9/18 | 60/994,343 |
| 2.美國 | 2008/8/8  | 61/087,551 |

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

(說明：本案專利說明書已詳載所利用之生物材料易於取得之事實。)

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明是關於結合至人類 GM-CSF 蛋白質之抗原結合蛋白質。

### 【先前技術】

顆粒細胞巨噬細胞群落刺激因子 (Granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF); CSF2)是被已充分研究的蛋白質，經長期觀察得知其具有造血特性(亦即骨髓系統之前驅細胞(progenitor cells)的增殖及分化之刺激以及成熟細胞的增殖)(評論於 Blood 77:1131, 1991; Rev Infect Dis 12: 41, 1990; Med. Oncol. 13:141, 1996)。GM-CSF 是由肺上皮細胞及腸的潘氏細胞(Paneth cells)基本持續地產生(BBRC 312:897, 2003)，但有廣泛種類的細胞表現 GM-CSF 是隨來自 T 細胞、巨噬細胞/單核球(monocyte)、纖維母細胞及內皮細胞之顯著表現而活化(J Infect Dis 172:1573, 1995; J Infect Dis 185:1490, 2002; J Allergy Clin Immunol 112:653, 2003)。GM-CSF 受體(GM-CSFR; CSFR2)由兩種蛋白質的異質複合體所組成，即一種專一於 GM-CSF 之親和力高  $\alpha$  多胜肽以及一種由 GM-CSF、IL-3 及 IL-5 共享之親和力低共有  $\beta$  多胜肽(評論於 J Allergy Clin Immunol 112:653, 2003; Cytokine and Growth Factor Reviews 12:19, 2001)。GM-CSFR 表現在骨髓系統的所有細胞。

GM-CSF 提高天生的免疫系統的活性，其係經由仲介導致或影響骨髓系統細胞，包括巨噬細胞/單核球、樹突細胞(DCs)、嗜中性白血球及嗜伊紅白血球的分化、存活、增殖

及活化之訊息(評論於：J Immun 143:1198, 1989; Rev Infect Dis 12:41, 1990; Blood 77:1131, 1991; Trends in Immun. 23:403, 2002; Growth Factors 22:225, 2004)。GM-CSF 是活體外 (*in vitro*) 製造單核球衍生之 DCs 及第 1 型巨噬細胞之重要因子 (PNAS 101:4560, 2004)，且已顯示在活體內 (*in vivo*) 誘發 DCs 的分化及活化 (Blood 95:2337, 2000)。GM-CSF 存在所製造之人類單核球衍生之巨噬細胞 (第 1 型巨噬細胞)，產生高水平的發炎前驅細胞激素，例如 IL-23 但不是 IL-12；反之 M-CSF (CSF1) 存在所製造之第 2 型巨噬細胞，產生抗發炎性細胞激素，例如 IL-10 但不是 IL-23 (PNAS 101: 4560, 2004)。

經 GM-CSF 刺激之人類單核球或巨噬細胞具有增加的功能，包括細胞毒性、其他發炎前驅細胞激素 (IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  及 IL-6) 的產生及吞噬作用。基於這些作用，近來致力研發 GM-CSF 作為有效的佐劑用於感染性疾病或與疫苗投與 (評論於 Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13::S47, 1994; Curr Opin Hematol. 7:168, 2000)。的確，某些臨床環境背景下投與 rhGM-CSF 可戲劇性地改善真菌感染的結果及清除 (Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13: S18, 1994; J Med Microbiol 47: 1998)。

微神經膠細胞 (microglia) 是 CNS 的固有巨噬細胞，以及活體外研究的數據指出 GM-CSF 是一關鍵細胞激素，其增強胎兒及成人微神經膠細胞的存活、活化、增殖、甚至分化 (Glia 12:309, 1994; J Immunol Methods 300:32, 2005)。此外有數個小鼠 MS 模式研究報告提供 APCs (微神經膠細胞或 DCs) 於 CNS 血管週隙對於疾病開始及持續扮演關鍵角色之證據 (Nat. Med.

11:146,, 2005; Nat. Med. 11:328, 2005; Nat. Med. 11:335, 2005)。微神經膠細胞的 GM-CSF 刺激向上調節 MHCII 並增強抗原呈現。

只有近來已發表，GM-CSF 在疾病中扮演發炎前驅細胞激素之角色，且非必要性作為造血生長因子(評論於 Trends in Immun. 23: 403, 2002; Growth Factors 22: 225, 2004)，以及其於導致或增強發炎性/自體免疫疾病之角色。

在多發性硬化症 (MS)、類風濕性關節炎 (RA)、氣喘、牛皮癬、異位性皮膚炎及類肉瘤病 (sarcoidosis) 的發炎局部位置，已觀察到含量水平提高的 GM-CSF。血清中通常不會觀察到 GM-CSF 提高，因此決定疾病關聯性需要分析標的組織。有兩個臨床研究在 MS 中進行，其中經由 ELISA 測量具疾病進展中之復發-緩解型 (RR)MS 病患(組織收集 2 週內有新症狀或現有症狀惡化)的腦脊髓液 (CSF) 及血清之 GM-CSF 蛋白質含量，以及與具穩定疾病之 RRMS 病患(前 6 個月無事件狀況)或其他神經性疾病 (OND) 對照組比較 (Eur Neurol 33:152,1993; Immunopharmacol. Immunotoxicol. 20:373,1998)。重要地，OND 對照組不包括阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 或血管性癡呆症 (vascular dementia) 病患，因為已報告此等病患的 CSF 及血清中高額地增加 GM-CSF 含量 (Acta Neurol Scand 103:166, 2001)。

GM-CSF 含量在低的 pg 範圍，但相較於穩定疾病 CSF，GM-CSF 在疾病進展中 RRMS 顯著較高；以及相較於 OND CSF，在疾病進展中 MS CSF 顯著較高。此外，進展中疾病相對於穩定疾病之 CSF 有較高含量 TNF- $\alpha$ ，以及穩定疾病

相對於進展中疾病之 CSF 有較高含量 TGF- $\beta$  和 IL-10。該研究包括關於病患不間斷治療之非常仔細的內含物判斷標準以及進展中疾病相對於穩定疾病的臨床定義，以及樣本收集的同步性。有趣地是任何組別之間，血清的 GM-CSF 含量無顯著差異。此外，一研究在 MS 損害的星狀細胞中觀察 GM-CSF 之選擇性免疫組織化學偵測，但不於對照組 CNS 白質 (n=3 MS 捐贈者，*Glia* 12:309, 1994)。最後，隨發炎反應期間的活化，經活化之 T 細胞及單核球/巨噬細胞能產生大量 GM-CSF。有足夠證據證明在 MS 損害中存在這兩種細胞類型 (*Ann Neurol.* 47:707, 2000)，以及 CSF 中有 T 細胞 (評論於 *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 1:257, 2001)。

除 GM-CSF 表現與 MS 有關聯之外，對於其他發炎/自體免疫疾病有許多疾病關聯數據，以及甚至一些證據對於給予外源性 GM-CSF 使疾病惡化。相較於 OA (生物分析，*Clin. Exp. Immunol.* 72:67, 1988) 以及相較於非 RA 對照組 (生物分析，*Rheumatol Int.* 14:177, 1995)，在 RA 方面已於具 RA 或牛皮癬性關節炎 (Psoriatic Arthritis; PsA) 之病患滑液 (SF) 偵測到提高含量之 GM-CSF。此外，CD68+ 巨噬細胞存在於關節與 RA 病患疾病嚴重度之間有強烈關聯性 (*Ann Rheum Dis* 64:834, 2005)。最後，已發表具費爾蒂氏症候群 (Felty's syndrome) (嗜中性白血球減少症) 之 RA 病患的 GM-CSF 處理可使疾病惡化 (*Blood* 74:2769, 1989)。

在氣喘方面，經由免疫組織化學已發現氣喘病患之支氣管切片的 GM-CSF 含量提高，以及觀察到類固醇處理後

GM-CSF 含量降低與增加於 FEV1 之間有關聯性 (Chest 105:687,1994; Am Rev Respir Dis 147:1557, 1993)。也已報告在時斷時續的輕微氣喘病患痰中 GM-CSF 含量提高 (Ann Allergy Asthma Immunol 86:304, 2001)。支持 GM-CSF 之拮抗作用的數據，包括研究經由抗-GM-CSF mAb 減弱有症狀病患 BALF 之嗜伊紅白血球促進活性 (活體外，Eur. Respir. J. 12:872, 1998)。

在牛皮癬方面，在牛皮癬皮膚偵測到 GM-CSF 表現，但未於對照組皮膚樣本偵測到 (Arch Dermatol Res. 287:158, 1995; Clin Exp Dermatol. 19:383, 1994; Dermatologica. 181:16, 1990)。也已發表牛皮癬之 GM-CSF 處理能惡化疾病 (Br J Dermatol. 128:468, 1993)。

在異位性皮膚炎 (AD) 方面，經由原位雜交在慢性 AD 的損傷組織切片，比在急性 AD 或無損傷皮膚偵測到顯著高數量表現 GM-CSF mRNA 的細胞 ( $p < 0.05$ ; J Clin Invest. 95:211, 1995)。在第二項研究中，經由損傷的 AD 皮膚 (表皮及真皮部分二者) 之免疫組織化學法偵測到更高含量的 GM-CSF; 以及相較於非異位性皮膚炎對照組的角化細胞，建立自 AD 病患未涉及之皮膚的角化細胞培養顯現自動增加及 PMA-刺激製造 GM-CSF (J Clin Invest. 99:3009, 1997)。

由多個團體製造缺乏 GM-CSF (Science 264:713, 1994; PNAS 91:5592, 1994) 及 GM-CSFRc (Immunity 2:211, 1995; PNAS 92:9565, 1995) 之小鼠。在造血作用之穩定狀態水平中無明顯差異，但有肺泡蛋白質沉著症 (alveolar proteinosis) 的組織學證據之小鼠，更易受感染，且在 IgG 製造呈現適度的延遲，以及在



KLH 免疫之後減小抗原專一性 T 細胞反應 (PNAS 94:12557, 1997)。GM-CSF<sup>-/-</sup>小鼠對 MOG35-55 誘發之 EAE (J Exp Med.194:873, 2001)、膠原蛋白誘發之關節炎 (CIA; JI 161:3639, 1998)以及 mBSA/IL-1 誘發之關節炎 (Arthritis Rheum 44:111, 2001)有抗性。相較之下，已在數個實驗室製造出 GM-CSF 基因轉殖 (Tg)小鼠，且其與發炎/自體免疫疾病的發展有關聯 (Cell 51:675, 1987; JI 166:2090, 2001; J Clin Invest 97:1102, 1996; J Allergy Clin Immunol 111:1076, 2003; Lab Invest 77:615, 1997)。

因此所屬技藝對於 GM-CSF 抑制劑有需求。

#### 【發明內容】

提供結合 GM-CSF(尤其是人類 GM-CSF)之抗原結合蛋白質。人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質能抑制、妨礙或調整至少一種有關 GM-CSF 之生物反應，且因此可用於改善 GM-CSF 有關疾病或失調的影響。因此某些抗原結合蛋白質結合至 GM-CSF 能抑制、妨礙或阻斷 GM-CSF 傳訊息，降低單核球遷移到腫瘤，以及降低腫瘤相關巨噬細胞 (TAMs)的積聚。

也提供表現系統，包括製造 GM-CSF 抗原結合蛋白質用之細胞株以及診斷及治療有關人類 GM-CSF 疾病之方法。

提供之某些經單離之抗原結合蛋白質含有：(A)一個或一個以上選自由下所組群組之重鏈互補決定區域 (CDRH)：(i) 選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；(ii)選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、

71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；(iii)選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；以及(iv)一(i)、(ii)及(iii)之 CDRH，含有不超過 4 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；(B)一個或一個以上選自由下所組群組之輕鏈互補決定區域(CDRL)：(i)選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；(ii)選自由所 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 組群組之 CDRL2；(iii)選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；以及(iv)一(i)、(ii)及(iii)之 CDRL，含有不超過 4 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；或(C)一個或一個以上的(A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的(B)之輕鏈 CDRL。

在一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質可含有至少一或兩個上述(A)之 CDRH 以及至少一或兩個上述(B)之 CDRL。又在另一態樣，經單離之抗原結合蛋白質包括 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 及 CDRL3。

此外，上述(A)之 CDRH 進一步選自由下所組群組：(i)選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；(ii)選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；(iii)選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、

132 及 144 所組群組之 CDRH3；以及 (iv) — (i)、(ii) 及 (iii) 之 CDRH，含有不超過 2 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；上述 (B) 之 CDRH 是選自由下所組群組：(i) 選自由 SEQ ID NO: 4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；(ii) 選自由 SEQ ID NO: 5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2；(iii) 選自由 SEQ ID NO: 6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；以及 (iv) — (i)、(ii) 及 (iii) 之 CDRL，含有不超過 2 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；或 (C) 一個或一個以上的 (A) 之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的 (B) 之輕鏈 CDRL。

又在另一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質可含有：(A) 選自由下所組群組之 CDRH：(i) 選自由 SEQ ID NO: 10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii) 選自由 SEQ ID NO: 11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，(iii) 選自由 SEQ ID NO: 12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；(B) 選自由下所組群組之 CDRL：(i) 選自由 SEQ ID NO: 4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii) 選自由 SEQ ID NO: 5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(iii) 選自由 SEQ ID NO: 6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；或

(C)一個或一個以上的(A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的(B)之輕鏈 CDRL。在一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質可包括：(A)選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；以及(B)選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2 及選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3。在另一具體例中，可變重鏈(VH)具有至少 90%序列相同於選自由 SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129 及 141 所組群組之胺基酸序列，及/或可變輕鏈(VL)具有至少 90%序列相同於選自由 SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、123 及 135 所組群組之胺基酸序列。在進一步之一具體例中，VH 是選自由 SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129 及 141 所組群組，及/或 VL 是選自由 SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、123 及 135 所組群組。

在另一態樣，提供經單離之抗原結合蛋白質專一結合至含 GM-CSF 序列之抗原決定基(epitope)，其中結合至 GM-CSF 之抗體在含 GM-CSFR 的細胞中拮抗 GM-CSF 仲介之傳訊息

的活化。

又在另一態樣，提供結合 GM-CSF 之經單離之抗原結合蛋白質，其含有：(A)一個或一個以上選自由下所組群組之重鏈 CDRs(CDRH)：(i)一種 CDRH1 具有至少 80%相同於選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii)一種 CDRH2 具有至少 80%相同於選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，(iii)一種 CDRH3 具有至少 80%相同於選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；(B)一個或一個以上選自由下所組群組之輕鏈 CDRs(CDRL)：(i)一種 CDRL1，其為 80%相同於選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii)一種 CDRL2，其為 80%相同於選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(iii)一種 CDRL3，其為 80%相同於選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；或(C)一個或一個以上的(A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的(B)之輕鏈 CDRL。在一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質包括：(A)一個或一個以上選自由下所組群組之 CDRH：(i)一種 CDRH1 具有至少 90%相同於選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii)一種 CDRH2 具有至少 90%相同於選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143

所組群組之 CDRH2，(iii)一種 CDRH3 具有至少 90%相同於選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；(B)一個或一個以上選自由下所組群組之 CDRL：(i)一種 CDRL1，其為至少 90%相同於選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii)一種 CDRL2，其為至少 90%相同於選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(iii)一種 CDRL3，其為至少 90%相同於選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；或(C)一個或一個以上的(A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的(B)之輕鏈 CDRL。

在另一態樣，提供一種結合 GM-CSF 之經單離之抗原結合蛋白質，該抗原結合蛋白質包括：A)選自由下所組群組之重鏈互補決定區域(CDRH)：(i)一種選自由 SEQ ID NOs:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3，(ii)一種 CDRH3，其胺基酸序列與(i)之 CDRH3 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，(iii)一種選自由  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8FDX_9$ (SEQ ID NO:83)所組群組之 CDRH3 胺基酸序列，其中  $X_1$  是選自由 E 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_3$  是選自由 P、D 及 G 所組群組， $X_4$  是選自由 Y、W、R 及 K 所組群組， $X_5$  是選自由 S、W、F 及 T 所組群組， $X_6$  是選自由 Y 及 L 所組群組， $X_7$  是選自由 D 及 G 所組群組， $X_8$  是

選自由 Y、無胺基酸及 A 所組群組，以及 X<sub>9</sub> 是選自由 M、T 及 V 所組群組；及 / 或 B) 選自由下所組群組之輕鏈互補決定區域 (CDRL)：(i) 一種選自由 SEQ ID NOs: 6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3，(ii) 一種 CDRL3，其胺基酸序列與 (i) 之 CDRL3 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，以及 iii) 一種選自由下所組群組之 CDRL3 胺基酸序列：X<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>T (SEQ ID NO: 84)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 Q 及 L 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 Y 及 S 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 D、G 及 F 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 R、T 及 S 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 S 及 V 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 F 及 P 所組群組，以及 X<sub>7</sub> 是選自由 R 及 W 所組群組；以及 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>DSSNX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 89)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 S 及 A 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 S 及 A 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 W 及 F 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 D 及 T 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 G、W 及無胺基酸所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 V、L 及 P 所組群組，以及 X<sub>7</sub> 是選自由 V 及無胺基酸所組群組。

在另一具體例中，抗原結合蛋白質進一步含有：A) 選自由下所組群組之 CDRH：(i) 一種選自由 SEQ ID NOs: 10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii) 一種 CDRH1，其以不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代不同於 (i) 之 CDRH1，(iii) 一種胺基酸序列選自由 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>FX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 94) 所組群組之 CDRH1，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 G 及無胺基酸所組群組，X<sub>2</sub> 是選

自由 G 及無胺基酸所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 Y 及 F 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 T 及 S 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 T、S 及 G 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 G 及 S 所組群組，X<sub>7</sub> 是選自由 Y 及 G 所組群組，X<sub>8</sub> 是選自由 I 及 M 所組群組，以及 X<sub>9</sub> 是選自由 H 及 S 所組群組，或 (iv) 一種選自由 SEQ ID NOs:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRH2，(v) 一種 CDRH2，其胺基酸序列 (iv) 之 CDRH2 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，或 (vi) 一種由 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>G (SEQ ID NO:106) 組成之 CDRH2 胺基酸序列，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 W 及無胺基酸所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 I 及 Y 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 N、S 及 I 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 P、A 及 Y 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 N 及 Y 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 S 及 N 所組群組，X<sub>7</sub> 是選自由 G 及 N 所組群組，X<sub>8</sub> 是選自由 T 及 R 所組群組，X<sub>9</sub> 是選自由 N 及 D 所組群組，X<sub>10</sub> 是選自由 Y 及 S 所組群組，X<sub>11</sub> 是選自由 A 及 N 所組群組，X<sub>12</sub> 是選自由 Q 及 R 所組群組，X<sub>13</sub> 是選自由 K 及 R 所組群組，X<sub>14</sub> 是選自由 F 及 L 所組群組，以及 X<sub>15</sub> 是選自由 Q、K 及 R 所組群組；或 B) 選自由下所組群組之 CDRL：(i) 一種選自由 SEQ ID NOs:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii) 一種 CDRL1，其胺基酸序列與 (i) 之 CDRL1 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，(iii) 一種選自由下所組群組之 CDRL1 胺基酸序列：KSSQSX<sub>1</sub>XLYSSX<sub>2</sub>NX<sub>3</sub>NX<sub>4</sub>LX<sub>5</sub> (SEQ ID



NO:107), 其中  $X_1$  是選自由 V 及 I 所組群組,  $X_2$  是選自由 S 及 N 所組群組,  $X_3$  是選自由 E 及 K 所組群組,  $X_4$  是選自由 Y 及 F 所組群組, 以及  $X_5$  是選自由 T 及 A 所組群組;

RAS $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YX_7X_8$ (SEQ ID NO:118), 其中  $X_1$  是選自由 Q 及 P 所組群組,  $X_2$  是選自由 S 及 Y 所組群組,  $X_3$  是選自由 V、L 及 I 所組群組,  $X_4$  是選自由 S 及 C 所組群組,  $X_5$  是選自由 S 及 N 所組群組,  $X_6$  是選自由 S、I、T 及無胺基酸所組群組,  $X_7$  是選自由 F 及 L 所組群組, 以及  $X_8$  是選自由 A 及 N 所組群組, 或  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YX_7X_8X_9X_{10}NX_{11}VX_{12}$  (SEQ ID NO:125), 其中  $X_1$  是選自由 I、S 及 T 所組群組,  $X_2$  是選自由 R 及 G 所組群組,  $X_3$  是選自由 T 及 S 所組群組,  $X_4$  是選自由 R 及 S 所組群組,  $X_5$  是選自由 G 及 S 所組群組,  $X_6$  是選自由 S、H 及 D 所組群組,  $X_7$  是選自由 I 及 V 所組群組,  $X_8$  是選自由 A 及 G 所組群組,  $X_9$  是選自由無胺基酸及 G 所組群組,  $X_{10}$  是選自由 S 及 Y 所組群組,  $X_{11}$  是選自由 Y 及 T 所組群組, 以及  $X_{12}$  是選自由 Q、N 及 S 所組群組, 或 (iv) 一種選自由 SEQ ID NOs: 5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2, (v) 一種 CDRL2, 其胺基酸序列與 (iv) 之 CDRL2 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代, 或 (vi) 一種選自由下所組群組之 CDRL2 胺基酸序列:  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$  (SEQ ID NO:130), 其中  $X_1$  是選自由 G、T 及 W 所組群組,  $X_2$  是選自由 T 及 A 所組群組,  $X_3$  是選自由 S 及 A 所組群組,  $X_4$  是選自由 S 及 T 所組群組,  $X_5$  是選自由 R 及 L 所組群組,  $X_6$

是選自由 A、E 及 Q 所組群組，以及 X<sub>7</sub> 是選自由 T 及 S 所組群組；或 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>RPS(SEQ ID NO:131)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 E 及 S 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 D、V 及 N 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 D、S 及 N 所組群組，以及 X<sub>4</sub> 是選自由 Q、G 及 H 所組群組。

在一態樣，文中提供之經單離之抗原結合蛋白質可為單株抗體，多株抗體，重組抗體，人類抗體，人類化抗體，嵌合型抗體，多專一性抗體或其抗體片段。在另一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質的抗體片段可為 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')<sub>2</sub> 片段，Fv 片段，雙鏈抗體(diabody)或單鏈抗體分子。在進一步之一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質是人類抗體且能為 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4。

又在另一態樣，經單離之抗原結合蛋白質可偶合至標記基並能與所提供經單離之抗原結合蛋白質之一抗原結合蛋白質競爭結合至人類 GM-CSF 的細胞外部分。

又在另一態樣，經單離之抗原結合蛋白質與文中提供之抗原結合蛋白質競爭結合至人類 GM-CSF 受體互相作用部分。在一具體例中，抗原結合蛋白質是單株抗體，多株抗體，重組抗體，人類抗體，人類化抗體，嵌合型抗體，多專一性抗體或其抗體片段。在相關具體例中提供人類及單株抗體以及包括 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fv 片段之抗原片段，雙鏈抗體(diabody)或單鏈抗體分子。在其他具體例中，抗原結合蛋白質是 IgG1-、IgG2-、IgG3-或 IgG4-型。再者所提供為偶合至標記基之經單離之抗原結合蛋白質。

又在另一態樣，本發明進一步預期抑制 GM-CSF 活性以限制導致或影響包括巨噬細胞/單核球、樹突細胞(DC)、嗜中性白血球及嗜伊紅白血球之骨髓系統細胞分化、存活、增殖及活化的訊息，及/或 DC 分化及/或活化訊息。此外，本發明預期抑制 GM-CSF 活性以限制單核球衍生之巨噬細胞(第 1 型巨噬細胞)產生高程度的發炎前驅細胞激素，例 IL-23。

在另一態樣，所提供為編碼結合至 GM-CSF 之抗原結合蛋白質之經單離多核苷酸，其中該經單離多核苷酸是可操作地連接(operably linked)到一調節序列。

在另一態樣，所提供為表現載體及經表現載體(其含有前述編碼能結合至 GM-CSF 之抗原結合蛋白質之經單離多核苷酸)轉形或轉染之宿主細胞。

在另一態樣，所提供為製備抗原結合蛋白質之方法，其包括從分泌抗原結合蛋白質之宿主細胞製備抗原結合蛋白質之步驟。

又在另一態樣，提供一種醫藥組成物，含有至少一前述提供之抗原結合蛋白質以及醫藥可接受賦形劑。在一具體例中，醫藥組成物可含有選自由放射性同位素、放射性核種、毒素或治療性及化學治療性基團所組群組之額外活性劑。

又在另一態樣，提供一種於病人治療或預防與 GM-CSF 有關症狀之方法，包括對病人投與有效量之至少一種經單離之抗原結合蛋白質。在一具體例中，症狀是選自由風濕病疾病、自體免疫疾病、血液疾病、腫瘤疾病、發炎疾病、神經

系統之退化症狀、胃腸道、胃尿道症狀、內分泌失調等等所組群組。在一具體例中，症狀是選自由多發性硬化症(MS)、類風濕性關節炎(RA)、氣喘、牛皮癬、異位性皮膚炎及類肉瘤病(sarcoidosis)之失調或疾病所組群組。在另一具體例中包括單獨以經單離之抗原結合蛋白質之治療或以組合治療。又在另一具體例中，症狀是選自乳癌、前列腺癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、胃癌、星狀細胞癌(astrocytic cancer)、子宮內膜癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臟癌以及卵巢癌。

在另一態樣，本發明提供一種在病人抑制 GM-CSF 結合至 GM-CSFR 細胞外部分之方法，包括投與有效量之至少一種文中提供之抗原結合蛋白質。

又在另一態樣，本發明提供一種在病人抑制人類 GM-CSFR 磷酸化之方法，包括投與有效量之至少一種文中所述之抗原結合蛋白質。

又在另一態樣，當經單離之抗原結合蛋白質投與至病人時，降低單核球趨化性。在一具體例中，抗原結合蛋白質抑制單核球遷移。又在另一具體例中，當經單離之抗原結合蛋白質投與至病人時，單核球遷移到腫瘤被抑制。

又在另一態樣，進一步提供一種治療多發性硬化症之方法，包括投與文中所述經單離之抗原結合蛋白質。

所預期之多發性硬化症為復發-緩解型多發性硬化症、惡化-復發型多發性硬化症、原發性漸進型多發性硬化症或蓄發性漸進型多發性硬化症。

又在一態樣所提供為一種治療類風濕性關節炎之方法，包括投與文中所述經單離之抗原結合蛋白質。

又在一態樣是提供經單離之抗原結合蛋白質，其以人類 GM-CSF 的 1 對數範圍內與食蟹獼猴 GM-CSF 交叉反應，且其在 GM-CSF 依存性分析測量以  $IC_{50} < 1 \text{ nM}$  結合 GM-CSF。

這些及其他態樣將於文中更詳細說明。所提供之各態樣可包括文中提供之各種具體例。因此預期包括一個要素或要素組合之每一具體例能包括於所述之每一態樣。所揭示之其他特性、目的及優點在之後的詳細說明中是顯而易見。

### 【實施方式】

#### 詳細說明

應瞭解本發明不受限於文中所述之特定方法論、步驟程序以及試劑等等，且就其本身而論可變化。文中使用之專門用語之目的僅為敘述特殊具體例，且不因此限制所揭示之範圍，範圍只由申請專利範圍定義。

本發明之方法及技術通常根據所屬技術領域熟知的慣用方法，以及敘述於本說明書從頭到尾所引用及討論的各種一般的及更專一的參考資料來實施。例如參閱 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) and Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)。

用語“多核苷酸”包括單股及雙股核苷酸，以及包括基因

體 DNA, RNA, mRNA, cDNA, 或來自合成或其與正常天然所見序列無關聯之某些組合。含有具體指定序列之經單離多核苷酸, 除具體指定序列之外可包括用於至多十個或甚至多達二十個其他蛋白質或其部分之編碼序列, 或可包括可操作地連接 (operably linked) 調節序列 (該調節序列控制所述核酸序列之編碼區域的表現), 及/或可包括載體序列。含有該多核苷酸之核苷酸可為核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸或任一種核苷酸的修飾型。該修飾包括鹼基修飾, 例如溴尿苷 (bromouridine) 及肌苷 (inosine) 衍生物; 核糖修飾, 例如 2',3'-二去氧核糖; 以及核苷酸間連接修飾, 例如硫代磷酸化 (phosphorothioate), 二硫代磷酸化 (phosphorodithioate), 硒代磷酸化 (phosphoroselenoate), 二硒代磷酸化 (phosphorodiselenoate), 安利硫代磷酸化 (phosphoroanilo-thioate), 安利磷酸化 (phosphoraniladate) 以及醯胺磷酸化 (phosphoroamidate)。

用語“寡核苷酸”意指含有 100 或更少核苷酸之多核苷酸。在某些具體例中, 寡核苷酸長度為 10 至 60 個鹼基。在其他具體例中, 寡核苷酸長度為 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 至 40 個核苷酸。寡核苷酸可為單股或雙股, 例如用於構築突變基因。寡核苷酸可為有意義或反意義寡核苷酸。寡核苷酸能包括用於偵測分析之可偵測標記, 例如放射性標記, 螢光標記, 半抗原 (hapten) 或抗原標記。寡核苷酸可使用作為例如 PCR 引子, 選殖用引子或雜交探針。

用語“調節序列”是指一多核苷酸序列能影響連接

(ligate)到它之編碼序列的表現及處理。此等調節序列的性質可隨宿主生物體而異。在特殊具體例中，用於原核生物之調節序列可包括啓動子，核糖體結合位置以及轉錄終止序列。舉例而言，用於真核生物之調節序列可包括含有轉錄因子用之一個或複數識別位置之啓動子，轉錄增強子(enhancer)序列以及轉錄終止序列。“調節序列”能包括前導(leader)序列及/或接合搭檔序列(fusion partner sequences)。

用語“載體”意指用於將編碼情報資料之蛋白質轉移進入宿主細胞之任何分子或實體(例如核酸，質體，噬菌體或病毒)。用語“表現載體”或“表現構築體”是指適用於宿主細胞轉形之載體，以及含有核酸序列指揮及/或調節(與宿主細胞有關連)其操作地連接之一個或一個以上異質編碼區域的表現。表現構築體可包括但不限為影響或調節轉錄、轉譯之序列；若存在插入序列(intron)，則為影響其可操作地連接之編碼區域的 RNA 接合(splicing)。

文中所用“可操作地連接(operably linked)”意指此用語所適用的成分有關聯於使他們實行他們的固有功能。舉例而言，在載體中“可操作地連接”至蛋白質編碼序列之調節序列，例如啓動子是經安排以至於調節序列的正常活性誘使蛋白質編碼序列轉錄導致所編碼蛋白質的重組表現。

用語“轉染(transfection)”意指戲胞攝入外來或外源性 DNA，且當外源性 DNA 已導入細胞膜內時則細胞已經“被轉染”。許多轉染技術為技藝所熟知並揭示本文中。例如參閱 Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular*

Cloning: A Laboratory Manual, *supra*; Davis *et al.*, 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197。此等技術能用於導入一個或一個以上外源性 DNA 部分 (moiety) 於適合的宿主細胞。

用語“多胜肽”或“蛋白質”意指具有天然蛋白質之胺基酸序列的大分子，也就是由天然存在及非重組細胞所產生之蛋白質；或由基因工程或重組細胞所產生之蛋白質，以及含有具天然蛋白質之胺基酸序列之分子，或具有一個或一個以上胺基酸刪除自、添加到及/或取代於天然序列之分子。該用語也包括胺基酸聚合物，其中一個或一個以上胺基酸是對應之天然存在的胺基酸及聚合物之化學類似物。用語“多胜肽”及“蛋白質”包含 GM-CSF 抗原結合蛋白質、抗體或具有一個或一個以上胺基酸刪除自、添加到及/或取代於抗原結合蛋白質的序列。用語“多胜肽片段”是指相較於全長天然蛋白質，具有胺基末端刪除、羧基末端刪除及/或內部刪除之多胜肽。相較於天然蛋白質，此等片段亦可含有經修飾胺基酸。在特定具體例中，片段約為 5 至 500 個胺基酸長度。例如片段能為至少 5、6、7、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400 或 450 個胺基酸長度。可用的多胜肽片段包括抗體的免疫功能性片段，包括結合功能部位 (domain)。至於 GM-CSF-結合蛋白質，可用片段包括但不限為 CDR 區域、重鏈或輕鏈的可變功能部位、抗體鏈的一部分或僅其包括兩 CDR 之可變區域等等。

用語“經單離之蛋白質”是指從蛋白質或多胜肽或將妨



礙其治療、診斷、預防、研究或其他用途之其他污染物中純化之蛋白質。

多胜肽之“變異體”(例如抗原結合蛋白質或抗體)含有胺基酸序列中一個或一個以上胺基酸殘基是插入、刪除自及/或取代進入相對於另一多胜肽序列的胺基酸序列。變異體包括接合蛋白質。多胜肽之“衍生物”是已經過化學修飾，例如經由接合到另一化學部分(moiety)之多胜肽(例如抗原結合蛋白質或抗體)，在某種程度上不同於插入、刪除或取代之變異體。

整個說明書所用與生物材料，例如多胜肽、核酸、宿主細胞等等有關之用語“天然存在”，是指在自然界發現的材料。

文中所用“抗原結合蛋白質”意指專一結合特定目標抗原之蛋白質，所提供之抗原為 GM-CSF 或人類 GM-CSF。

當解離常數( $K_d$ )為 $\leq 10^{-8}$  M 時，稱一抗原結合蛋白質“專一結合”其目標抗原。當  $K_d$  為 $\leq 5 \times 10^{-9}$  M 時，抗體以“高親和力”專一結合抗原，以及當  $K_d$  為 $\leq 5 \times 10^{-10}$  M 時，以“非常高親和力”專一結合抗原。在一具體例中，抗體具有 $\leq 10^{-9}$  M 的  $K_d$ ，以及約  $1 \times 10^{-4}/\text{sec}$  的停止速率(off-rate)。在一具體例中，停止速率為 $< 1 \times 10^{-5}$ 。在其他具體例中，抗體將以介於約  $10^{-8}$  M 及  $10^{-10}$  M 間之  $K_d$  結合至 GM-CSF 或人類，且又在另一具體例中以  $K_d \leq 2 \times 10^{-10}$  結合。

“抗原結合區域”意指專一結合特定抗原之蛋白質或蛋白質的一部分。舉例而言，抗原結合蛋白質之一部分含有與

抗原互相作用之胺基酸殘基並賦予該抗原結合蛋白質對於抗原的專一性及親和力，此稱為“抗原結合區域”。抗原結合區域典型包括一個或一個以上“互補結合區域”(“CDRs”)。某些抗原結合區域也包括一個或一個以上“骨架(framework)”區域。“CDR”是提供抗原結合專一性及親和力之胺基酸序列。“骨架(framework)”區域有助於維持 CDRs 的適當構形以促進抗原結合區域與抗原間的結合。

在某些態樣，提供結合 GM-CSF 蛋白質或人類 GM-CSF 之重組抗原結合蛋白質。在此文章中，“重組蛋白質”是使用重組技術製造之蛋白質，亦即透過文中所述重組核酸的表現。製造重組蛋白質的方法及技術為技藝熟知。

用語“抗體”是指一完整免疫球蛋白的任何同型物或其片段可與完整抗體競爭專一結合至目標抗原，包括例如嵌合型、人類化、完全人類以及雙專一性(bispecific)抗體。此等“抗體”為抗原結合蛋白質的一種類。完整的抗體通常應含有至少兩全長重鏈及兩全長輕鏈，但某些場合可包括較少鏈，例如天然存在於大羊駝(camelids)的抗體，其中可只含有重鏈。抗體可只衍生自單一來源；或可為“嵌合型”，亦即抗體的不同部分可衍生自兩不同抗體，進一步如下所述。抗原結合蛋白質、抗體或結合片段可於融合瘤、由重組 DNA 技術或酵素或化學切割完整抗體來製造。除非其他指示，用語“抗體”除含有兩全長重鏈及兩全長輕鏈之抗體以外，包括其衍生物、變異體、片段及突變蛋白質，其實例敘述於下。

用語“輕鏈”包括全長輕鏈及其片段具有足夠序列賦予

結合專一性。典型的哺乳動物抗體中，應可發現包括可變區域功能部位 (variable region domain)  $V_L$  以及恆定區域功能部位 (constant region domain)  $C_L$  之全長輕鏈，其中輕鏈的可變區域功能部位接近多胜肽的胺基末端。典型的人類抗體輕鏈包括  $\kappa$  鏈或  $\lambda$  鏈。

用語“重鏈”包括全長重鏈及其片段具有足夠可變區域序列賦予結合專一性。哺乳動物全長重鏈抗體典型包括一可變區域功能部位  $V_H$  以及三個恆定區域功能部位： $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  及  $C_{H3}$ 。 $V_H$  功能部位接近多胜肽的胺基末端，以及  $C_H$  功能部位接近羧基末端，以  $C_{H3}$  最接近多胜肽的羧基末端。人類重鏈典型可為同型物，包括 IgG (包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亞型)，IgA (包括 IgA1 及 IgA2 亞型)，IgM 及 IgE。

文中所用用語抗體之“功能片段”(或簡稱“片段”)或免疫球蛋白鏈(重鏈或輕鏈)，是含有抗體之一部分(不論該部分如何取得或合成)的抗原結合蛋白質，其至少缺乏全長鏈中某些胺基酸但仍能專一結合至抗原。此等片段具生物活性他們專一結合至目標抗原，並能與其他抗原結合蛋白質(包括完整抗體)競爭專一結合至指定的抗原決定基。在一態樣，此等片段將保留至少一 CDR 存在於全長輕鏈或重鏈，以及在某些具體例中將含有單一重鏈及/或輕鏈或其一部分。這些生物活性片段可經由重組 DNA 技術製造，或可經由或酵素或化學切割抗原結合蛋白質(包括完整抗體)來製造。免疫功能性免疫球蛋白片段包括但不限於 Fab，Fab'，F(ab')<sub>2</sub>，Fv，功能部位抗體以及單鏈抗體，以及可衍生自任何哺乳動

物來源，包括但不限於人類、小鼠、大鼠、大羊駝或兔子。進一步預期，文中揭示之抗原結合蛋白質的功能部分，例如一個或一個以上 CDRs 能共價鍵結到蛋白質或小分子以創造一針對體內特殊標的治療劑，具有雙功能治療特性或具有延長的血清半衰期。

“Fab 片段”是由一輕鏈及一重鏈的  $C_{H1}$  與可變區域所組成。Fab 的重鏈分子與另一重鏈分子無法形成二硫鍵。

“Fc”區域含有兩個重鏈片段，其含有抗體的  $C_{H1}$  及  $C_{H2}$  功能部位。這兩重鏈片段是經由兩個或兩個以上二硫鍵以及  $C_{H3}$  功能部位的疏水性互相作用保持在一起。

“Fab' 片段”含有一輕鏈及一重鏈的一部分(其含有  $VH$  功能部位與  $C_{H1}$  功能部位，以含  $C_{H1}$  及  $C_{H2}$  功能部位間之區域)，以至於在兩 Fab' 片段的兩重鏈之間形成鏈間二硫鍵以形成  $F(ab')_2$  分子。

“ $F(ab')_2$  片段”含有兩個輕鏈及兩個重鏈(在  $C_{H1}$  及  $C_{H2}$  功能部位間含有恆定區域的一部分)，如此在兩重鏈之間形成鏈間二硫鍵。因此  $F(ab')_2$  片段是由兩 Fab' 片段所組成，其經由兩重鏈間的二硫鍵保持在一起。

“Fv 區域”含有來自重鏈及輕鏈的可變區域，但缺乏恆定區域。

“單鏈抗體”是 Fv 分子，其中重鏈及輕鏈可變區域已經由彈性連接體(flexible linker)連結形成單一多肽鏈，其形成一抗原結合區域。單鏈抗體的細節討論於 PCT 公開第 WO 88/01649 及美國專利第 4,946,778 及 5,260,203 號。

“功能部位抗體”是一免疫功能性免疫球蛋白片段，只含有重鏈的可變區域或輕鏈的可變區域。在某些場合，兩個或兩個以上  $V_H$  區域與肽鏈連接體共價結合產生二價功能部位抗體。二價功能部位抗體的兩個  $V_H$  區域可對準相同或不同的抗原。

“二價抗原結合蛋白質”或“二價抗體”含有兩抗原結合位置。在某些場合，兩結合位置具有相同抗原專一性。二價抗原結合蛋白質及二價抗體可為雙專一性，參閱以下。

“多專一性抗原結合蛋白質”或“多專一性抗體”是對準超過一個抗原或抗原決定基。

“雙專一性 (bispecific)”、“雙重專一性 (dual-specific)”或“雙功能 (bifunctional)”抗原結合蛋白質或抗體分別為混合的抗原結合蛋白質或抗體，具有兩不同的抗原結合位置。雙專一性抗原結合蛋白質及抗體是多專一性抗原結合蛋白質抗體的一種類，且可由各種方法產生，包括但不限於融合瘤的融合或 Fab' 片段的連接。例如參閱 Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553。雙專一性抗原結合蛋白質或抗體的兩結合位置將結合至兩不同抗原決定基，其可存在於相同或不同蛋白質標的上。

用語“中和性抗原結合蛋白質”或“中和性抗體”是分別指結合至配體 (ligand) 的抗原結合蛋白質或抗體，防止配體對其結合作伙伴的結合並阻礙配體結合至其結合作伙伴所將產生的生物反應。評估抗原結合蛋白質，例如抗體或其免疫功

能性片段之結合及專一性，抗體或片段將實質抑制配體對其結合伙伴的結合，當抗體過多，則降低結合伙伴結合到配體的量至少約 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更大(在活體外競爭結合分析中測量)。至於 GM-CSF 抗原結合蛋白質，此等中和性分子將減少 GM-CSF 結合 GM-CSFR 的能力。

文中用於競爭相同抗原決定基之抗原結合蛋白質(例如中和性抗原結合蛋白質或中和性抗體)使用用語“競爭”時，意指抗原結合蛋白質之間的競爭是由分析測定，其中抗原結合蛋白質(例如抗體或其免疫功能性片段)在測試下防止或抑制參考抗原結合蛋白質(例如配體或參考抗體)專一結合至共同抗原(例如 GM-CSF 或其片段)。能使用多種競爭結合分析，例如固相直接或間接放射性免疫分析(RIA)，固相直接或間接酵素免疫分析(EIA)，三明治競爭分析(例如參閱 *Stahli et al.*, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253)，固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(例如參閱 *Kirkland et al.*, 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619)，固相直接標記分析，固相直接標記三明治分析(例如參閱 *Harlow and Lane*, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)，使用 I-125 標記之固相直接標記 RIA(例如參閱 *Morel et al.*, 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15)，固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(例如參閱 *Cheung, et al.*, 1990, *Virology* 176:546-552)，以及直接標記 RIA(*Moldenhauer et al.*, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)。通常此等分析包含使用結合在固體表面或具有這些任一的細胞之經純化抗原，未標記之測試抗原結合

蛋白質以及標記之參考抗原結合蛋白質。

競爭性抑制作用是在測試抗原結合蛋白質存在下，經由測定結合到固體表面或細胞的標記量來測量。通常測試抗原結合蛋白質是過量的。經由競爭分析(競爭抗原結合蛋白質)確認抗原結合蛋白質包括抗原結合蛋白質如同參考抗原結合蛋白質結合至相同抗原決定基，以及抗原結合蛋白質結合至鄰近的抗原決定基而足以最接近被參考抗原結合蛋白質結合之抗原決定基以發生立體障礙。關於測定競爭結合用方法之額外詳述提供於文中實施例中。通常當競爭抗原結合蛋白質過量時，其將抑制參考抗原結合蛋白質對共同抗原的專一結合至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或 75%。在某些場合，結合被抑制至少 80%、85%、90%、95%或 97%或更多。

用語“抗原”是指能經選擇性結合劑，例如抗原結合蛋白質(包括例如抗體或其免疫功能片段)結合的分子或分子的一部分，且另外能用於動物以產生能結合至該抗原的抗體。抗原可具有一個或一個以上能與不同抗原結合蛋白質(例如抗體)互相作用之抗原決定基。

用語“抗原決定基(epitope)”包括能專一結合至抗原結合蛋白質之任何決定基。抗原決定基是抗原的一區域，經專一對準該抗原之抗原結合蛋白質所結合，且當抗原為蛋白質時，包括與抗原結合蛋白質接觸之專一胺基酸。最常見為抗原決定基存在於蛋白質上，可理解包括非胺基酸的轉譯後修飾，但在某些場合可存在於其他種類分子上，例如核酸。抗

原決定基可包括分子的化學活性表面基團，例如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且可具有專一的三次元結構特徵及/或專一的電荷特徵。通常專一於特定目標抗原之抗體在蛋白質及/或大分子之複合體混合物中將優先辨認目標抗原上的抗原決定基。

用語“相同 (identity)”是指兩個或兩個以上多胜肽分子或兩個或兩個以上多核苷酸之序列間的關係，是經由對齊 (aligning) 及比較序列決定。“相同百分比”意指比對分子中胺基酸或核苷酸間相同殘基的百分比，並基於所比對最小分子的大小來計算。對於這些計算，對齊中的空隙 (若有的話) 必須經特殊的數學模式或電腦程式處理 (亦即“演算法”)。能用於計算對齊之核酸或多胜肽相同性之方法包括那些敘述於 *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073。

在計算相同百分比時，要比對的序列以使序列間得到最大相配的方式對齊。用於決定相同百分比之電腦程式是 GCG 套裝軟體，其包括 GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)。電腦演算法 GAP 是用於對齊兩個多胜肽或多核苷酸以決定序列相



同百分比。序列是以達到他們各自胺基酸或核苷酸之最理想相配來對齊(“相配距離 (matched span)”是以演算法決定)。使用間隔打開的扣分 (gap opening penalty)(其係以 3x 平均對角線計算，其中“平均對角線 (average diagonal)”是所用比較矩陣的對角線平均；“對角線”是經由特殊比較矩陣分配到每一完美胺基酸配對的計分或數目)以及間隔延長的扣分 (gap extension penalty)(其通常為間隔打開扣分的 1/10 倍)以及比較矩陣(例如 PAM 250 或 BLOSUM 62)連接演算法。在特定具體例中，經由演算法也使用標準比較矩陣(PAM 250 比較矩陣參閱 Dayhoff *et al.*, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352; BLOSUM 62 比較矩陣參閱 Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915-10919)。

使用 GAP 程式測定多胜肽或核苷酸序列相同百分比之可取用參數如下：

演算法：Needleman *et al.*, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453；

比較矩陣：BLOSUM 62 來自 Henikoff *et al.*, 1992, 同前；

間隔扣分：12 (但末端間隔無扣分)

間隔長度扣分：4

相似度閾值：0

為對齊兩胺基酸序列用之特定對齊設計可能導致只有兩序列的短暫區域相配，且此小的對齊區域可具有非常高的序列相同性，即使兩全長序列之間無顯著關聯。因此，若希望造成跨越目標多胜肽至少 50 個連續胺基酸的對齊，所選之對齊方法(GAP 程式)可經調整。

文中使用之“實質純”意指所述分子種類是佔絕大多數的種類；亦即以莫耳計，其比同一混合物中任何其他個別種類更大量。在特定具體例中，實質純分子是一組成物中目標種類含有存在之全部大分子種類的至少 50% (以莫耳計)。在其他具體例中，實質純組成物將含有組成物中存在之全部大分子種類的至少 80%、85%、90%、95% 或 99%。

在特定具體例中，已純化實質均一的物質至以慣用偵測方法不會在組成物中偵測到污染物的程度，且因此該組成物由單一可偵測到的大分子種類所組成。

用語“治療有效量”是指所測定之 GM-CSF 抗原結合蛋白質在哺乳動物中產生任何治療反應的量。此等治療有效量可由所屬技術領域中具有通常知識者輕易確定。

“胺基酸”包括其在技藝之標準含義。20 種天然存在的胺基酸及其依照慣用之縮寫。參閱 *Immunology-A Synthesis*, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991)。20 種慣用胺基酸之立體異構物 (例如 D-胺基酸)，非天然胺基酸例如  $[\alpha]$ -、 $[\alpha]$ -二取代胺基酸、N-烷基胺基酸及其他非慣用胺基酸也適用於作為多胜肽成分。非慣用胺基酸之實例包括：4-羥脯胺酸， $[\gamma]$ -羧基麩胺酸， $[\epsilon]$ -N,N,N-三甲基離胺酸， $[\epsilon]$ -N-乙醯基離胺酸，O-磷酸絲胺酸，N-乙醯基絲胺酸，N-甲醯基甲硫胺酸，3-甲基組胺酸，5-羥離胺酸， $[\sigma]$ -N-甲基精胺酸，以及其他類似胺基酸及亞胺基酸 (例如 4-羥脯胺酸)。文中使用之多胜肽標記法，根據標準用法及習慣，左手方向為胺基末端方向以及右手方向為

羧基末端方向。

### 一般概述

文中提供結合 GM-CSF 蛋白質，尤其是人類 GM-CSF(hGM-CSF)蛋白質之抗原結合蛋白質。所提供之抗原結合蛋白質是多胜肽，有如文中所述一個或一個以上互補決定區域(CDRs)嵌入及/或加入其中。在某些抗原結合蛋白質中，CDRs 是嵌入“骨架(framework)”區域，其將 CDR(s)定位使達到 CDR(s)之適合的抗原結合特性。一般而言，所提供之抗原結合蛋白質能妨礙、阻斷、降低或調整 GM-CSFR 與 GM-CSF 間之互相作用。

文中敘述之某些抗原結合蛋白質是抗體或衍生自抗體。在特定具體例中，抗原結合蛋白質之多胜肽結構是基於抗體，包括但不限於單株抗體，雙專一性抗體，最小抗體(minibodies)，功能部位抗體，合成抗體(本文中有時稱為“抗體擬物(antibody mimetics)”)，嵌合型抗體，人類化抗體，人類抗體，抗體接合物(本文中有時稱為“抗體共軛體”)，及其各別片段。此不同結構進一步說明於本文中。

文中提供之抗原結合蛋白質已證明能結合至某些 GM-CSF 的抗原決定基，特別是人類 GM-CSF。因此文中提供之抗原結合蛋白質能抑制 GM-CSF 活性。特別是抗原結合蛋白質結合至這些抗原決定基尤其可抑制 GM-CSFR 傳訊息的誘發、GM-CSF 誘發之細胞生長或分化及其他隨 GM-CSF 結合至 GM-CSFR 誘發之生理作用。

文中揭示之抗原結合蛋白質具有各種用途。某些該抗原

結合蛋白質，例如可用於專一結合分析、GM-CSF(特別是hGM-CSF)或其配體的親和力純化，以及鑑定GM-CSF活性之其他拮抗劑的篩選分析。某些該抗原結合蛋白質可用於抑制GM-CSFR結合至GM-CSF，或抑制GM-CSF的自體磷酸化。

抗原結合蛋白質可用於如文中說明之各種治療應用。舉例而言，某些GM-CSF抗原結合蛋白質可用於治療與GM-CSF有關之症狀，例如在病人降低單核球趨化性，抑制單核球遷移到腫瘤，或抑制腫瘤中與腫瘤有關之巨噬細胞的積聚，如文中進一步說明。抗原結合蛋白質之其他用途，包括例如與GM-CSF有關之疾病或症狀的診斷以及決定GM-CSF存在與否的篩選分析。文中所述之某些抗原結合蛋白質可用於治療與GM-CSF活性有關之結果、症狀及/或病變。這些包括但不限於各種發炎性疾病。

#### **GM-CSF 抗原結合蛋白質**

提供可用於調節GM-CSF活性之各種選擇性結合劑。這些試劑包括例如抗原結合蛋白質，其含有抗原結合功能部位(例如單鏈抗體，功能部位抗體，免疫附著(immunoadhesion)及具抗原結合區域之多胜肽)且專一結合至GM-CSF多胜肽，特別是人類GM-CSF。這些試劑，例如可用於抑制GM-CSFR結合至GM-CSF，並能藉此用於抑制一個或一個以上與GM-CSF傳訊息有關之活性。

一般而言，所提供之抗原結合蛋白質典型含有如文中所述之一個或一個以上CDRs(例如1, 2, 3, 4, 5或6個CDRs)。

在某些場合，抗原結合蛋白質含有(a)一多胜肽結構以及(b)一個或一個以上 CDRs 插入及/或加入多胜肽結構。多胜肽結構可採用各種不同形式。舉例而言，其能為或含有天然存在抗體之骨架(framework)，或其片段或變異體，或本質上可完全合成。各種多胜肽結構之實例進一步說明於下。

在特定具體例中，抗原結合蛋白質之多胜肽結構是抗體或衍生自抗體，包括但不限於單株抗體，雙專一性抗體，最小抗體(minibodies)，功能部位抗體，合成抗體(本文中有時稱為“抗體擬物(antibody mimetics)”)，嵌合型抗體，人類化抗體，人類抗體，抗體接合物(本文中有時稱為“抗體共軛體”)，及各別之一部分或片段。在某些場合，抗原結合蛋白質是抗體的免性片段(例如 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 或 scFv)。本文中進一步說明及定義各種結構。

本文中提供之某些抗原結合蛋白質專一結合至人類 GM-CSF。使用之“專一結合”意指平衡解離常數為  $<10^{-8}$  至  $<10^{-10}$  M，或  $<10^{-9}$  至  $<10^{-10}$  M。

在具體例中，使用抗原結合蛋白質於治療應用，抗原結合蛋白質能抑制、妨礙或調整一種或一種以上之 GM-CSF 的生物活性。在此情形，當過多抗體降低結合至 GM-CSFR 之人類 GM-CSF 的量時，抗原結合蛋白質專一結合及/或實質抑制人類 GM-CSF 結合至 GM-CSFR 至少約 40%、60%、80%、85%或以上(例如在活體外競爭結合分析中測量結合)，反之亦然。GM-CSF 具有許多不同的生物作用，其能在許多不同分析中在不同的細胞種類中測量；本文中提供此等分析之實

例。

提供之某些抗原結合蛋白質具有與天然存在之抗體有關的典型結構。這些抗體的結構單位通常含有一個或一個以上的四聚體，每一四聚體由相同兩對多肽鏈所組成，雖然某些種類的哺乳動物也產生只具有單一重鏈之抗體。典型的抗體中，每對或每雙包括一全長“輕”鏈(在特定具體例中，約 25 kDa)及一全長“重”鏈(在特定具體例中，約 50-70 kDa)。各個免疫球蛋白鏈由數種“免疫球蛋白功能部位”所構成，各大約由 90 至 110 個胺基酸所組成並表現摺疊形態特徵。這些功能部位組成抗體多肽的基本單位。每一鏈的胺基末端部分包括一個主要負責抗原辨認之可變功能部位。羧基末端部分在演化上比該鏈的另一末端更保守，並稱為“恆定區域”或“C 區域”。人類輕鏈一般分類為  $\kappa$  及  $\lambda$  輕鏈，且此等每一含有一可變功能部位及一恆定功能部位。重鏈通常分類為  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、或  $\epsilon$  鏈，且這些分別定義為抗體之同型物 IgM、IgD、IgG、IgA 及 IgE。IgG 具有數種亞型，包括但不限於 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4。IgM 亞型包括 IgM1 及 IgM2。IgA 亞型包括 IgA1 及 IgA2。在人類，IgA 及 IgD 同型物含有四重鏈及四輕鏈；IgG 及 IgE 同型物含有兩重鏈及兩輕鏈；以及 IgM 同型物含有五重鏈及無輕鏈。重鏈 C 區域通常含有一個或一個以上功能部位，其可負責效應功能。重鏈恆定區域功能部位的數目將視同型物而異。IgG 重鏈，例如各含有三個 C 區域功能部位，已知為  $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  及  $C_{H3}$ 。所提供之抗體可具有這些同型物及亞型。在特定具體例中，

GM-CSF 抗體是 IgG1、IgG2 或 IgG4 亞型。

在全長輕鏈及重鏈中，可變及恆定區域是經由約 12 個或以上之胺基酸的“J”區域連結，以及重鏈也包括約 10 個或以上之胺基酸之“D”區域。例如參閱 *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press。每一輕鏈/重鏈對之可變區域通常形成抗原結合位置。

### 1. 抗體之可變功能部位

本文中提供之各種重鏈及輕鏈可變區域描述於表 1。這些可變區域各可附加於上述重鏈及輕鏈恆定區域，以分別形成完整的抗體重鏈及輕鏈。再者，如此所產生之重鏈及輕鏈序列各可經組合形成完整的抗體結構。

所提供為抗原結合蛋白質，含有選自由  $V_{H1}$ 、 $V_{H2}$ 、 $V_{H3}$ 、 $V_{H4}$ 、 $V_{H5}$ 、 $V_{H6}$ 、 $V_{H7}$ 、 $V_{H8}$ 、 $V_{H9}$ 、 $V_{H10}$ 、 $V_{H11}$  及  $V_{H12}$  所組群組之抗體重鏈可變區域，及/或選自由  $V_{L1}$ 、 $V_{L2}$ 、 $V_{L3}$ 、 $V_{L4}$ 、 $V_{L5}$ 、 $V_{L6}$ 、 $V_{L7}$ 、 $V_{L8}$ 、 $V_{L9}$ 、 $V_{L10}$ 、 $V_{L11}$  及  $V_{L12}$  所組群組之抗體輕鏈可變區域，如下表 1 所示。

此類型之抗原結合蛋白質通常能以式“ $V_{Hx}/V_{Ly}$ ”命名，其中“x”對應於重鏈可變區域的數目以及“y”對應於輕鏈可變區域的數目，如表 1 所列：

表 1：示範性 V<sub>H</sub> 及 V<sub>L</sub> 鏈

命名	胺基酸序列
V <sub>H1</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYIHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNSAQKFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCAREGGYSYGYFDYWGQGTLVTVSS [SEQ. ID. NO:9]
V <sub>H2</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARDKWLDGFDYWGQGTLVTVSS S [SEQ. ID. NO:21]
V <sub>H3</sub>	QVQLVQSGAAVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYIHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTASMELSRLRSD DTAVYFCARDRWLDAFDIWGQGTMTVTVSS [SEQ. ID. NO:33]
V <sub>H4</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQRFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARAPYDWTFDYWGQGTLVTVSS [SEQ. ID. NO:45]
V <sub>H5</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYIHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGRNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARDRWLDAFEIWGQGTMTVTVSS [SEQ. ID. NO:57]
V <sub>H6</sub>	QVQLVQSGAEVKQPGASVKVSCEASGYTFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYNGNTDYAQLQGRVTMTTDTSTSAAYMELRSLRSD DTAVYYCARQRYYYSMVWVGQGTTVTVSS [SEQ. ID. NO:69]
V <sub>H7</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSWLRSD DTAVYYCARDRWLDAFDIWGQGTMTVTVS [SEQ. ID. NO:81]
V <sub>H8</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFSGYMYWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYARKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCARRPWELPFDYWGQGTLVTVSS [SEQ. ID. NO:93]
V <sub>H9</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFKGRVTMTRDTSISTAHEMELSRLRSD DTAVYYCVRNGDYVFTYFDYWGQGTLVTVSS [SEQ. ID. NO:105]
V <sub>H10</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD



命名	胺基酸序列
	DTAVYYCARFGYFGYYFDYWGQGLVTVSS [SEQ. ID. NO:117]
V <sub>H</sub> 11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFRGRVTMTRDTSISTAYVELSRLRSDD TAVYYCARDPYTSGFDYWGQGLVTVSS [SEQ. ID. NO:129]
V <sub>H</sub> 12	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIRSGGYWSWIRQHFGK LEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNVTAAADTA VYYCAREDTAMDYFDYWGQGLVTVSS [SEQ. ID. NO:141]
V <sub>L</sub> 1	DIVLTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSILYSSSNENFLTWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQ YFSVFRTFGQGTRVEIK [SEQ. ID. NO:3]
V <sub>L</sub> 2	EIVLTQSPGTLSPGDRATLSCRASQSVSSSYFAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRS PRTFGQGTKVEIK [SEQ. ID. NO:15]
V <sub>L</sub> 3	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYFAWYQQKPGQAPRL LIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTVSRLEPEDFAVYYCQQYDRS PRTFGQGTKVEIK [SEQ. ID. NO:27]
V <sub>L</sub> 4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISNTYLAWFQQKPGQAPRL LIYGAATRATGIPDRFSGSGSGTDFTFTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PWTFGQGTVEIK [SEQ. ID. NO:39]
V <sub>L</sub> 5	EVVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVCSYLAWYQQKPDQAPR LLISGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYDRS PRTFGQGTKVEIK [SEQ. ID. NO:51]
V <sub>L</sub> 6	NFMLAQPHSVSESPGKTVTISCIRTSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTT VIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSCD ISNVVFGGGTKLTVL [SEQ. ID. NO:63]
V <sub>L</sub> 7	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRL LIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTVSRLEPEDFAVYYCLQYDRS PRTFGQGTKVEIK [SEQ. ID. NO:75]

命名	胺基酸序列
V <sub>L</sub> 8	EIVLTQSPGTLSSLGERAILSCRASQSLSSIYLAWYQQKPGQAPGLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQYATSP WTFGQGTKVEVK [SEQ. ID. NO:87]
V <sub>L</sub> 9	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYTASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSFSFP ITFGPGTKVDIK [SEQ. ID. NO:99]
V <sub>L</sub> 10	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIEVSGRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSF TGSSTWLFGGGKLTVL [SEQ. ID. NO:111]
V <sub>L</sub> 11	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASPSVSSSYFAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGWSP RTFGQGTKVEIK [SEQ. ID. NO:123]
V <sub>L</sub> 12	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSHIGSNTVNWYQHLPGTAPKL LIYSNNHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGPVFGGGKLTVL [SEQ. ID. NO:135]

表 1 所列各重鏈可變區域可與任一表 1 所示輕鏈可變區域組合形成抗原結合蛋白質。此等組合之實例包括 V<sub>H</sub>1 與 V<sub>L</sub>1、V<sub>L</sub>2、V<sub>L</sub>3、V<sub>L</sub>4、V<sub>L</sub>5、V<sub>L</sub>6、V<sub>L</sub>7、V<sub>L</sub>8、V<sub>L</sub>9、V<sub>L</sub>10、V<sub>L</sub>11 及 V<sub>L</sub>12 之任一組合，或 V<sub>H</sub>2 與 V<sub>L</sub>1、V<sub>L</sub>2、V<sub>L</sub>3、V<sub>L</sub>4、V<sub>L</sub>5、V<sub>L</sub>6、V<sub>L</sub>7、V<sub>L</sub>8、V<sub>L</sub>9、V<sub>L</sub>10、V<sub>L</sub>11 及 V<sub>L</sub>12 之任一組合等等。

在某些場合，抗原結合蛋白質包括至少一重鏈可變區域及/或一輕鏈可變區域來自表 1 所列者。在某些場合，抗原結合蛋白質包括至少兩不同重鏈可變區域及/或輕鏈可變區域來自表 1 所列者。此等抗原結合蛋白質之一實例含有 (a) 一 V<sub>H</sub>1 以及 (b) V<sub>H</sub>2、V<sub>H</sub>3、V<sub>H</sub>4、V<sub>H</sub>5、V<sub>H</sub>6、V<sub>H</sub>7、V<sub>H</sub>8、V<sub>H</sub>9、V<sub>H</sub>10、V<sub>H</sub>11 或 V<sub>H</sub>12 之一。

另一實例含有 (a)  $V_{H2}$  以及 (b)  $V_{H1}$ 、 $V_{H3}$ 、 $V_{H4}$ 、 $V_{H5}$ 、 $V_{H6}$ 、 $V_{H7}$ 、 $V_{H8}$ 、 $V_{H9}$ 、 $V_{H10}$ 、 $V_{H11}$  或  $V_{H12}$  之一。又另一實例含有 (a)  $V_{H3}$  以及 (b)  $V_{H1}$ 、 $V_{H2}$ 、 $V_{H4}$ 、 $V_{H5}$ 、 $V_{H6}$ 、 $V_{H7}$ 、 $V_{H8}$ 、 $V_{H9}$ 、 $V_{H10}$ 、 $V_{H11}$  或  $V_{H12}$  之一等等。

再者，如此抗原結合蛋白質之另一實例含有 (a)  $V_{L1}$  以及 (b)  $V_{L2}$ 、 $V_{L3}$ 、 $V_{L4}$ 、 $V_{L5}$ 、 $V_{L6}$ 、 $V_{L7}$ 、 $V_{L8}$ 、 $V_{L9}$ 、 $V_{L10}$ 、 $V_{L11}$  或  $V_{L12}$  之一。再者，如此抗原結合蛋白質之另一實例含有 (a)  $V_{L2}$  以及 (b)  $V_{L1}$ 、 $V_{L3}$ 、 $V_{L4}$ 、 $V_{L5}$ 、 $V_{L6}$ 、 $V_{L7}$ 、 $V_{L8}$ 、 $V_{L9}$ 、 $V_{L10}$ 、 $V_{L11}$  或  $V_{L12}$  之一。再者，如此抗原結合蛋白質之另一實例含有 (a)  $V_{L3}$  以及 (b)  $V_{L1}$ 、 $V_{L2}$ 、 $V_{L4}$ 、 $V_{L5}$ 、 $V_{L6}$ 、 $V_{L7}$ 、 $V_{L8}$ 、 $V_{L9}$ 、 $V_{L10}$ 、 $V_{L11}$  或  $V_{L12}$  之一等等。

重鏈可變區域的各種組合可與任何輕鏈可變區域各種組合來組合。

在其他情形中，抗原結合蛋白質含有兩相同輕鏈可變區域及/或兩相同重鏈可變區域。如一實施例，抗原結合蛋白質可為抗體或免疫功能性片段，其包括兩輕鏈可變區域及兩重鏈可變區域組合輕鏈可變區域對及重鏈可變區域對，如表 1 所列。

所提供之某些抗體含有重鏈可變功能部位，其含有胺基酸之序列只有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個胺基酸殘基不同於選自  $V_{H1}$ 、 $V_{H2}$ 、 $V_{H3}$ 、 $V_{H4}$ 、 $V_{H5}$ 、 $V_{H6}$ 、 $V_{H7}$ 、 $V_{H8}$ 、 $V_{H9}$ 、 $V_{H10}$ 、 $V_{H11}$  及  $V_{H12}$  之重鏈可變功能部位之序列，其中各個此等序列差異獨立為一個胺基酸刪除、插入或取代。某些抗體之重鏈可變區域含有胺基

酸之序列為具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或 99%序列相同於  $V_{H1}$ 、 $V_{H2}$ 、 $V_{H3}$ 、 $V_{H4}$ 、 $V_{H5}$ 、 $V_{H6}$ 、 $V_{H7}$ 、 $V_{H8}$ 、 $V_{H9}$ 、 $V_{H10}$ 、 $V_{H11}$  及  $V_{H12}$  之重鏈可變區域的胺基酸序列。

某些抗體含有輕鏈可變功能部位，其含有胺基酸之序列只有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個胺基酸殘基不同於選自  $V_{L1}$ 、 $V_{L2}$ 、 $V_{L3}$ 、 $V_{L4}$ 、 $V_{L5}$ 、 $V_{L6}$ 、 $V_{L7}$ 、 $V_{L8}$ 、 $V_{L9}$ 、 $V_{L10}$ 、 $V_{L11}$  及  $V_{L12}$  之輕鏈可變功能部位之序列，其中各個此等序列差異獨立為一個胺基酸刪除、插入或取代。某些抗體之輕鏈可變區域含有胺基酸之序列具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或 99%序列相同於  $V_{L1}$ 、 $V_{L2}$ 、 $V_{L3}$ 、 $V_{L4}$ 、 $V_{L5}$ 、 $V_{L6}$ 、 $V_{L7}$ 、 $V_{L8}$ 、 $V_{L9}$ 、 $V_{L10}$ 、 $V_{L11}$  及  $V_{L12}$  之輕鏈可變區域的胺基酸序列。

還有其他抗原結合蛋白質，例如抗體或免疫功能性片段包括恰如所述變異體重鏈及變異體輕鏈之變異體形式。

## 2. CDRs

在傳統抗體中，CDRs 是嵌入重鏈及輕鏈可變區域的骨架 (framework) 中，在此他們構成負責抗原結合及辨識之區域。相同物種之免疫球蛋白鏈的可變功能部位通常展現類似的整個結構，含有以高可變區域連結之相當保守的骨架區域 (FR)，通常稱為“互補決定區域”或 CDRs。可變區域含有至少三個重鏈或輕鏈 CDRs。來自上述各重鏈/輕鏈對之兩鏈的 CDRs，通常經由骨架區域對齊以形成一結構專一結合目標蛋白質 (例如 GM-CSF) 上的專一抗原決定基可。從 N-末端至

C-末端，天然存在的輕鏈及重鏈可變區域通常皆遵照這些要素的下列順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。對於指定號碼給佔據這些功能部位各位置之胺基酸，已設計一編號系統。所給抗體之互補決定區域(CDRs)及骨架區域(FR)可使用此系統識別。此編號系統定義於 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication No. 91-3242, 1991, or Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342:878-883。本文中提供之 CDRs 不僅可用於定義傳統抗體結構之抗原結合功能部位，並如文中所述可嵌入其他各種多胜肽結構中。

本文中揭示之抗原結合蛋白質是多胜肽，於其中移植、插入及/或加入一個或一個以上 CDRs。抗原結合蛋白質可具有 1、2、3、4、5 或 6 個 CDRs。然而亦可預期抗原結合蛋白質可具有超過 6 個 CDRs。如此抗原結合蛋白質可具有例如一重鏈 CDR1(“CDRH1”)，及/或一重鏈 CDR2(“CDRH2”)，及/或一重鏈 CDR3(“CDRH3”)，及/或一輕鏈 CDR1(“CDRL1”)，及/或一輕鏈 CDR2(“CDRL2”)，及/或一輕鏈 CDR3(“CDRL3”)。一些抗原結合蛋白質包括 CDRH3 及 CDRL3 二者。某些文中揭示之抗原結合蛋白質含有一個或一個以上胺基酸序列是相同的，或具有實質序列相同於表 2(CDRH)及表 3(CDRL)所示一個或一個以上 CDRs 的胺基酸序列。

表 2：示範性 CDRH 序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列
10	GYYIH
11	WINPNSGGTNSAQKFRG
12	EGGYSYGYFDY
22	GYVMH
23	WINPNSGGTNYAQKFKG
24	DKWLDGFDY
35	WINPNSGGTNYAQKFQG
36	DRWLDAFDI
47	WINPNSGGTNYAQRFRG
48	APYDWTFDY
59	WINPNSGGRNYAQKFQG
60	DRWLDAFEI
70	SYGIS
71	WISAYNGNTDYAQKLQG
72	QRYYYSM DV
94	GYVMY
95	WINPNSGGTNYARKFQG
96	RPWELPFDY
108	NGDYVFTYFDY
119	WINPNSGGTNYAQKFRG
120	FGYFGYYFDY
132	DPYTSGFDY
142	SGGYYS
143	YIYYSGSTYYNPSLKS
144	EDTAMDYFDY

表 3：示範性 CDRL 序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列
4	KSSQSILYSSSNENFLT
5	WASTRES
6	QQYFSVFRT
16	RASQSVSSSYFA
17	GASSRAT
18	QQYDRSPRT
40	RASQYISNTYLA
41	GAATRAT
42	QQYGSSPWT
52	RASQSVCCSSYLA
64	IRTSGSIASNYVQ
65	EDDQRPS
66	QSCDISNVV
77	GTSSRAT
78	LQYDRSPRT
88	RASQSLSSIYLA
90	QQYATSPWT
100	RASQSIISNYLN
101	TASSLQS
102	QQSFSFPIT
112	TGTSSDVGGYNYVS
113	EVSGRPS
114	SSFTGSSTWL
124	RASPSVSSSYFA
126	QQYGWSPRT
136	SGSRSHIGSNTVN
137	SNNHRPS
138	AAWDDSLNGPV

在一態樣，文中揭示之 CDRs 包括衍生自相關單株抗體

群之共有序列 (consensus sequences)。如文中所述，“共有序列”是指胺基酸序列具有保守胺基酸共有於一些序列及所給胺基酸序列中不同之可變胺基酸之間。所提供之 CDR 共有序列包括對應於各 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 及 CDRL3 之 CDRs。

共有序列是使用對應於抗 -GM-CSF 抗體之  $V_H$  及  $V_L$  CDRs 標準譜系分析 (phylogenetic analyses) 決定。共有序列的決定是經由維持 CDRs 連續於對應  $V_H$  或  $V_L$  之相同序列。

CDRH1 共有序列包括由  $X_1X_2GX_3X_4FX_5X_6YX_7X_8X_9$  (SEQ ID NO:94) 組成之胺基酸序列，其中  $X_1$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_3$  是選自由 Y 及 F 所組群組， $X_4$  是選自由 T 及 S 所組群組， $X_5$  是選自由 T、S 及 G 所組群組， $X_6$  是選自由 G 及 S 所組群組， $X_7$  是選自由 Y 及 G 所組群組， $X_8$  是選自由 I 及 M 所組群組，以及  $X_9$  是選自由 H 及 S 所組群組。在一態樣，CDRH1 共有為 SEQ ID NO:94， $X_1X_2GX_3X_4XFX_5X_6YX_7X_8X_9$ ，其中  $X_1$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_3$  是選自由 Y 及 F 所組群組， $X_4$  是選自由 T 及 S 所組群組， $X_5$  是選自由 T、S 及 G 所組群組， $X_6$  是選自由 G 及 S 所組群組， $X_7$  是選自由 Y 及 G 所組群組， $X_8$  是選自由 I 及 M 所組群組，以及  $X_9$  是選自由 H 及 S 所組群組。

CDRH2 共有序列包括由  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}G$  (SEQ ID NO:106) 組成之胺基酸序列，其中  $X_1$  是選自由 W 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 I 及 Y 所組群組， $X_3$  是選



自由 N、S 及 I 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 P、A 及 Y 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 N 及 Y 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 S 及 N 所組群組，X<sub>7</sub> 是選自由 G 及 N 所組群組，X<sub>8</sub> 是選自由 T 及 R 所組群組，X<sub>9</sub> 是選自由 N 及 D 所組群組，X<sub>10</sub> 是選自由 Y 及 S 所組群組，X<sub>11</sub> 是選自由 A 及 N 所組群組，X<sub>12</sub> 是選自由 Q 及 R 所組群組，X<sub>13</sub> 是選自由 K 及 R 所組群組，X<sub>14</sub> 是選自由 F 及 L 所組群組，以及 X<sub>15</sub> 是選自由 Q、K 及 R 所組群組。在一態樣，CDRH2 共有序列是 WINPNSGGTNX<sub>1</sub>AX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>G，其中 X<sub>1</sub> 是 Y 或 S，X<sub>2</sub> 是 Q 或 R，X<sub>3</sub> 是 K 或 R，以及 X<sub>4</sub> 是 R、K 或 Q (SEQ ID NO:28)。

CDRH3 共有序列包括選自由 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>FDX<sub>9</sub> (SEQ ID NO:83) 所組群組之胺基酸序列，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 E 及無胺基酸所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 G 及無胺基酸所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 P、D 及 G 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 Y、W、R 及 K 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 S、W、F 及 T 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 Y 及 L 所組群組，X<sub>7</sub> 是選自由 D 及 G 所組群組，X<sub>8</sub> 是選自由 Y、無胺基酸及 A 所組群組，以及 X<sub>9</sub> 是選自由 M、T 及 V 所組群組。

CDRL1 共有序列包括選自由下所組群組之胺基酸序列：KSSQSX<sub>1</sub>LYSSX<sub>2</sub>NX<sub>3</sub>NX<sub>4</sub>LX<sub>5</sub> (SEQ ID NO:107)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 V 及 I 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 S 及 N 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 E 及 K 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 Y 及 F 所組群組，以及 X<sub>5</sub> 是選自由 T 及 A 所組群組；RASX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO:118)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 Q 及 P 所組群組，X<sub>2</sub>

是選自由 S 及 Y 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 V、L 及 I 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 S 及 C 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 S 及 N 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 S、I、T 及無胺基酸所組群組，X<sub>7</sub> 是選自由 F 及 L 所組群組，以及 X<sub>8</sub> 是選自由 A 及 N 所組群組；以及 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>NX<sub>11</sub>VX<sub>12</sub>(SEQ ID NO:125)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 I、S 及 T 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 R 及 G 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 T 及 S 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 R 及 S 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 G 及 S 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 S、H 及 D 所組群組，X<sub>7</sub> 是選自由 I 及 V 所組群組，X<sub>8</sub> 是選自由 A 及 G 所組群組，X<sub>9</sub> 是選自由無胺基酸及 G 所組群組，X<sub>10</sub> 是選自由 S 及 Y 所組群組，X<sub>11</sub> 是選自由 Y 及 T 所組群組，以及 X<sub>12</sub> 是選自由 Q、N 及 S 所組群組。在一態樣，CDRL1 共有序列是 RASQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>A，其中 X<sub>1</sub> 是 s 或 y，X<sub>2</sub> 是 V、I 或 L，X<sub>3</sub> 是 S 或 N，X<sub>4</sub> 是 S 或 C，X<sub>4</sub> 是 S、T、S 或 Y，X<sub>5</sub> 是 F 或 L(SEQ ID NO:30)。

CDRL2 共有序列包括選自由下所組群組之胺基酸序列：X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>(SEQ ID NO:130)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 G、T 及 W 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 T 及 A 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 S 及 A 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 S 及 T 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 R 及 L 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 A、E 及 Q 所組群組，以及 X<sub>7</sub> 是選自由 T 及 S 所組群組；以及 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>RPS(SEQ ID NO:131)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 E 及 S 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 D、V 及 N 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 D、S 及 N 所組群組，以及 X<sub>4</sub> 是選自由 Q、G 及 H 所組群組。在一態樣，CDRL2 共

有序列為 GX1SSRAT，其中 X1 為 A 或 T(SEQ ID NO:34)。

CDRL3 共有序列包括選自由下所組群組之胺基酸序列：X<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>T(SEQ ID NO:84)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 Q 及 L 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 Y 及 S 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 D、G 及 F 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 R、T 及 S 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 S 及 V 所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 F 及 P 所組群組，以及 X<sub>7</sub> 是選自由 R 及 W 所組群組；以及 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>DSSNX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>(SEQ ID NO:89)，其中 X<sub>1</sub> 是選自由 S 及 A 所組群組，X<sub>2</sub> 是選自由 S 及 A 所組群組，X<sub>3</sub> 是選自由 W 及 F 所組群組，X<sub>4</sub> 是選自由 D 及 T 所組群組，X<sub>5</sub> 是選自由 G、W 及無胺基酸所組群組，X<sub>6</sub> 是選自由 V、L 及 P 所組群組，以及 X<sub>6</sub> 是選自由 V 及無胺基酸所組群組。在一態樣，CDRL3 共有序列是 QQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>T，其中 X<sub>1</sub> 是 Y 或 S，X<sub>2</sub> 是 F、G 或 A，X<sub>3</sub> 是 S、T 或 W，X<sub>4</sub> 是 V、S、F，X<sub>5</sub> 是 F 或 P，X<sub>6</sub> 是 R、W 或 I(SEQ ID NO:46)。

在另一態樣，所提供之 CDRs 是：(a)選自由下所組群組之 CDRH：(i)選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii)選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，(iii)選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3，以及 (iv)一 (i)、(ii)及 (iii)之 CDRH，其含有一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入，但不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸；(B)選自由下所組群組之 CDRL：(i)選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、

64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii)選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(iii)選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3，以及(iv)一(i)、(ii)及(iii)之 CDRL，其含有一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入，但不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸胺基酸。

又在另一態樣，表 2 及 3 所列之 CDRs 變異體形式具有至少 80%、85%、90%或 95%序列相同於表 2 及 3 所列之 CDR 序列。

根據一態樣，所提供為結合 GM-CSF 之經單離之抗原結合蛋白質，含有：(A)一個或一個以上選自由下所組群組之重鏈互補決定區域(CDRH)：(i)選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii)選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，(iii)選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3，以及(iv)一(i)、(ii)及(iii)之 CDRH，其含有一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入 但不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸；(B)一個或一個以上選自由下所組群組之輕鏈互補決定區域(CDRL)：(i)選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii)選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(iii)選自由 SEQ ID

NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3，以及(iv)一(i)、(ii)及(iii)之 CDRL，其含有一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入，但不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸；或(C)一個或一個以上之(A)重鏈 CDRH 以及一個或一個以上之(B)輕鏈 CDRL。

又在另一具體例中，經單離之抗原結合蛋白質可含有：  
(A)選自由下所組群組之 CDRH：(i)選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii)選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，以及(iii)選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；  
(B)選自由下所組群組之 CDRL：(i)選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii)選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(iii)選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；或  
(C)一個或一個以上之(A)重鏈 CDRH 以及一個或一個以上之(B)輕鏈 CDRL。

在另一具體例中，可變重鏈(VH)具有至少 80%、85%、90%或 95%序列相同於選自由 SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129 及 141 所組群組之胺基酸序列，及/或可變輕鏈(VL)具有至少 80%、85%、90%或 95%序列相同於選自由 SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、

87、99、111、123 及 135 所組群組之胺基酸序列。

在另一態樣，提供結合 GM-CSF 之經單離之抗原結合蛋白質，該抗原結合蛋白質包括：A)選自由下所組群組之重鏈互補決定區域(CDRH)：(i)選自由 SEQ ID NOs:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3，(ii)一 CDRH3，其胺基酸序列與(i)之 CDRH3 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，(iii)選自由  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8FDX_9$ (SEQ ID NO:83)所組群組之 CDRH3 胺基酸序列，其中  $X_1$  是選自由 E 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_3$  是選自由 P、D 及 G 所組群組， $X_4$  是選自由 Y、W、R 及 K 所組群組， $X_5$  是選自由 S、W、F 及 T 所組群組， $X_6$  是選自由 Y 及 L 所組群組， $X_7$  是選自由 D 及 G 所組群組， $X_8$  是選自由 Y、無胺基酸及 A 所組群組，以及  $X_9$  是選自由 M、T 及 V 所組群組；及/或 B)選自由下所組群組之輕鏈互補決定區域(CDRL)：(i)選自由 SEQ ID NOs:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3，(ii)一 CDRL3，其胺基酸序列與(i)之 CDRL3 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，以及 iii)選自由下所組群組之 CDRL3 胺基酸序列： $X_1QX_2X_3X_4X_5X_6X_7T$ (SEQ ID NO:84)，其中  $X_1$  是選自由 Q 及 L 所組群組， $X_2$  是選自由 Y 及 S 所組群組， $X_3$  是選自由 D、G 及 F 所組群組， $X_4$  是選自由 R、T 及 S 所組群組， $X_5$  是選自由 S 及 V 所組群組， $X_6$  是選自由 F 及 P 所組群組，以及  $X_7$  是選自由 R 及 W 所組群組；以及

$X_1X_2X_3X_4DSSNX_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:89)，其中  $X_1$  是選自由 S 及 A 所組群組， $X_2$  是選自由 S 及 A 所組群組， $X_3$  是選自由 W 及 F 所組群組， $X_4$  是選自由 D 及 T 所組群組， $X_5$  是選自由 G、W 及無胺基酸所組群組， $X_6$  是選自由 V、L 及 P 所組群組及  $X_7$  是選自由 V 及無胺基酸所組群組。

在另一具體例中，抗原結合蛋白質進一步含有：A)選自由下所組群組之 CDRH：(i)選自由 SEQ ID NOs:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1，(ii)一 CDRH1，其胺基酸序列與 (i)之 CDRH1 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，(iii)選自由  $X_1X_2GX_3X_4XFX_5X_6YX_7X_8X_9$  (SEQ ID NO:94)所組群組之 CDRH1 胺基酸序列，其中  $X_1$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 G 及無胺基酸所組群組， $X_3$  是選自由 Y 及 F 所組群組， $X_4$  是選自由 T 及 S 所組群組， $X_5$  是選自由 T、S 及 G 所組群組， $X_6$  是選自由 G 及 S 所組群組， $X_7$  是選自由 Y 及 G 所組群組， $X_8$  是選自由 I 及 M 所組群組，以及  $X_9$  是選自由 H 及 S 所組群組，或 (iv)選自由 SEQ ID NOs:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2，(v)一 CDRH2，其胺基酸序列與 (iv)之 CDRH2 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，或 (vi)由  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}G$  (SEQ ID NO:106)CDRH2 組成之胺基酸序列，其中  $X_1$  是選自由 W 及無胺基酸所組群組， $X_2$  是選自由 I 及 Y 所組群組， $X_3$  是選自由 N、S 及 I 所組群組， $X_4$  是選自由 P、A 及 Y 所組群組， $X_5$  是選自由 N 及 Y 所組群組， $X_6$  是選自由 S 及 N

所組群組， $X_7$  是選自由 G 及 N 所組群組， $X_8$  是選自由 T 及 R 所組群組， $X_9$  是選自由 N 及 D 所組群組， $X_{10}$  是選自由 Y 及 S 所組群組， $X_{11}$  是選自由 A 及 N 所組群組， $X_{12}$  是選自由 Q 及 R 所組群組， $X_{13}$  是選自由 K 及 R 所組群組， $X_{14}$  是選自由 F 及 L 所組群組，以及  $X_{15}$  是選自由 Q、K 及 R 所組群組；或 B) 選自由下所組群組之 CDRL：(i) 選自由 SEQ ID NOs: 4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1，(ii) 一 CDRL1，其胺基酸序列與 (i) 之 CDRL1 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，(iii) 選自由下所組群組之 CDRL1 胺基酸序列： $KSSQSX_1XLYSSX_2NX_3NX_4LX_5$  (SEQ ID NO: 107)，其中  $X_1$  是選自由 V 及 I 所組群組， $X_2$  是選自由 S 及 N 所組群組， $X_3$  是選自由 E 及 K 所組群組， $X_4$  是選自由 Y 及 F 所組群組，以及  $X_5$  是選自由 T 及 A 所組群組； $RASX_1X_2X_3X_4X_5X_6YX_7X_8$  (SEQ ID NO: 118)，其中  $X_1$  是選自由 Q 及 P 所組群組， $X_2$  是選自由 S 及 Y 所組群組， $X_3$  是選自由 V、L 及 I 所組群組， $X_4$  是選自由 S 及 C 所組群組， $X_5$  是選自由 S 及 N 所組群組， $X_6$  是選自由 S、I、T 及無胺基酸所組群組， $X_7$  是選自由 F 及 L 所組群組，以及  $X_8$  是選自由 A 及 N 所組群組；或  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YX_7X_8X_9X_{10}NX_{11}VX_{12}$  (SEQ ID NO: 125)，其中  $X_1$  是選自由 I、S 及 T 所組群組， $X_2$  是選自由 R 及 G 所組群組， $X_3$  是選自由 T 及 S 所組群組， $X_4$  是選自由 R 及 S 所組群組， $X_5$  是選自由 G 及 S 所組群組， $X_6$  是選自由 S、H 及 D 所組群組， $X_7$  是選自由 I 及 V 所組



群組， $X_8$  是選自由 A 及 G 所組群組， $X_9$  是選自由無胺基酸及 G 所組群組， $X_{10}$  是選自由 S 及 Y 所組群組， $X_{11}$  是選自由 Y 及 T 所組群組，以及  $X_{12}$  是選自由 Q、N 及 S 所組群組，或 (iv) 選自由 SEQ ID NOs:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2，(v) 一 CDRL2，其胺基酸序列與 (iv) 之 CDRL2 的差異為不超過 2 個胺基酸之胺基酸添加、刪除或取代，或 (vi) 選自由下所組群組之 CDRL2 胺基酸序列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO:130)，中  $X_1$  是選自由 G、T 及 W 所組群組， $X_2$  是選自由 T 及 A 所組群組， $X_3$  是選自由 S 及 A 所組群組， $X_4$  是選自由 S 及 T 所組群組， $X_5$  是選自由 R 及 L 所組群組， $X_6$  是選自由 A、E 及 Q 所組群組，以及  $X_7$  是選自由 T 及 S 所組群組；或  $X_1X_2X_3X_4RPS$ (SEQ ID NO:131)，其中  $X_1$  是選自由 E 及 S 所組群組， $X_2$  是選自由 D、V 及 N 所組群組， $X_3$  是選自由 D、S 及 N 所組群組，以及  $X_4$  是選自由 Q、G 及 H 所組群組。

在一態樣，本文中提供之經單離之抗原結合蛋白質可為單株抗體，多株抗體，重組抗體，人類抗體，人類化抗體，嵌合型抗體，多專一性抗體或其抗體片段。

在另一具體例中，本文中提供之經單離之抗原結合蛋白質的抗體片段，可為 Fab 片段，Fab' 片段， $F(ab')_2$  片段，Fv 片段，雙鏈抗體(diabody)或單鏈抗體分子。

在進一步之一具體例中，本文中提供之經單離之抗原結合蛋白質是人類抗體，且可為 IgG1-、IgG2-、IgG3- 或 IgG4- 類型。

又在另一態樣，本文中提供之經單離之抗原結合蛋白質可偶合至一標記基且能與本文所提供經單離之抗原結合蛋白質之一抗原結合蛋白質競爭結合至人類 GM-CSF 的細胞外部分。在一具體例中，當投與本文所提供經單離之抗原結合蛋白質至病人時，能降低單核球趨化性、抑制單核球遷移到腫瘤或抑制腫瘤中與腫瘤有關之巨噬細胞的積聚。

熟習該項技藝者可知，對於具有一個以上來自所述序列 CDR 之任何抗原結合蛋白質，獨立選自所述序列 CDRs 之任何組合是有用的。因此，可製自具有 1、2、3、4、5 或 6 個獨立選自 CDRs 之抗原結合蛋白質。然而，如熟習該項技藝者可知，特定的具體例通常利用非反覆 CDRs 之組合，例如抗原結合蛋白質通常不以兩 CDRH2 區域來製造等等。

一些所提供之抗原結合蛋白質更詳細討論於下。

#### 抗原結合蛋白質以及結合抗原決定基

當聲稱一抗原結合蛋白質結合指定殘基內之抗原決定基時，例如 GM-CSF 或 GM-CSF 之細胞外功能部位，舉例而言其意指該抗原結合蛋白質專一結合至由指定殘基組成之多胜肽(例如 GM-CSF 的指定節段)。此等抗原結合蛋白質通常不接觸 GM-CSF 或 GM-CSF 之細胞外功能部位內的每一殘基。並非 GM-CSF 或 GM-CSF 之細胞外功能部位內每單一胺基酸取代或刪除是顯著影響結合親和力所需。抗原結合蛋白質之抗原決定基專一性可由各種方法決定。一方法例如包括測試大量之約 15 個胺基酸跨越抗原序列且不同地增加小數量胺基酸(例如 3 個胺基酸)之重疊胜肽。該胜肽固定於微滴

定皿的井內。固定可經由該胜肽的一末端生物素化而有效。可選擇地，相同胜肽的不同樣本可在胺基及羧基末端生物素化並固定在欲比較用的分隔井內。此可用於鑑定末端專一之抗原結合蛋白質。可選擇地，可包括額外的胜肽在感興趣之特殊胺基酸的終端。此方法可用於鑑定對 GM-CSF 內部片段 (或 GM-CSF 之細胞外功能部位) 之末端專一之抗原結合蛋白質。使用抗原結合蛋白質或免疫功能性片段篩選專一結合至各個不同的胜肽。抗原決定基被定義為存在一全部胜肽共有之胺基酸節段，抗原結合蛋白質對它顯現專一性結合。關於定義抗原決定基之專一方法的細節於實施例 13 中提出。

### 競爭抗原結合蛋白質

在另一態樣，提供之抗原結合蛋白質與一例示之抗體或功能片段競爭結合至上述抗原決定基，以專一結合至 GM-CSF。此等抗原結合蛋白質亦可如文中例示之一抗原結合蛋白質，結合至相同抗原決定基，或重疊之抗原決定基。與例示之抗原結合蛋白質競爭或結合至相同抗原決定基之抗原結合蛋白質及片段，被預期將顯示類似的功能特性。例示之抗原結合蛋白質及片段包括以上所述者，包括含於表 1、2 及 3 之具重鏈及輕鏈、可變區域功能部位及 CDRs 者。

#### 1. 單株抗體

提供之抗原結合蛋白質包括結合至 GM-CSF 之單株抗體。單株抗體可使用技藝已知的任何技術製造，例如免疫行程安排完全後，使收取自基因轉殖動物的脾臟細胞永生不死。能使用技藝已知的任何技術使脾臟細胞永生不死，例如

經由使他們與骨髓瘤細胞融合以製造融合瘤。用於製造融合瘤融合步驟之骨髓瘤細胞較佳為非抗體製造性、具有高融合效率且缺乏使他們無法生長於某些選擇性培養基而只支持所欲的融合細胞(融合瘤)生長的酵素。用於小鼠融合的適當細胞株實例包括 Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 及 S194/5XX0 Bul; 用於大鼠融合的適當細胞株實例包括 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 及 4B210。可用於細胞融合的其他細胞株為 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 及 UC729-6。

在某些場合，在一具體例中，融合瘤細胞株之製造是以 GM-CSF 免疫原免疫動物(例如具有人類免疫球蛋白序列之基因轉殖動物); 從被免疫動物收取脾臟細胞; 融合收取之脾臟細胞至骨髓瘤細胞株，藉此產生融合瘤細胞; 從融合瘤細胞確定融合瘤細胞株並鑑定產生結合 GM-CSF 多胜肽之抗體的融合瘤細胞株。此等融合瘤細胞株及由他們產生之抗-GM-CSF 單株抗體包含於本發明中。

融合瘤細胞株分泌之單株抗體能使用技藝已知的任何技術純化。可進一步篩選融合瘤或單株抗體以鑑定具特殊性質之單株抗體，例如阻斷 Wnt 誘發活性之能力。此等篩選的實例提供於以下實施例中。

## 2. 嵌合型及人類化抗體

也提供以前述序列為基礎之嵌合型及人類化抗體。用於作為治療劑之單株抗體在使用之前可經各種修飾。一實施例

為嵌合型抗體，其係由來自不同抗體的蛋白質節段(其共價連接以產生功能性免疫球蛋白輕鏈或重鏈或其免疫功能性部分)所構成之抗體。通常，重鏈及/或輕鏈之一部分是一樣於或同源於(homologous)衍生自特殊物種之抗體或屬於特殊抗體類型或亞型中之對應序列，而剩餘鏈是一樣於或同源於衍生自另一物種之抗體或屬於另一抗體類型或亞型中之對應序列。有關嵌合型抗體之方法，例如參閱美國專利第 4,816,567 號以及 Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855。CDR 移植敘述於例如美國專利第 6,180,370 號、第 5,693,762 號、第 5,693,761 號、第 5,585,089 及第 5,530,101 號。

通常製造嵌合型抗體的目的是為創造嵌合體，其中來自預計病人物種之胺基酸數目被最大化。一實施例是“CDR 移植”之抗體，其中該抗體含有一個或一個以上來自特殊物種或屬於特殊抗體類型或亞型屬於同型物抗體之互補決定區域(CDRs)，而剩餘抗體鏈是一樣於或同源於衍生自另一物種之抗體或屬於另一抗體類型或亞型中之對應序列。用於人類時，可變區域或選自齧齒目動物抗體之 CDRs 常被移植到人類抗體，置換人類抗體中天然存在的可變區域或 CDRs。

嵌合型抗體之一可用類型為“人類化”抗體。通常，人類化抗體是製造自最初產生於非人類動物之單株抗體。在此單株抗體之某些胺基酸殘基，通常來自抗體之非抗原辨識，係經修飾以同源於人類抗體對應同型物中之對應殘基。人類化能使用各種方法進行，例如經由對人類抗體之對應區域取代

以至少一部分齧齒目動物可變區域(例如參閱美國專利第 5,585,089 號及第 5,693,762 號 ; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536)。

在一態樣，文中提供之抗體輕鏈及重鏈可變區域之 CDRs(參閱表 2)被移植至相同、不同或親源物種(phylogenetic species)抗體的骨架區域(FRs)。例如重鏈及輕鏈可變區域 V<sub>H</sub>1、V<sub>H</sub>2、V<sub>H</sub>3、V<sub>H</sub>4、V<sub>H</sub>5、V<sub>H</sub>6、V<sub>H</sub>7、V<sub>H</sub>8、V<sub>H</sub>9、V<sub>H</sub>10、V<sub>H</sub>11 及 V<sub>H</sub>12，及/或 V<sub>L</sub>1、V<sub>L</sub>2、V<sub>L</sub>3、V<sub>L</sub>4、V<sub>L</sub>5、V<sub>L</sub>6、V<sub>L</sub>7、V<sub>L</sub>8、V<sub>L</sub>9、V<sub>L</sub>10、V<sub>L</sub>11 及 V<sub>L</sub>12 之 CDRs 可被移植至共有的人類 FRs。為創造共有的人類 FRs，來自數種人類重鏈或輕鏈胺基酸序列之 FRs 可經對齊以鑑定共有胺基酸序列。在其他具體例中，本文中揭示之重鏈或輕鏈的 FRs 被來自不同重鏈或輕鏈的 FRs 置換。在一態樣，抗-GM-CSF 抗體之重鏈及輕鏈的 FRs 中罕見胺基酸不會被置換，而其餘的 FR 胺基酸被置換。“罕見胺基酸(rare amino acid)”是在一位置中的專一的胺基酸，此特殊胺基酸通常未見於 FR。另外，來自一重鏈或輕鏈之經移植可變區域可與不同於本文所揭示之特殊重鏈或輕鏈恆定區域之恆定區域使用。在其他具體例中，經移植可變區域是單鏈 Fv 抗體的一部分。

在特定具體例中，來自人類以外其他物種之恆定區域可與人類可變區域一起使用以產生混合抗體(hybrid antibodies)。

### 3. 完全人類抗體

也提供完全人類抗體。製造專一於所給抗原但未使人類接觸該抗原之完全人類抗體之方法是可得的(“完全人類抗體”)。提供用於實施製造完全人類抗體之一具體方法是小鼠體液性免疫系統的“人類化”。導入人類免疫球蛋白(Ig)所在於小鼠(其中小鼠的內源性 Ig 基因已被去活性)是在小鼠、能以任何所欲抗原免疫之動物中製造完全人類單株抗體(mAbs)之一方法。使用完全人類抗體能免疫免疫原性及過敏性反應，其有些是因投與小鼠或衍生自小鼠的 mAbs 至人類作為治療劑所引起的。

完全人類抗體可經由免疫基因轉殖動物(通常為小鼠)來製造，該動物能在缺乏產生內源性免疫球蛋白中製造全部人類抗體。用於此目的之抗原典型具有六個或六個以上連續的胺基酸，且可共軛至一載劑，例如半抗原。例如參閱 Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-258; and Bruggermann et al., 1993, *Year in Immunol.* 7:33。此方法之一實例中，基因轉殖動物的製造是使編碼小鼠免疫球蛋白鏈中重鏈及輕鏈的內源性小鼠免疫球蛋白所在失能，並插入含有編碼人類重鏈及輕鏈蛋白質所在的人類基因體 DNA 到小鼠基因體大片段中。具有少於整體人類免疫球蛋白所在之經部分修飾之動物，之後經雜交以得到具有全部所欲免疫系統修飾之動物。當投與免疫原後，這些基因轉殖動物產生免疫專一於該免疫原之抗體，但具有人類而非鼠類的胺基酸序列，包括可變區域。此等方法之進一步詳細說明請參閱例如 WO96/33735 及 WO94/02602。有關

基因轉殖小鼠製造人類抗體的額外方法敘述於美國專利第 5,545,807 號、第 6,713,610 號、第 6,673,986 號、第 6,162,963 號、第 5,545,807 號、第 6,300,129 號、第 6,255,458 號、第 5,877,397 號、第 5,874,299 及第 5,545,806 號；PCT 公開號 WO91/10741、WO90/04036 以及 EP 546073B1 及 EP 546073A1。

上述之基因轉殖小鼠於本文中稱為“HuMab”小鼠，含有一人類免疫球蛋白基因微小基因座，其編碼未重新排列之人類重鏈 ( $[\mu]$  及  $[\gamma]$ ) 及  $[\kappa]$  輕鏈免疫球蛋白序列，和去活化內源性  $[\mu]$  及  $[\kappa]$  鏈所在之靶突變 (Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859)。因此，該小鼠展現降低表現小鼠 IgM 或  $[\kappa]$  且對免疫作用反應，以及導入之人類重鏈及輕鏈轉殖基因進行型交換 (class switching) 及體細胞突變以產生高親和力人類 IgG $[\kappa]$  單株抗體 (Lonberg *et al.*, *supra.*; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMab 小鼠之製備詳細敘述於 Taylor *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.*, 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-85。進一步參閱美國專利第 5,545,806 號、第 5,569,825 號、第 5,625,126 號、第 5,633,425 號、第 5,789,650 號、第 5,877,397 號、第 5,661,016 號、第



5,814,318 號、第 5,874,299 及第 5,770,429 號以及美國專利第 5,545,807 號；PCT 公開號 WO 93/1227、WO 92/22646 及 WO 92/03918。用於在這些基因轉殖小鼠製人類抗體之技術也揭示於 PCT 公開號 WO 98/24893 以及 Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156。舉例而言，能使用 HCo7 及 HCo12 基因轉殖小鼠品系製造抗-GM-CSF 抗體。

使用融合瘤技術可製造並從如上所述之基因轉殖小鼠選擇具所欲專一性之抗原專一性人類 mAbs。使用適合的載體及宿主細胞，此等抗體可經選殖及表現，或可從培養的融合瘤細胞收取抗體。

完全人類抗體亦可衍生自噬菌體展現 (phage display) 資料庫 (例如揭示於 Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; and Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581)。噬菌體展現技術模仿免疫篩選，透過在絲狀細菌噬菌體的表面展現抗體庫，隨後並經由他們結合至所選抗原來篩選噬菌體。此等技術之一敘述於 PCT 公開號 WO 99/10494，其敘述使用此等方法對 MPL- 及 msk-受體具高親和力及功能性作用抗體之單離。

#### 4. 雙專一性或雙功能性抗原結合蛋白質

提供之抗原結合蛋白質也包括雙專一性及雙功能性抗體，其包括如上所述一個或一個以上 CDRs 或一個或一個以上可變區域。雙專一性或雙功能性抗體在某些情形是具有兩不同重鏈/輕鏈對及兩不同結合位置之人造混合抗體。雙專一性抗體可由各種方法製造，包括但不限於融合瘤之融合或 Fab'片段的連接。例如參閱 Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp.*

*Immunol.* 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553。

## 5. 各種其他形式

所提供之一些抗原結合蛋白質是以上揭示之抗原結合蛋白質的變異體型(例如具有表 1-4 所列序列者)。例如一些抗原結合蛋白質具有一個或一個以上保守胺基酸取代於一個或一個以上表 1-4 所列之重鏈或輕鏈、可變區域或 CDRs。

天然存在之胺基酸依據常見側鏈性質可分類為：

- 1) 疏水性：正白胺酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；
- 2) 中性親水性：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；
- 3) 酸性：Asp，Glu；
- 4) 鹼性：His，Lys，Arg；
- 5) 影響鏈方位之殘基：Gly，Pro；以及
- 6) 芳香族：Trp，Tyr，Phe。

保守胺基酸取代可包括這些分類之一類的成員與同類另一成員的交換。保守胺基酸取代可包含非天然存在的胺基酸殘基，其通常經由化學肽合成併入而非經由生物系統合成併入。這些包括擬肽(peptidomimetics)及胺基酸部分的其他反向或顛倒形式。

非保守取代可包括將以上種類之一成員交換為另一種類之一成員。此等經取代殘基可導入同源於人類抗體之抗體的區域，或導入該分子的非同源區域。

製造此改變時，根據特定具體例可考慮胺基酸的親水指數(hydrophobic index)。蛋白質的親水概廓是經由指定每一胺基酸一數值(“親水指數”)來計算，然後延著肽鏈重複平

均這些數值。每一胺基酸依據其疏水性及電荷特性已被指定親水指數。他們為：異白胺酸(+4.5)，纈胺酸(+4.2)，白胺酸(+3.8)，苯丙胺酸(+2.8)，半胱胺酸/胱胺酸(+2.5)，甲硫胺酸(+1.9)，丙胺酸(+1.8)，甘胺酸(-0.4)，酥胺酸(-0.7)，絲胺酸(-0.8)，色胺酸(-0.9)，酪胺酸(-1.3)，脯胺酸(-1.6)，組胺酸(-3.2)，麩胺酸(-3.5)，麩醯胺酸(-3.5)，天冬胺酸(-3.5)，天冬醯胺酸(-3.5)，離胺酸(-3.9)以及精胺酸(-4.5)。

技藝已瞭解親水概廓在賦予蛋白質交互作用之生物功能上的重要性(例如參閱 Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-131)。已知某些胺基酸可取代具有類似親水指數或計分之其他胺基酸，且仍保留類似的生物活性。基於親水指數製造之改變，在特定具體例中包括親水指數在 $\pm 2$ 以內之胺基酸的取代。在某些態樣，包括在 $\pm 1$ 以內者，以及在其他態樣，包括在 $\pm 0.5$ 以內者。

技藝也已瞭解，基於親水性可有效產生類似胺基酸的取代，特別是藉此創造之生物功能性蛋白質或胜肽，預計可用於免疫具體例中，如目前情形。在特定具體例中，蛋白質之最大局部平均親水性(由其鄰近胺基酸之親水性所控制)關聯於其免疫原性及抗原結合或免疫原性，亦即關聯於蛋白質的生物特性。

這些胺基酸殘基已被指定下列親水性值：精胺酸(+3.0)，離胺酸(+3.0)，天冬胺酸(+3.0 $\pm$ 1)，麩胺酸(+3.0 $\pm$ 1)，絲胺酸(+0.3)，天冬醯胺酸(+0.2)，麩醯胺酸(+0.2)，甘胺酸(0)，酥胺酸(-0.4)，脯胺酸(-0.5 $\pm$ 1)，丙胺酸(-0.5)，組胺酸

(-0.5)，半胱氨酸(-1.0)，甲硫氨酸(-1.3)，纈氨酸(-1.5)，白氨酸(-1.8)，異白氨酸(-1.8)，酪氨酸(-2.3)，苯丙氨酸(-2.5)以及色氨酸(-3.4)。依據類似親水性值製造改變時，在特定具體例中包括親水性值在 $\pm 2$ 以內之胺基酸的取代，在其他具體例中包括在 $\pm 1$ 以內者；以及又於其他具體例中包括在 $\pm 0.5$ 以內者。在某些場合，亦可從一級胺基酸序列、依據親水性鑑定抗原決定基。這些區域也稱為“抗原決定基核心區域”。

示範性保守胺基酸取代提出於表 4。

表 4：保守胺基酸取代

原本的殘基	示範性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

熟悉該項技藝者能使用熟知技術決定本文中所述之適宜的多胜肽變異體。熟悉該項技藝者經由對準不認為對活性具重要性之區域，可確認能改變但未破壞活性之分子的適宜範圍。熟悉該項技藝者也能確認類似多胜肽間是保守的分子殘基及一部分。在進一步之具體例中，連可能對生物活性或結構是重要之區域可進行保守胺基酸取代而未破壞生物活性或對多胜肽結構無不利影響。

此外，熟悉該項技藝者能檢閱結構-功能研究，確認類似多胜肽中對活性或結構是重要的殘基。鑑於如此比較，能預料蛋白質中胺基酸殘基的重要性，該胺基酸殘基對應於類似蛋白質中對活性或結構是重要的胺基酸殘基。熟悉該項技藝者可選擇化學性類似之胺基酸取代此等經預料之重要胺基酸殘基。

熟悉該項技藝者也能在類似多胜肽中分析有關其結構之 3-次元結構及胺基酸序列。考慮此等資訊，熟悉該項技藝者可預料有關其 3 次元結構之抗體胺基酸殘基的對齊。熟悉該項技藝者可選擇對預料將位於蛋白質表面的胺基酸殘基不製造基本的改變，因為此等殘基可能涉及與其他分子的重要相互作用。再者，熟悉該項技藝者可製造含有單一胺基酸取代在每一所欲胺基酸殘基之測試變異體。然後使用關於 GM-CSF 中和活性之分析法篩選這些變異體，(參閱以下實施例)如此可得到有關哪一胺基酸可經改變以及哪一個肯定不能改變的資訊。換言之，依據此等例行實驗所收集之資訊，熟悉該項技藝者能輕易決定胺基酸位置，其應避免單獨的或

組合其他突變之進一步取代。

已有一些科學刊物致力於二級結構的預測。參閱 Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou *et al.*, 1974, *Biochem.* 13:222-245; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou *et al.*, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; 以及 Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-384。再者，目前可使用電腦程式協助預測二級結構。預測二級結構之一是基於同質性模擬 (homology modeling)。舉例而言，具有序列相同性大於 30% 或相似度大於 40% 之兩多胜肽或蛋白質常具有類似結構拓撲學。近日之蛋白質結構資料庫 (PDB) 的成長已使二級結構的可預測性提高，包括多胜肽或蛋白質結構中摺疊的可能數量。參閱 Holm *et al.*, 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247。已提出 (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376) 所給多胜肽或蛋白質中存有有限的摺疊數量，且一旦結構的關鍵數量已被解決，則結構預測將戲劇性地變得更準確。

預測二級結構之額外方法包括“線程 (threading)” (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-387; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19)，“概廓分析 (profile analysis)” (Bowie *et al.*, 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov *et al.*, 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358) 以及“進化連接 (evolutionary linkage)” (參閱 Holm, 1999, 同上，以及 Brenner, 1997, 同上)。

在某些具體例中，製造胺基酸取代係為：(1) 降低對蛋白水解的感受性，(2) 降低對氧化的感受性，(3) 改變對形成

之蛋白質複合體的結合親和力，(4)改變配體或抗原結合親和力，及/或(4)在此等多胜肽上給予或修飾其他物理化學或功能性特性。舉例而言，單一或多胺基酸取代(在特定具體例中，保守胺基酸取代)可製作於天然存在之序列。取代可製造於位在形成分子間接觸之功能部位外側之部分抗體。於此具體例中，可使用之“保守性胺基酸取代”不會實質改變親代序列的結構特徵(例如，一個或一個以上的置換胺基酸不會瓦解親代或天然抗原結合蛋白質之二級結構特徵)。技藝辯認多胜肽二級及三級結構之實例敘述於 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; *Introduction to Protein Structure* (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; 以及 Thornton *et al.*, 1991, *Nature* 354:105。

額外較佳之抗體變異體包括半胱胺酸變異體，其中親代或天然胺基酸序列中一個或一個以上半胱胺酸殘基被刪除或被取代以另一胺基酸(例如絲胺酸)。半胱胺酸變異體可用於特別是抗體必須再摺疊為生物活性構形時。半胱胺酸變異體可具有比天然抗體更少的半胱胺酸殘基，且通常具有偶數以使來自未配對半胱胺酸之相互作用最小化。

揭示之重鏈及輕鏈、可變區域功能部位及 CDRs 可用於製備多胜肽，該多胜肽含有能專一結合至 GM-CSF 多胜肽之抗原結合區域。舉例而言，表 3 及 4 所列之一個或一個以上 CDRs 能共價或非共價併入分子(例如多胜肽)以產生免疫附著。免疫附著可併入 CDR(s)作為較大多胜肽鏈之一部分，

可共價連接 CDR(s)至另一多多胜肽鏈，或可非共價併入 CDR(s)。CDR(s)使免疫附著能專一結合至感興的特殊抗原(例如一 GM-CSF 多胜肽或其抗原決定基)。

也提供基於本文中所揭示可變區域功能部位及 CDRs 之擬物(mimetics)(例如“胜肽擬物(peptide mimetics)”或“擬肽(peptidomimetics)”)。這些類似物可為胜肽、非胜肽、或胜肽及非胜肽區域之組合。Fauchere, 1986, *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber and Freidinger, 1985, *TINS* p. 392; and Evans *et al.*, 1987, *J. Med. Chem.* 30:1229。結構類似於治療用胜肽之胜肽擬物可用於產生類似的治療或預防效果。此等化合物常藉助電腦化分子模擬來研發。一般而言，擬肽(peptidomimetics)是蛋白質，結構類似於展現所欲生物活性(例如專一結合 GM-CSF 的能力)的抗體，但具有一個或一個以上的胜肽連接，可以技藝熟知的方法經由選自下列所組群組組成之連接置換： $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}-\text{CH}-$ (順式及反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 以及 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。以相同種類 D-胺基酸之共有序列一個或一個以上胺基酸的系統性取代(例如 D-離胺酸代替 L-離胺酸)，亦可用於某些具體例中產生更穩定的蛋白質。此外，含有共有序列或實質相同的共有序列變異之受限胜肽，可由技藝已知方法製造(Rizo and Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387)，例如經由添加內部半胱胺酸殘基，其能形成環化胜肽之分子內二硫橋(disulfide bridges)。

也提供本文中所述抗原結合蛋白質之衍生物。該衍生之抗原結合蛋白質可含有任何分子或物質給予抗體或片段所



欲性質，例如於特定用途時增加半衰期。該衍生之抗原結合蛋白質能含有，例如可偵測(或標記)部分(例如放射性、比色性、抗原性或酵素性分子，可偵測珠(例如磁性或電密集(例如金)珠)，或結合至另一分子之分子(例如生物素或卵白素(streptavidin)))，治療或診斷部分(例如放射性、細胞毒性或醫藥活性部分)，或增加特定用途時抗原結合蛋白質適合性的分子(例如投與至患者，例如人類病患或其他活體內或活體外用途)。能用於衍生抗原結合蛋白質之分子的實例包括白蛋白(例如人類血清白蛋白)以及聚乙二醇(PEG)。能使用技藝已熟知技術製備抗原結合蛋白質之白蛋白-連接及 PEG 化衍生物。在一具體例中，抗原結合蛋白質共軛或另外連接至甲狀腺運送蛋白(TTR)或 TTR 變異體。TTR 或 TTR 變異體能以例如選自葡聚糖、聚(n-乙烷基-2-吡咯酮)、聚乙二醇、聚丙二醇同質聚合物、聚環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇類以及聚乙炔醇類所組群組之化學劑經化學修飾。

其他衍生物包括 GM-CSF 抗原結合蛋白質與其他蛋白質或多胜肽之共價或聚集共軛物，例如經由表現含有異質多胜肽接合至 GM-CSF 抗原結合蛋白質 N-末端或 C-末端之重組的接合蛋白。舉例而言，共軛之胜肽可為異質訊息(或前導(leader))多胜肽，例如酵母菌  $\alpha$ -因子前導( $\alpha$ -factor leader)，或胜肽例如抗原決定基標籤。含 GM-CSF 抗原結合蛋白質之接合蛋白質能含有添加以促進 GM-CSF 抗原結合蛋白質純化或鑑定之胜肽(例如聚-組胺酸)。GM-CSF 抗原

結合蛋白質也能連接到如敘述於 Hopp *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6:1204 以及美國專利第 5,011,912 號之 FLAG 胜肽。FLAG 胜肽具高度抗原性且提供經專一單株抗體 (mAb) 可逆地結合之抗原決定基，能快速分析及易於純化所表現之重組蛋白質。可用於製備接合蛋白質 (其中 FLAG 胜肽接合到所給多胜肽) 之試劑可獲自市售商品 (Sigma, St. Louis, MO)。

含一個或一個以上 GM-CSF 抗原結合蛋白質之寡聚物可運用於作為 GM-CSF 拮抗劑。寡聚物可為共價連接或非共價連接之二聚體、三聚體、或更高的寡聚物之形式。含有兩個或兩個以上 GM-CSF 抗原結合蛋白質之寡聚物的一實例被預期以同質二聚體使用。其他寡聚物包括異質二聚體、同質三聚體、雜質三聚體、同質四聚體，雜質四聚體等等。

一具體例是針對寡聚物，其含有透過接合到 GM-CSF 抗原結合蛋白質之胜肽部分間共價或非共價交互作用連結之多 GM-CSF-結合多胜肽。此等胜肽可為胜肽連接體 (spacers) 或具有促進寡聚物化作用之胜肽。白胺酸拉鍊結構及衍生自抗體的某些多胜肽是在能促進附著於 GM-CSF 抗原結合蛋白質的寡聚物化作用之胜肽中，詳細如下所述。

在特殊具體例中，寡聚物含有二到四個 GM-CSF 抗原結合蛋白質。該寡聚物之 GM-CSF 抗原結合蛋白質部分可為上述之任何形式，例如變異體或片段。較佳為寡聚物含有具有 GM-CSF 結合活性之 GM-CSF 抗原結合蛋白質。

在一具體例中，寡聚物是使用衍生自免疫球蛋白之多胜肽製備。含有某些異質多胜肽接合到抗體衍生之多胜肽各種

部分(包括 Fc 功能部位)之接合蛋白的製備，已敘述於例如 Ashkenazi *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Byrn *et al.*, 1990, *Nature* 344:677; and Hollenbaugh *et al.*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11。

一具體例是針對經由接合 GM-CSF 抗原結合蛋白質至抗體 Fc 區域所產生之含有兩接合蛋白之二聚體。該二聚體之製造能經由例如插入一編碼該接合蛋白之基因接合體至適當的表現載體，在以重組表現載體轉形之宿主細胞中表現該基因接合體，並使所表現之接合蛋白質裝配更像抗體分子，於是 Fc 部分間形成鏈間二硫鍵以產生二聚體。

文中使用之用語“Fc 多胜肽”包括衍生自抗體 Fc 區域之多胜肽之天然及突變蛋白質形式。也包括含有促進二聚體化之樞紐區之此等多肽的截頭形式(truncated forms)。含有 Fc 部分(以及從其形成之寡聚物)之接合蛋白質提供以親和力色層分析經蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱易於純化之優點。

敘述於 PCT 公開號 WO 93/10151 及美國專利第 5,426,048 號與第 5,262,522 號之一適當的 Fc 多胜肽，是單鏈多胜肽從人類 IgG1 抗體 Fc 區域之 N-末端樞紐區延伸至天然 C-末端。另一可用 Fc 多胜肽是 Fc 突變蛋白質，敘述於美國專利第 5,457,035 號及 Baum *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001。此突變蛋白質之胺基酸序列相同於 WO 公開號 93/10151 所示之天然 Fc 序列，除胺基酸 19 已從 Leu 改爲 Ala，胺基酸 20 已從 Leu 改爲 Glu，以及胺基酸 22 已從 Gly

改爲 Ala 除外。突變蛋白質對 Fc 受器展現降低的親和力。

在其他具體例中，GM-CSF 抗原結合蛋白質之重鏈及 / 或輕鏈的可變部分可替換抗體重鏈及 / 或輕鏈的可變部分。

此外，寡聚物是含有多 GM-CSF 抗原結合蛋白質及含或不含胜肽連接體 (spacer peptides) 之接合蛋白質。適宜之胜肽連接體爲美國專利第 4,751,180 及 4,935,233 號所述者。

寡聚物 GM-CSF 抗原結合蛋白質衍生物之另一製備方法包括使用白胺酸拉鍊結構。白胺酸拉鍊結構功能部位是促進該結構所存在之蛋白質寡聚物化之胜肽。白胺酸拉鍊結構原始於數種 DNA-結合蛋白質中被識別 (Landschulz *et al.*, 1988, *Science* 240:1759)，並自此於各種不同的蛋白質中被發現。已知的白胺酸拉鍊結構爲天然存在之二聚體化或三聚體化之胜肽及其衍生物。適合用於製造可溶寡聚物蛋白質之白胺酸拉鍊結構功能部位的實例敘述於 PCT 公開號 WO 94/10308，以及衍生自肺表面張力蛋白質 D (SPD) 之白胺酸拉鍊敘述於 Hoppe *et al.*, 1994, *FEBS Letters* 344:191。使用經修飾白胺酸拉鍊結構，使接合至它的異質蛋白質能穩定三聚體化者，敘述於 Fanslow *et al.*, 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-278。在一方法中，含有 GM-CSF 抗原結合蛋白質片段或接合到白胺酸拉鍊結構胜肽之衍生物的重組接合蛋白質，表現於適當宿主細胞中，且從培養的上清液回收可溶性寡聚物 GM-CSF 抗原結合蛋白質片段或形成之衍生物。

所提供之一些抗原結合蛋白質具有對 GM-CSF 之結合親和力 ( $K_a$ ) 經測量至少爲  $10^4$  或  $10^5$  / Mx 秒，例如以下實施例

所述。在其抗原結合蛋白質具有至少  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  或  $10^9/M$  x 秒之  $K_a$ 。所提供之某些抗原結合蛋白質具有低解離速率。例如一些抗體具有  $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  或更低之  $K_{off}$ 。在另一具體例中， $K_{off}$  相同於具有表 2 及 3 可變區域功能部位之以下組合之抗體。

在另一態樣，本發明提供一種在活體外或活體內(例如投與至人類患者時)具有至少一天半衰期之抗原結合蛋白質。在一具體例中，抗原結合蛋白質具有至少三天半衰期。在另一具體例中，抗體或其一部分具有四天或更長的半衰期。在另一具體例中，抗體或其一部分具有八天或更長的半衰期。在另一具體例中，抗體或其抗原結合部分經衍生或修飾，使其相較於未經衍生或未經修飾的抗體具有更長的半衰期。在另一具體例中，抗原結合蛋白質含有點突變來增加血清半衰期，例如敘述於 PCT 公開號 WO 00/09560。

## 6. 糖化作用

抗原結合蛋白質可具有糖化作用樣式，其不同或改變自天然物種所存在者。如技藝所知，糖化作用樣式能隨蛋白質序列(例如存在或缺乏特殊糖化作用胺基酸殘基，討論於下)，或宿主細胞或生物體中所產生之蛋白質而異。特殊表現系統討論於下。

多胜肽的糖化作用典型為 N-連接或 O-連接。N-連接是指碳水化合物部分附著到天冬醯胺酸殘基的側鏈。三胜肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-酰胺酸(其中 X 為脯胺酸除外之任何胺基酸)，是碳水化合物部分的酵素附著

於天冬醯胺酸側鏈用之辨識序列。如此，多胜肽中存在這些三胜肽序列創造可能的糖化作用位置。O-連接之糖化作用是指糖類 N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附著於羥基胺基酸，最常為絲胺酸或酥胺酸，雖然 5-羥基脯胺酸或 5-羥基離胺酸亦可使用。

添加糖化作用位置至抗原結合蛋白質可經由改變胺基酸序列適當地完成，以至其含有一個或一個以上的上述三胜肽序列(給予 N-連接之糖化作用位置)。改變的製造亦可經由添加、取代以一個或一個以上絲胺酸或酥胺酸殘基至開始序列(給予 O-連接之糖化作用位置)。為簡易，抗原結合蛋白質胺基酸序列較佳透過在 DNA 階段改變來變化，尤其經由在預選鹼基突變編碼標的多胜肽之 DNA，以至產生的密碼子將轉譯為所欲胺基酸。

增加抗原結合蛋白質上碳水化合物部分之數目的另一方法是將糖苷經化學或酵素偶合到該蛋白質。這些步驟的優點是它們不需在具有糖化作用能力於 N-及 O-連接糖化之宿主細胞中製造該蛋白質。隨使用之偶合模式，糖類可附著於(a)精胺酸及組胺酸，(b)游離羧基，(c)游離硫氫基(sulfhydryl group)，例如半胱胺酸，(d)游離羥基，例如絲胺酸、酥胺酸或羥基脯胺酸，(e)芳香族殘基，例如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，或(f)麩醯胺酸的醯胺基。這些方法敘述於 PCT 公開號 WO 87/05330，以及 Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp.259-306。

開始抗原結合蛋白質上碳水化合物部分之移除可由化

學或酵素達成。化學去糖化作用需要蛋白質暴露到化合物三氟甲磺酸或同等化合物。此處理導致除了連接糖(N-乙酰基葡萄糖胺或 N-乙酰基半乳糖胺)外之大部分或全部糖類的切割，而留下完整的多胜肽。化學去糖化作用敘述於 Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 and by Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131。多胜肽上碳水化合物部分之酵素切割能使用各種內-及外-糖苷酶達成，例如敘述於 Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350。在可能糖化作用位置之糖化作用可經由使用化合物衣黴素(tunicamycin)來防止，例如敘述於 Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105。衣黴素阻斷蛋白質-N-糖苷連接的形成。

因此態樣包括抗原結合蛋白質之糖化作用變異體，其中相較於親代多胜肽的胺基酸序列，糖化位置數及/或類型已經改變。在某些具體例中，抗體蛋白質變異體含有比天然抗體更多或更少的 N-連接之糖化作用位置數。N-連接之糖化作用位置之特徵為有序列：Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr，其中以 X 標示之胺基酸殘基可為任何胺基酸殘基，但脯胺酸除外。胺基酸殘基之取代以產生此序列，提供添加 N-連接之碳水化合物鏈用的可能新位置。另外，消除或改變此序列的取代作用可防止添加天然多胜肽中存在之 N-連接之碳水化合物鏈。舉例而言，經由刪除 Asn 或以不同胺基酸取代 Asn 能降低糖化作用。在其他具體例中，創造出一個或一個以上新的 N-連接位置。抗體通常在 Fc 區域具有 N-連接糖化作用位置。

## 7. 標記及效應基 (Effector Groups)

在某些具體例中，抗原結合包括一個或一個以上標記。用語“標記基”或“標記”意指任何可偵測的標記。適宜之標記基的實例包括但不限為下列：放射性同位素或放射性核種(例如  $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{15}\text{N}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{90}\text{Y}$ ， $^{99}\text{Tc}$ ， $^{111}\text{In}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ )，螢光基團(例如 FITC，若丹明 (rhodamine)，鐳系磷光體 (lanthanide phosphors))，酵素基團(例如山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase)， $\beta$ -半乳糖苷酶，蟲螢光素酶 (luciferase)，鹼性磷酸酶)，化學發光基團，生物素基團，或由二級報告子(例如白胺酸拉鍊配對序列，二級抗體之結合位置，金屬結合功能部位，抗原決定基標籤)辯認之預定多肽抗原決定基。在若干具體例中，標記基透過各種長度的連接體臂偶合至抗原結合蛋白質以降低可能的立體阻障。用於標記蛋白質之各種方法為技藝已知且可用於進行本發明。

用語“效應基”意指作用為細胞毒殺劑偶合至抗原結合蛋白質之任何基。適宜效應基之實例是放射性同位素或放射性核種(例如  $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{15}\text{N}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{90}\text{Y}$ ， $^{99}\text{Tc}$ ， $^{111}\text{In}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ )。其他適宜基包括毒素、治療基或化學治療基。適宜基之實例包括卡奇霉素 (calicheamicin)、阿瑞司達丁 (auristatins)、膠達納黴素 (geldanamycin) 及美登素 (maytansine)。在某些具體例中，效應基透過不同長度的連接體臂偶合至抗原結合蛋白質以降低可能的立體障礙。

一般而言，標記隨分析中被偵測者而落於各種分類中：  
a) 同位素標記，可為放射性或重同位素；b) 磁性標記(例如磁



性顆粒)；c) 氧化還原活性部分；d)光染料：酵素基團(例如山葵過氧化酶(horseradish peroxidase)， $\beta$ -半乳糖苷酶，蟲螢光素酶(luciferase)，鹼性磷酸酶)；e)生物素化基團；以及f)由二級報告子(例如白胺酸拉鍊配對序列，二級抗體之結合位置，金屬結合功能部位，抗原決定基標籤等等)辯認之預定多胜肽抗原決定基。在某些具體例中，標記基透過各種長度的連接體臂偶合至抗原結合蛋白質以降低可能的立體阻障。

專一標記包括光染料，包括但不限為發光團(chromophores)，磷光體(phosphors)及螢光體(fluorophores)，後者詳述於諸多例中。螢光體(fluorophores)能為“小分子”螢光物或蛋白質性螢光物。

“螢光標記”意指任何分子可透過其固有螢光性質被偵測。適宜之螢光標記包括但不限為螢光素(fluorescein)，若丹明(rhodamine)，四甲基若丹明，曙紅(eosin)、藻紅(erythrosine)，香豆素(coumarin)，甲基-香豆素，芘(pyrene)，螢光物馬拉塞綠(Malachite green)，二苯代乙烯(stilbene)，螢光物：Lucifer Yellow、Cascade BlueJ、Texas Red、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、Oregon green、Alexa-Fluor 染料(Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade Blue、Cascade Yellow 以及 R-藻紅蛋白(phycoerythrin)(PE)(Molecular Probes, Eugene, OR)、FITC、若丹明(rhodamine)以及 Texas

Red(Pierce, Rockford, IL)、Cy5、Cy5.5、Cy7(Amersham Life Science, Pittsburgh, PA)。包括螢光體 (fluorophores) 之適宜光染料敘述於 Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Richard P. Haugland, Molecular Probes, 1992。

適宜的蛋白質螢光標記也包括但不限為綠螢光蛋白質，包括水母冷光 (Renilla)，浮游生物海筆 (Ptilosarcus) 或水母發光蛋白類 GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263: 802-805)，EGFP (Clontech, Mountain View, Genbank 登錄號 U55762)，藍螢光蛋白質 (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., Quebec, Canada; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182)，強化黃螢光蛋白質 (EYFP, Clontech)，蟲螢光素酶 (luciferase) (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417)， $\beta$ -半乳糖苷酶 (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2603-2607) 及水母冷光 (Renilla) (PCT 專利申請案號 WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, 美國專利第 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558 號)。

### C. 編碼 GM-CSF 抗原結合蛋白質之核酸

也提供編碼本文中所述抗原結合蛋白質或其部分之核酸，包括編碼抗體之一個或兩個鏈或其片段、衍生物、突變蛋白質或變異體之核酸，編碼重鏈可變區域或僅 CDRs 之多核苷酸，多核苷酸其足以使用作為鑑定、分析、突變或增幅編碼多胜肽之多核苷酸用雜交探針、PCR 引子或定序用引

子，用於抑制多核苷酸表現之抗-有意義核酸，以及前述之互補序列。該核酸可為任何長度。他們可為，例如長度為 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、3,000、5,000 個或以上核苷酸，包括介於其間的所有值，及/或可含有一個或一個以上額外序列(例如調節序列)及/或較大核酸的一部分(例如載體)。該核酸可為單股或雙股以及可包括 RNA 及/或 DNA 核苷酸及其人造變異體(例如胜肽核酸)。

編碼特定抗原結合蛋白質或其部分(例如全長抗體，重鏈或輕鏈，可變功能部位，或 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 或 CDRL3)之核酸可單離自小鼠的 B-細胞，該小鼠已經由 GM-CSF 或其免疫原性片段免疫。該核酸可經由慣用做法，例如聚合酶鏈鎖反應(PCR)單。噬菌體展現是已知技術之另一實施例，藉此可製備抗體衍生物及其他抗原結合蛋白質。在另一方法中，在任何適合的重組表現系統中表現感興趣抗原結合蛋白質成分之多胜肽，以及使所表現之多胜肽組裝形成抗原結合蛋白質分子。

由於遺傳密碼的退化性，表 1-4 所列或其他本文中描述之每一多胜肽亦可由所提供以外之極大數量的其他核酸序列所編碼。所屬技術領域中具有通常知識者應知本申請案對於編碼每一抗原結合蛋白質之每一退化的核苷酸序列，提供足夠的書面說明及可實施性。

一態樣進一步提供在特定雜交條件下雜交到其他核酸

之核酸。雜交核酸的方法為技藝熟知。例如參閱 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6。如文中定義，中度嚴格 (moderately stringent) 雜交條件是使用含 5X 氯化鈉 / 檸檬酸鈉 (SSC)、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) 之預洗液，約 50% 甲醯胺、6X SSC 之雜交緩衝液，以及 55°C (或其他類似雜交液，例如含有約 50% 甲醯胺、具 42°C 的雜交溫度) 的雜交溫度，以及 60°C 於 0.5X SSC、0.1% SDS 之清洗條件。嚴格雜交條件是於 6X SSC 在 45°C 雜交，隨後在 68°C 於 0.1X SSC、0.2% SDS 清洗一次或一次以上。再者，熟習該項技藝者能操作雜交及 / 或清洗條件以增加或減少雜交的嚴格度，以至於含有核苷酸序列彼此至少 65、70、75、80、85、90、95、98 或 99% 相同的核酸 (包括介於其間的所有值) 通常仍雜交到彼此。

影響雜交條件選擇的基本參數及設計適宜條件的指南提出於，例如 Sambrook, Fritsch, and Maniatis (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4)，且能輕易由所屬領域具有通常知識者依據例如，核酸的長度及 / 或鹼基組成物來決定。

經由突變作用能將變化導入核酸，藉此導致其編碼的多勝肽 (例如抗體或抗體衍生物) 的胺基酸序列改變。使用技藝已知技術能將突變導入。在一具體例中，一個或一個以上特定胺基酸殘基是使用，例如指定位置之突變法來改變。在另

一具體例中，一個或一個以上隨機選擇之殘基是使用，例如隨機突變法來改變。然而其經製作，對於所欲性質之突變多胜肽能被表現及篩選。

突變能導入核酸中而無需顯著改變其編碼之多胜肽的生物活性。例如，能製造核苷酸取代造成胺基酸取代在非必需胺基酸殘基。另外，一個或一個以上突變能導入核酸以選擇性改變其編碼之多胜肽的生物活性。例如，突變能定量或定性改變生物活性。定量改變的實例包括增加、降低或消除活性。定性改變的實例包括改變抗體的抗原專一性。

在另一態樣，本發明提供多核酸分子，其適用於作為偵測核酸序列用之引子或雜交探針。多核酸能僅含有編碼全長多胜肽之一部分的核酸序列，例如，能用於作為探針或引子之片段或編碼多胜肽活性部分(例如，GM-CSF 結合部分)之片段。

根據核酸序列的探針能用於偵測核酸或類似核酸，例如編碼本發明多胜肽之轉錄體。該探針能含有一標記基，例如放射性同位素、螢光化合物、酵素或酵素輔因子。此等探針能用於鑑定表現該多胜肽之細胞。

另一態樣提供之載體，含有編碼如文中所述多胜肽或其一部分(例如包含一個或一個以上 CDRs 或一個或一個以上可變區域功能部位之片段)之核酸。載體之實例包括但不限為質體，病毒載體，非附加型哺乳動物載體及表現載體，例如重組表現載體。重組表現載體能含有核酸以適於宿主細胞中表現核酸之形式。重組表現載體包括一個或一個以上基於

宿主細胞可用於表現而選擇之調節序列，其為可操作地連接 (operably linked) 到欲表現之核酸序列。調節序列包括在許多種類宿主細胞 (例如，SV40 早期基因增強子，勞斯肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus) 啟動子以及巨細胞病毒啟動子) 中主導核苷酸序列之組成型表現 (constitutive expression) 者，只於某些宿主細胞主導核苷酸序列表現者 (例如，組織專一調節序列，參閱 tissue-specific regulatory sequences, *see*, Voss *et al.*, 1986, *Trends Biochem. Sci.* 11:287, Maniatis *et al.*, 1987, *Science* 236:1237，以及對特別處理或條件反應主導核苷酸序列之誘發表現者 (例如，哺乳動物細胞之金屬硫蛋白 (metallothionin) 啟動子以及原核及真核系統中之四環黴素反應性及 / 或鏈黴素反應性啟動子) (參閱同前)。熟習該項技藝者應知表現載體的設計能依此等因子決定作為欲轉形之宿主細胞、所欲蛋白質表現程度的選擇等等。表現載體能導入宿主細胞藉此製造蛋白質或胜肽，包括由文中所述由核酸編碼之接合蛋白質或胜肽。

在另一態樣，提供已導入重組表現載體之宿主細胞。宿主細胞能為任何原核細胞 (例如大腸桿菌 (*E. coli*)) 或真核細胞 (例如，酵母菌，昆蟲，或哺乳動物細胞 (例如，CHO 細胞))。載體 DNA 能經由慣用轉形或轉染技術導入原核或真核細胞。對於哺乳動物細胞的穩定轉染，已知隨所用的表現載體及轉染技術，只有小部分的細胞可整合外來 DNA 到其基因體中。為鑑定及選擇這些整合體，通常與感興趣基因一起導入編碼可篩選記號之基因 (例如，抗生素之抗性) 至宿主細胞。較佳的可篩選記號包括那些對藥物具抗性者，例如

G418，效高黴素(hygromycin)及甲氨蝶呤(methotrexate)。在其他方法中，以導入的核酸穩定轉染之細胞能經由藥物篩選來鑑定(例如，已併入可篩選記號基因之細胞將存活，而其他細胞死亡)。

#### D. 抗原結合蛋白質之製備

完全人類抗體可如上所述經由免疫含有人類免疫球蛋白所在之基因轉殖動物或經由篩選表現全部人類抗體之噬菌體展現資料庫來製備。

單株抗體(mAbs)能經由各種技術產生，包括慣用單株抗體方法論，例如 Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495 之標準體細胞雜交技術。另外，能運用製造單株抗體之其他技術，例如 B-淋巴細胞的病毒或致癌基因轉形。製備融合瘤用之一合適的動物系統是小鼠系統，其為一已建立非常良好之方法。技藝已之單離融合用經免疫之脾臟細胞的免疫作法步驟及技術。對於此步驟程序，來自經免疫小鼠的 B 細胞與適宜的永生不死夥伴(例如小鼠骨髓瘤細胞株)融合。此外，視需要可免疫大鼠或其他哺乳動物代替小鼠，以及來自此等動物的 B 細胞能與小鼠骨髓瘤細胞株融合形成融合瘤。此外，可使用小鼠以外來源的骨髓瘤細胞株。製造融合瘤的融合步驟程序亦已熟知。

所提供之單鏈抗體可透過胺基酸橋(短胜肽連接體)經由連接重鏈及輕鏈可變功能部位(Fv 區域)片段而形成，導致單一多胜肽鏈。此等單鏈 Fvs(scFvs)已於編碼兩可變功能部位多胜肽( $V_L$  及  $V_H$ )之 DNA 間經由接合編碼胜肽連接體之

DNA 來製備。所得多胜肽能自行摺疊回去以形成抗原結合單體，或他們能形成多聚物(例如，二聚體，三聚體，或四聚體)，視兩可變功能部位間之彈性連接體的長度而異(Kortt *et al.*, 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt *et al.*, 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108)。經由組合不同之含 V<sub>L</sub> 及 V<sub>H</sub> 的多胜肽，有一者能形成結合不同抗原決定基之多聚物型 scFvs(Kriangkum *et al.*, 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40)。製造單鏈抗體已研發之技術包括那些敘述於美國專利第 4,946,778 號；Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879; Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-387。衍生自文中所提供抗體之單鏈抗體，包括但不限於 scFvs，其含有表 1 所述重鏈及輕鏈可變區域之可變功能部位組合，或具有移植到表 2 及 3 所述任何 CDRs 之輕鏈及重鏈可變功能部位組合。

使用亞型交換(subclass switching)方法，文中提供之抗體是某一亞型者可經改變為來自不同亞型的抗體。因此例如 IgG 抗體可衍生自 IgM 抗體，反之亦然。此等技術使新抗體的製備具有所給抗體(親代抗體)之抗原結合特性，但也展現與抗體同型物或不同於親代抗體之亞型有關之生物特性。可運用重組 DNA 技術。編碼特殊抗體多胜肽之經選殖 DNA 可用於此等程序中，例如，編碼所欲同型物抗體恆定功能部位之 DNA。例如參閱 Lantto *et al.*, 2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-316。因此，所提供之抗體包括含有例如上述具有所欲同型物(例如 IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE 及 IgD)之可變功能部位組合及其 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段者。再者，若



IgG4 爲所欲，其亦可視需要導入點突變(CPSCP->CPPCP)於樞紐區，如 Bloom *et al.*, 1997, *Protein Science* 6:407 所述，併入本文參考)以減輕能導致 IgG4 抗體異源性之內部-H 鏈二硫鍵形成的傾向。

再者，用於衍生具有不同性質(亦即改變對他們要結合之抗原的親和力)之抗原結合蛋白的技術也已知悉。此等技術之一稱爲鏈改組(chain shuffling)，涉及展現免疫球蛋白可變功能部位基因庫於絲狀細菌噬菌體的表面，通常稱爲噬菌體展現(phage display)。鏈改組已被用於製備對半抗原 2-苯基嘮唑-5-酮(hapten 2-phenyloxazol-5-one)具高親和力之抗體，敘述如 Marks *et al.*, 1992, *BioTechnology* 10:779。

可製造保守修飾於表 1 所述之重鏈及輕鏈可變區域，或表 2 及 3 所述 CDRs(以及對編碼核酸之對應修飾)以製造具有功能基及生化特性之 GM-CSF 抗原結合蛋白質。達到此等修飾之方法敘述於上。

GM-CSF 抗原結合蛋白質可於各方面進一步經修飾。舉例而言，假設他們是用於治療目的，可將他們與聚乙二醇(聚乙二醇化)共軛以延長血清半衰期或增加蛋白質運送。另外，患者抗體或其片段之 V 區域可與不同抗體分子的 Fc 區域接合。用於此目的之 Fc 區域可經修飾以使其不結合補體，因此當使用該接合蛋白質作爲治療劑時降低病人誘發溶胞作用的可能性。此外，可將患者抗體或其功能片段與人類血清白蛋白共軛以增強抗體或其片段的血清半衰期。另一可用於本發明抗體或其片段的接合夥伴是甲狀腺運送蛋白

(TTR)。TTR 具有形成四聚體的能力，因此抗體-TTR 接合蛋白質能形成多價抗體，可增加其結合抗體親抗原性。

另外，文中所述抗原結合蛋白質之功能及/或生化特性的實質修飾，可在重鏈及輕鏈的胺基酸序列中產生取代來達成，他們的功效顯著不同在維持(a)取代區域中分子骨幹的結構，例如摺板(sheet)或螺旋(helical)構形，(b)目標位置之分子的電荷或疏水性，或(c)龐大側鏈。“保守胺基酸代”可包括以非天然殘基取代天然胺基酸殘基，該非天然殘基在該胺基酸殘基位置對極性或電荷具有些微或無作用。參閱表 5。再者，多胜肽中任何天然殘基亦可以丙胺酸取代，如前所述之丙胺酸掃描突變。

患者抗體的胺基酸取代(不論保守或非保守)可由熟悉該項技藝者應用例行技術實施。胺基酸取代能用於鑑定文中所提供抗體的重要殘基，或增加或減少這些抗體對人類 GM-CSF 的親和力或對於文中所述其他抗原結合蛋白質之修飾的結合親和力。

#### 表現抗原結合蛋白質之方法

形成含有至少一如上所述多核苷酸之質體、表現載體、轉錄或表現匣之表現系統及構築體，也提供於本文中，以及含有此等表現系統或構築體之宿主細胞。

抗原結合蛋白質可由數種常見技術之任一種製備。例如使用技藝已知的任何技術，經由重組表現系統可製造 GM-CSF 抗原結合蛋白質。例如參閱 *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al.(eds.)

Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)。

抗原結合蛋白質能被表現於融合瘤細胞株(例如特別是抗體可被表現於融合瘤)或融合瘤以外的細胞株。編碼抗體的表現構築體能用於轉形哺乳動物、昆蟲或微生物宿主細胞。轉形可使用任何用於導入多核苷酸到宿主細胞之已知方法來進行，包括例如包裝多核苷酸於病毒或噬菌體中以及經由技藝已知轉染步驟將構築體轉導(transduce)宿主細胞，如例示於美國專利第 4,399,216 號、第 4,912,040 號、第 4,740,461 號、第 4,959,455 號。所用最佳轉形步驟將視欲轉形之宿主細胞種類而異。導入異質多核苷酸到哺乳動物細胞之方法為技藝熟知，以及包括但不限於葡聚糖仲介轉染、磷酸鈣沉澱、凝聚胺(polybrene)仲介轉染、原生質體融合、電穿孔作用、多核苷酸裝入微脂粒法、核酸與正電荷脂質混合、以及直接顯微注射 DNA 至細胞核。

重組表現構築體典型含有一編碼多胜肽之多核苷酸，該多胜肽含有下列一個或一個以上者：一個或一個以上本文提供之 CDRs，輕鏈恆定區域，輕鏈可變區域，重鏈恆定區域(例如 C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2 及/或 C<sub>H</sub>3)，及/或 GM-CSF 抗原結合蛋白質之另一支架(scaffold)部分。使用標準連接(ligation)技術將這些核酸序列插入適當表現載體中。在一具體例中，重鏈或輕鏈恆定區域附加於抗-GM-CSF-專一重鏈或輕鏈可變區域的 C-末端並連接至表現載體中。載體典型經選擇在特定所用宿

主細胞中具有功能者(亦即該載體相容於宿主細胞系統，能允許存在基因的增幅及/或表現)。在某些具體例中，使用載體，其係使用蛋白質報告子，例如二氫葉酸還原酶(dihydrofolate reductase)運用蛋白質-片段互補分析法(例如參閱美國專利第 6,270,964 號)。適合的表現載體能購買，例如購自 Invitrogen Life Technologies(Carlsbad, CA)或 BD Biosciences(San Jose, CA)。選殖及表現抗體及片段用之其他可用載體，包括那些敘述於 Bianchi and McGrew, 2003, *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439-44。額外可用的表現載體討論於例如 *Methods Enzymol.*, vol.185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press。

通常用於任何宿主細胞之表現載體應含有維持質體及選殖與表現外源性核苷酸序列用之序列。於某些具體例中如此序列集合稱為“側序列(flanking sequences)”者，通常應包括一個或一個以上的下列核苷酸序列：啓動子，一個或一個以上增強子(enhancer)序列，複製的起點(origin)，轉錄終止序列，含有供體及受體接合位置(splice site)之完整的插入序列，編碼多胜肽分泌用前導序列之序列，核糖體結合位置，聚腺苷酸化作用序列，編碼將表現多胜肽之核酸插入用聚連接子區域，以及可篩選記號要素。

可選擇地，載體可含有“標籤”-編碼序列，亦即位於 GM-CSF 抗原結合蛋白質編碼序列 5'或 3'末端之寡核苷酸分子；該寡核苷酸序列編碼聚組胺酸(例如六組胺酸)，或另一“標籤”例如 FLAG<sup>®</sup>、HA(紅血球凝集素流感病毒)或 *myc*，

其存在於市售可得抗體。此標籤通常接合到多胜肽，隨多胜肽表現，且能提供作為親和力純化或從宿主細胞偵測 GM-CSF 抗原結合蛋白質的工具。親和力純化能例如使用反此標籤之抗體為親和力基質經由管柱色層分析來達成。可選擇地，此標籤能隨後從已純化 GM-CSF 抗原結合蛋白質經由各種方法移除，例如使用切割用特定胜肽酶。

側序列可為同源(亦即來自相同物種及/或品系作為宿主細胞)，異種的(亦即來自宿主細胞物種或品系以外之物種)，混種(亦即來自一個以上來源之側序列組合)，合成或天然的。如此，側序列的來源可為任何原核或真核生物體，任何脊椎或無脊椎生物體，或任何植物，但側序列在宿主細胞系統內是有功能的且能由此活化。

可用於載體之側序列可獲自技藝熟知數種方法之任一種。通常文中可用之側序列應已事先經由定圖譜及/或限制核酸內切酶分解確認，且能因此從適當組織來源使用適當限制核酸內切酶來單離。在某些情形中，側序列的整個核苷酸序列可為已知。在此，側序列可使用文中所述之核酸合成或選殖用方法來合成。

不論全部或只有部分的側序列是已知，其可使用聚合酶鏈鎖反應(PCR)及/或以適當探針，例如來自相同或另一物種之寡核苷酸及/或側序列片段經由篩選基因體資料庫來獲得。當側序列是未知時，含有側序列 DNA 之片段可單離自可含有例如編碼序列或甚至另一基因或基因們之 DNA 的較大段片。單離作用之達成可經由限制核酸內切酶分解以產生

適當 DNA 片段，隨後使用瓊脂凝膠純化、Qiagen<sup>®</sup>管柱色層分析 (Qiagen, Chatsworth, CA) 或熟習該技藝者已知的其他方法單離。為達成此目的之適宜酵素的選擇，對該技藝具有通常知識者應是顯而易見的。

複製的起點通常為購買之原核表現載體的一部分，且該起點有助於載體在宿主細胞中增幅。若選擇的載體未包含複製位置的起點，可根據已知序列化學合成並連接到載體內。例如，質體 pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的複製起點是適於大部分的革蘭氏陰性細菌，以及各種病毒起點 (例如 SV40，多瘤病毒 (polyoma virus)，腺病毒，濾泡性口炎病毒 (VSV)，或乳突瘤病毒 (papillomaviruses)。例如 HPV 或 BPV) 可用於哺乳動物細胞選殖載體。通常對於哺乳動物的表現載體不需要複製成分的起點 (例如，SV40 起點通常只用於因其也含有病毒早期啟動子)。

轉錄終止序列典型位於多肽編碼區域的 3' 至末端並用於終止轉錄。通常轉錄終止序列在原核細胞是富含 G-C 片段隨後為聚 T 序列。而此序列可輕易選殖自資料庫甚或購買的部分載體，其也能使用核酸合成方法，例如那些文中所述者輕易合成。

可篩選記號基因編碼宿主細胞生長於選擇用培養基時存活及生長所必需之蛋白質。典型的篩選記號基因編碼之蛋白質為：(a) 具有抗性於抗生素或其他毒素，例如安比西林 (ampicillin)、四環黴素或康那黴素 (kanamycin) 於原核宿主細胞；(b) 細胞之完全營養缺陷；或 (c) 無法獲自複合體或已

界定培養基之補給性關鍵養分。專一可篩選記號是康那黴素抗性基因、安比西林抗性基因及四環黴素抗性基因。有利為新黴素(neomycin)抗性基因亦可用在原核及真核宿主細胞中篩選。

其他可篩選基因可用於增幅將被表現的基因。增幅是一過程，其中生長或細胞存活關鍵蛋白質之製造所需基因被前後反覆於重組細胞續代染色體中。哺乳動物細胞用適當可篩選記號之實例，包括二氫葉酸還原酶(DHFR)及無啓動子胸腺嘧啶激酶基因。哺乳動物細胞轉形體是置於篩選壓力下，其中只有轉形體因載體中存在可篩選基因而唯一能適應存活。篩選壓力的給予是經由在培養基中篩選劑濃度相繼增加的條件下培養已轉形細胞，藉此造成可篩選基因及編碼另一基因的 DNA(例如結合 GM-CSF 多胜肽之抗原結合蛋白質)的增幅。結果，增加數量之多胜肽(例如抗原結合蛋白質)合成自增幅的 DNA。

核糖體結合位置通常為 rnRNA 轉譯開始所需以及有 Shine-Dalgarno 序列之特徵(原核生物)或 Kozak 序列(真核生物)。該要素通常位於啓動子 3'以及欲表現多胜肽之編碼序列 5'。

在某些情形，例如糖化作用是真核宿主細胞表現系統所欲時，可運用各種預-或前序列來促進糖化作用或產量。例如，可改變特殊訊息胜肽的肽酶切割位置，或添加前序列(prosequences)，其也可影響糖化作用。最終蛋白質產物在-1位置(相對於成熟蛋白質的第一胺基酸)可具有一個或一個

以上額外胺基酸使易表現，其可不完全已移除。例如最終蛋白質產物可具有一個或兩個胺基酸殘基於肽酶切割位置，附著於胺基末端。另外，使用一些酵素切割位置可造成所欲多胜肽之輕微截頭形式，若此酵素切在成熟多胜肽此區域。

表現及選殖典型將含有由宿主生物體辨認的啓動子以及可操作地連接(operably linked)到編碼 GM-CSF 抗原結合蛋白質之分子。啓動子是位於結構基因開始密碼子上游(亦即 5')(通常約 100 至 1000 bp 以內)之未轉錄序列，控制結構基因的轉錄。啓動子習慣被分爲兩類：可誘發啓動子及組成型啓動子(constitutive promoter)。可誘發啓動子對一些培養條件改變反應而在他們的控制下開始增加 DNA 轉錄程度，例如一養分之存在或缺乏或溫度變化。在另一方面，組成型啓動子均律地轉錄可操作地連接他們的基因，亦即對基因表現有少許或無控制。已知有極多啓動子被可能宿主細胞辨認。適宜的啓動子可操作地連接至編碼含有 GM-CSF 抗原結合蛋白質之重鏈或輕鏈的 DNA，其係以限制酵素分解從來源 DNA 移除啓動子並插入所欲啓動子序列到載體內。

用於酵母菌宿主之適宜的啓動子亦爲技藝熟知。酵母菌增強子有利用於酵母菌啓動子。用於哺乳動物宿主細胞之適宜的啓動子已熟知，且包括但不限爲那些可獲自病毒基因體者，例如多瘤病毒，禽痘病毒(fowlpox virus)，腺病毒(例如腺病毒 2)，牛乳突瘤病毒，鳥肉瘤病毒(avian sarcoma virus)，巨細胞病毒，反轉錄病毒，B 型肝炎病毒以及最佳爲猴病毒 40(SV40)。其他適宜的哺乳動物啓動子包括異種的



哺乳動物啓動子，例如熱休克啓動子及肌動蛋白啓動子。

可能感興趣之額外啓動子包括但不限爲：SV40 早期啓動子 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310)；CMV 啓動子 (Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663)；含於勞斯肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus) 3' 長終端重覆之啓動子 (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797)；疱疹胸腺嘧啶激酶啓動子 (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445)；來自金屬硫蛋白基因之啓動子及調節序列 (Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42)；以及原核啓動子例如  $\beta$ -內醯胺酶啓動子 (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731)；或啓動子 (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)。也感興趣爲下列動物轉錄控制區域，其展現組織專一性及已用於基因轉殖動物：胰腺細胞中活化之胰肽酶 I 基因控制區域 (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646；Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409；MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515)；在胰  $\beta$  細胞活化之胰島素基因控制區域 (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122)；在淋巴細胞活化之免疫球蛋白基因控制區域 (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658；Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538；Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444)；在睪丸、乳房、淋巴及肥大細胞中活化之小鼠乳房腫瘤病毒控制區域 (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495)；在肝臟中活化之

白蛋白基因控制區域 (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); 在肝臟中活化之  $\alpha$ -胎兒蛋白質基因控制區域 (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); 在肝臟中活化之  $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶基因控制區域 (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); 在脊髓細胞中活化之  $\beta$ -血球蛋白基因控制區域 (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); 在大腦寡樹突細胞中活化之脊髓磷脂基本蛋白質基因控制區域 (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712); 在骨骼肌中活化之肌球蛋白輕鏈-2基因控制區域 (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); 以及在下視丘中活化之性腺刺激素分泌素基因控制區域 (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378)。

增強子序列可插入載體中經由較高真核生物增加編碼含有人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質之輕鏈或重鏈的 DNA 轉錄。增強子為 DNA 之順作用要素，通常約 10-300 bp 長度，作用於啟動子增加轉錄。增強子為相當方位及位置依存性，已發現於轉錄單位 5'及 3'位置。已知數種增強子序列可獲自哺乳動物基因(例如血球蛋白，胰肽酶，白蛋白， $\alpha$ -胎兒蛋白質及胰島素)。然而，通常使用來自病毒的增強子。技藝已知的 SV40 增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、多瘤病毒增強子及腺病毒增強子示範性增強真核啟動子活化的要素。而增強子可位於載體之編碼序列的 5'或 3'，通常位於啟動子的 5'位置。編碼適當天然或異種訊息序列(前導序列

或訊息胜肽)之序列能併入表現載體，促進抗體的細胞外分泌。訊息胜肽或前導的選擇隨欲製造抗體的宿主細胞種類而異，且異種訊息序列能置換天然的訊息序列。在哺乳動物宿主細胞中具功能的訊息胜肽實例包括下列：敘述於美國專利第 4,965,195 號之介白素-7 (IL-7)之訊息序列；敘述於 Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312: 768 之介白素-2 受體訊息序列；敘述於歐洲專利第 0367 566 號之介白素-4 受體訊息胜肽；敘述於美國專利第 4,968,607 號之第 I 型介白素-1 受體訊息胜肽；敘述於歐洲專利第 0 460 846 號之第 II 型介白素-1 受體訊息胜肽。

所提供之表現載體可構築自開始載體，例如市售之載體。此等載體可或不可含有全部所欲側序列。當一個或一個以上文中所述側序列未存在於載體時，他們可能個別地得到並連接到載體。用於得到每一側序列的方法為熟習該項技藝者熟知。

載體經構築以及編碼輕鏈、重鏈、或含有 GM-CSF 抗原結合序列之輕鏈及重鏈之多核苷酸已插入載體適當位置後，完成之載體可插入增幅及/或多胜肽表現用適當的宿主細胞。將抗原結合蛋白質之表現載體轉形到選擇的宿主細胞，可經由熟知方法達成，包括轉染、感染、磷酸鈣共沉澱、電穿孔作用、顯微注射、脂轉染法 (lipofection)、DEAE-葡聚糖介轉染、或其他已知技術。所選方法在某種程度上將為所用宿主細胞類型的功能。這些方法及其他適當方法為熟習該項技藝者熟知並提出於例如 Sambrook *et al.*, 2001, 同上。

當宿主細胞培養於適當條件時，合成能隨後收集自培養基(若宿主細胞將其分泌到培養基中)或直接來自產生他之宿主細胞(若它不被分泌)之抗原結合蛋白質。適宜之宿主細胞的選擇將視各種因子而異，例如所欲之表現程度、所欲或必要活性之多肽修飾(例如糖化作用或磷酸化作用)及使易於摺疊到生物活性分子內。

可獲作為表現用宿主之哺乳動物細胞株為技藝熟知，包括但不限為可獲自美國菌種中心(ATCC)之不死細胞株，包括但不限為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，HeLa 細胞，幼倉鼠腎(BHK)細胞，猴腎細胞(COS)，人類肝細胞癌細胞(例如 Hep G2)，以及諸多其他細胞株。在特定具體例中，細胞株之選擇可透過決定哪一細胞株具有高表現程度及組成性產生具 GM-CSF 結合特性之抗原結合蛋白質。在另一具體例中，能選擇來自 B 細胞系、不製造其自身抗體但具有能力製造及分泌異種抗體之細胞株。

#### **F. 使用人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質於診斷及治療目的**

抗原結合蛋白質可用於偵測生物樣本的 GM-CSF 以及確認產生 GM-CSF 之細胞或組織。專一結合至 GM-CSF 之抗原結合蛋白質可用於治療有其需要之病人與 GM-CSF 有關之疾病。一例為 GM-CSF 抗原結合蛋白質可用於診斷分析，例如結合分析以偵測及 / 或定量表現於組織或細胞中的 GM-CSF。此外，GM-CSF 抗原結合蛋白質能用於抑制 GM-CSF 與其受體形成複合體，藉此調節細胞或組織中 GM-CSF 的生物活性。如此結合至 GM-CSF 之抗原結合蛋白質可調整及 /

或阻斷與其他結合化合物的相互作用，而可具有治療用途於改善與 GM-CSF 有關的疾病。

### 1. 適應症

本發明也有關於 GM-CSF 抑制劑(如揭示者)，例如 GM-CSF 抗體於製造用於預防或治療性處理文中揭示之各種醫學失調之藥劑的用途。GM-CSF 抑制劑可用於治療各種狀況，而其中過多 GM-CSF 對潛在疾病或失調扮演角色，或施予負面症狀。

本發明之具體例包括使用揭示之 GM-CSF 抑制劑，特別是 GM-CSF 抗體、組成物或組合療法來治療或預防各種風濕病疾病之方法。這些包括成人型及幼年型類風濕性關節炎，硬皮症，全身紅斑性狼瘡，痛風，骨關節炎，風濕性多發性肌痛症，血清陰性脊柱關節病(包括僵直性脊椎炎)，以及賴特氏病(Reiter's disease)。主題之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法也用於治療牛皮癬性關節炎及慢性萊姆病關節炎(Lyme Arthritis)。以這些化合物、組成物及組合療法亦可治療或預防史迪爾氏症候群(Still's disease)以及與類風濕性關節炎有關之葡萄膜炎。此外，本發明之化合物、組成物及組合療法可用於治療隨意肌及其他肌肉失調造成的發炎，包括皮肌炎(dermatomyositis)，包涵體肌炎(inclusion body myositis)，多發性肌炎(polyomyositis)以及肺淋巴管肌瘤病(lymphangiomyomatosis)。

本發明提供 GM-CSF 抑制劑(例如 GM-CSF 抗體)、組成物及組合療法(例如 GM-CSF 抑制劑及 TNF 抑制劑如

ENBREL<sup>®</sup>(依那西普(etanercept))或其他活性劑)用於治療骨骼及關節之非關節炎內科狀況。此包括導致骨質流失之蝕骨細胞失調，例如但不限於骨質疏鬆(包括停經後骨質疏鬆)，骨關節炎，牙周病造成牙齒鬆脫或喪失，以及關節置換後義肢鬆脫(通常與磨損殘骸之發炎反應有關)。該後者情形也稱為“骨科植入物骨溶解效應(orthopedic implant osteolysis)”。可以本發明化合物、組成物及組合療法治療之另一狀況是顳顎關節功能障礙(temporal mandibular joint dysfunction; TMJ)。

可以揭示之 GM-CSF 抑制劑組成物及組合療法治療之各種其他醫學失調包括：多發性硬化症，貝塞特氏症候群(Behcet's syndrome)，薛格連氏症候群(sjogren's syndrome)，自體免疫溶血性貧血， $\beta$ 地中海型貧血，肌萎縮性脊髓側索硬化(Lou Gehrig's Disease)，帕金森氏症(Parkinson's Disease)，以及不知原因之腱鞘炎(tenosynovitis)，以及各種自體免疫疾病或與遺傳性缺乏有關之疾病，包括 x-染色體連結之心智遲緩。

也提供使用 GM-CSF 抑制劑、組成物或組合療法治療各種內分泌系統失調之方法。舉例而言，GM-CSF 抑制劑組成物或其他 GM-CSF 抑制劑組成物、含或不含 TNF 抑制劑(例如 ENBREL)或其他上述活性劑適合用於治療幼年型糖尿病(包括自體免疫糖尿病以及胰島素依存型糖尿病)，也治療成年型糖尿病(包括非胰島素依存型及肥胖仲介之糖尿病)。此外，使用本發明化合物、組成物及組合療法治療與糖尿病有

關之繼發性狀況，例如糖尿病視網膜病變，糖尿病病人之腎移植排斥，肥胖仲介之胰島素抗性以及腎衰竭，其本身可能與蛋白質尿素及高血壓有關。其他內分泌失調也可治療這些化合物、組成物及組合療法，包括多囊性卵巢症，X染色體性聯隱性遺傳疾病，甲狀腺機能低下以及甲狀腺炎，包括橋本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)(亦即自體免疫甲狀腺炎)。再者，GM-CSF 抑制劑包括 GM-CSF 抑制劑，單獨或組合其他細胞激素，包括 TNF 抑制劑(例如 ENBREL)，可用於治療或預防與甲狀腺細胞官能障礙有關之醫學狀況，包括正甲狀腺疾病症候群 (euthyroid sick syndrome)。

以 GM-CSF 抑制劑、組成物或組合療法可治療或可預防之胃腸道系統狀況，包括乳糜瀉 (coeliac disease)。舉例而言，GM-CSF 抑制劑組成物、含或不含 TNF 抑制劑(例如 ENBREL)或其他上述活性劑適合於治療或預防乳糜瀉。此外，本發明之化合物、組成物及組合療法適合用於治療或預防克隆氏疾病 (Crohn's disease)，潰瘍性大腸炎，原發性胃輕癱 (idiopathic gastroparesis)，胰臟炎(包括慢性胰臟炎，急性胰臟炎)，發炎性腸道疾病及潰瘍，包括胃及十二指腸潰瘍。

也包括使用本發明 GM-CSF 抑制劑、組成物或組合療法於治療泌尿生殖系統失調之方法。舉例而言，GM-CSF 抑制劑組成物單獨或組合 IL-1(例如 Kineret<sup>®</sup>(anakinra))或 TNF 抑制劑(例如 ENBREL)或其他上述活性劑適合用於治療或預防腎小球性腎炎 (glomerulonephritis)，包括因暴露於毒素之

自體免疫腎小球性腎炎或因溶血性鏈球菌 (haemolytic streptococci) 或其他感染劑感染繼發之腎小球性腎炎。以本發明之化合物、組成物及組合療法亦可治療者為尿毒症候群 (uremic syndrome) 及其臨床併發症 (例如腎衰竭，貧血以及肥厚性心肌病變)，包括與暴露於環境毒素、藥劑或其他原因有關之尿毒症候群。GM-CSF 抑制劑 (特別是 GM-CSF 抗體) 單獨或組合 TNF 抑制劑 (特別是 ENBREL) 可用於治療及預防造成吸收功能改變之膽囊壁發炎所造成之併發症。此等併發症包括膽石症 (cholelithiasis) (膽結石) 及膽管結石症 (choliedocholithiasis) (膽管結石) 以及膽石症與膽管結石症的復發。又可以本發明化合物、組成物及組合療法治療者為血液透析的併發症，攝護腺症狀包括良性攝護腺肥大症、非細菌性攝護腺炎及慢性攝護腺炎，以及血液透析的併發症。

文中也提供者為使用 GM-CSF 抑制劑、組成物或組合療法來治療各種血液及腫瘤性失調之方法。舉例而言，GM-CSF 抑制劑單獨或組合 GM-CSF 抑制劑、TNF 抑制劑 (例如 ENBREL) 或其他上述活性劑可用於治療與各種形式癌症有關的症狀，包括急性骨髓性白血病，慢性骨髓性白血病，Epstein-Barr 病毒-陽性鼻咽癌，神經膠質瘤，結腸、胃、前列腺、腎細胞、子宮頸及卵巢癌、肺癌 (SCLC 及 NSCLC)，包括與癌症有關之惡病質、疲勞、無力、惡病質之腫瘤伴生徵候群及高血鈣症。可以本發明 GM-CSF 抑制劑、組成物或組合療法治療之額外疾病為實體腫瘤 (solid tumor)，包括肉瘤，骨肉瘤，以及癌 (carcinoma) 如腺癌 (例如乳癌) 以及鱗狀



細胞癌。此外，本發明之化合物、組成物或組合療法可用於治療食道癌，胃癌，膽囊癌，白血病，包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓白血病、慢性或急性淋巴胚細胞性白血病及多毛狀細胞白血病(hairy cell leukemia)。其他具侵略轉移可能性之惡性腫瘤(包括多骨髓瘤)能以本發明之化合物、組成物及組合療法來治療，尤其是包括 GM-CSF 抑制劑及可溶性 TNF 受體(例如 ENBREL)之組合療法。此外，所揭示之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法能用於治療貧血及血液失調，包括慢性原發性嗜中性白血球減少症，慢性疾病的貧血，再生不良性貧血(包括 Fanconi 氏再生不良性貧血)，原發性血小板減少性紫斑症(ITP)，血栓性血小板低下性紫斑症，骨髓發育不良症候群(包括頑抗性貧血、具環鐵芽球(ringed sideroblasts)之頑抗性貧血、具過多芽之頑抗性貧血、具過多芽於轉形之頑抗性貧血)，骨髓纖維化/骨髓組織變形，以及鐮刀型細胞血管閉塞危險期(sickle cell vasocclusive crisis)。

各種淋巴組織增生性失調亦可以所揭示之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法治療。GM-CSF 抑制劑單獨或組合 TNF 抑制劑(例如 ENBREL)或其他上述活性劑可用於治療或預防自體免疫淋巴組織增生性症候群(ALPS)，慢性淋巴胚細胞性白血病，多毛狀細胞白血病，慢性淋巴性白血病，週邊 T 細胞淋巴瘤，小淋巴細胞淋巴瘤，被套細胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma)，濾泡淋巴瘤，伯奇氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)，Epstein-Barr 病毒-陽性 T 細胞淋巴瘤，組織細

胞淋巴瘤，何杰金氏病 (Hodgkin's disease)，瀰漫侵略性淋巴瘤，急性淋巴性白血病，T $\gamma$  淋巴組織增生性疾病，皮膚 B 細胞淋巴瘤，皮膚 T 細胞淋巴瘤 (亦即蕈狀肉芽腫 (mycosis fungoides)) 以及西紮利症 (Sezary syndrome)。

此外，使用本發明之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法用於治療遺傳性狀況。特別是 GM-CSF 抑制劑單獨或組合 TNF 抑制劑如 ENBREL，可用於治療疾病如高雪氏症 (Gaucher's disease)，亨丁頓氏症 (Huntington's disease)，線狀 IgA 疾病，以及肌肉萎縮症。

其他可以所揭示 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法治療或預防之狀況，包括產生自頭或脊髓受傷，包括因頭部創傷之硬腦膜下血腫。舉例而言，GM-CSF 抑制劑單獨或組合 TNF 抑制劑如 ENBREL 可用於治療頭部受傷及脊髓骨受傷。與此療法之關聯，所述組成物及組合適用於預防顱內神經損傷以及預防與治療頸椎性頭痛 (cervicogenic headache)。所述組成物及組合進一步適用於治療與腦部照射有關之神經病學副作用。

所揭示之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法進一步用於治療肝臟狀況。例如 GM-CSF 抑制劑單獨或組合 TNF 抑制劑如 ENBREL 或其他活性劑，可用於治療肝炎，包括急性酒精性肝炎，急性藥物誘發或病毒性肝炎 (肝炎 A、B 及 C)，硬化膽管炎 (sclerosing cholangitis)，以及不知原因誘發之肝臟發炎。與肝臟發炎之關聯，GM-CSF 抑制劑進一步用於治療肝竇上皮細胞。

此外，所揭示之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法可用於治療包括喪失聽力且與異常 IL-1 表現有關之各種失調。例如 GM-CSF 抑制劑單獨或組合 TNF 抑制劑可用於治療或預防與耳蝸神經有關之聽力喪失，其被認為自體免疫過程造成，亦即自體免疫性喪失聽力。此狀況目前處以類固醇、胺甲喋呤及 / 或環磷醯胺 (cyclophosphamide)。所揭示之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法也可治療或可預防者為梅尼爾氏症 (Meniere's syndrome) 及膽脂瘤，一種中耳失調常有喪失聽力。

與移植有關之症狀亦可以所揭示之 GM-CSF 抑制劑組成物或組合療法來治療或預防。此等失調包括移植物對抗宿主疾病以及實體器官移植，例如心臟、肝臟、皮膚、腎臟、肺臟 (肺移植氣道閉塞) 或其他移植物，包括骨髓移植物造成之併發症。

眼睛症狀亦可以所揭示之 GM-CSF 抑制劑，尤其是 GM-CSF 抗體、組成物或組合療法治療或預防，包括裂孔性視網膜剝離 (rhegmatogenous retinal detachment) 以及發炎症眼睛疾病 (包括與抽煙及斑點退化有關之發炎症眼睛疾病)。

GM-CSF 抑制劑組成物及組合療法亦可用於治療影響雌性生殖系統之失調。實例包括但不限為多植入物衰竭 / 不孕症，胎兒流失症候群或 IV 胚胎流失 (自然流產)，妊娠子癇前症 (preeclamptic pregnancies) 或子癇症，子宮內膜異位，慢性子宮頸炎，以及早產。

此外，所揭示之 GM-CSF 抑制劑組成物及組合療法可用

於治療或預防坐骨神經痛，老化的症狀，嚴重的藥物反應(例如 11-2 毒性或博來黴素(bleomycin)誘發之肺病及纖維化)；或抑制在心臟或其他手術之同種異體紅血球細胞輸血之前、期間或之後的發炎反應，或治療肢臂或關節的創傷性損傷，例如創傷性膝蓋損傷。

所揭示之 GM-CSF 抑制劑組成物及組合療法可用於治療中樞神經系統(CNS)損傷，包括影響中樞神經系統中發炎刺激期間的神經毒性神經傳遞物質放電，以及抑制或防止在中樞神經系統損傷處發展出膠質疤痕。與中樞神經系統醫學狀況之關聯，GM-CSF 抑制劑可用於治療顳葉癲癇。與癲癇之關聯及治療發作，降低嚴重度與發作復發次數，以及降低發作之有害損傷的嚴重度。GM-CSF 抑制劑單獨或組合文中所述藥劑可用於降低神經元損失，神經元退化，以及與發作有關之神經膠變性(gliosis)。

再者，所揭示之 GM-CSF 抑制劑組成物及組合療法可用於治療重症疾病多發性神經病變及肌病變(critical illness polyneuropathy and myopathy; CIPNM)，急性多發性神經病變，神經性厭食症，貝爾氏麻痺(Bell's palsy)，慢性疲勞症候群，傳染性癡呆(包括庫賈氏病(Creutzfeldt-Jacob disease))，髓鞘脫失神經性病變(demyelinating neuropathy)，基林芭瑞症候群(Guillain-Barre syndrome)，椎間盤疾病，海灣戰爭症候群(Gulf war syndrome)，慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病變，重症肌無力，無症狀性腦缺血(silent cerebral ischemia)，睡眠失調(包括嗜睡症及睡眠窒息症)，

慢性神經元退化，以及中風(包括腦缺血疾病)。

經由單獨投與 GM-CSF 抑制劑或組合文中所述活性劑而可治療或預防之其他疾病及醫學狀況，包括厭食症及/或厭食性狀況，腹膜炎，內毒素血症及敗血性休克，肉芽腫形成，中暑，變應性肉芽腫血管炎(Churg-Strauss syndrome)，急性感染後之慢性發炎，例如肺結核及癩瘋，全身性硬化症以及肥厚性疤痕。GM-CSF 抑制劑組合 IL-1 抑制劑之外，TNF 抑制劑、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$  及/或 IL-4 抑制劑適合用於治療肥厚性疤痕。

本文揭示之 GM-CSF 抑制劑可用於降低與抗體治療、化療、放射線治療有關的毒性，以及其他細胞凋亡(apoptosis)誘發劑，例如 TRAIL 及 TRADE。

本文中提供為治療或預防牛皮癬性損害之方法，包括對人類病人投與治療有效量之 GM-CSF 抑制劑。該治療能有效對抗發生於具有一般牛皮癬或牛皮癬性關節炎病患的牛皮癬性損害。

經由 GM-CSF 抑制劑有效治療的症狀在發炎反應扮演角色。肺失調包括氣喘，慢性阻塞性肺部疾病，肺泡蛋白質沉著症，博來黴素(bleomycin)誘發之肺病及纖維化，放射線誘發之肺纖維化，囊狀纖維化，肺部膠原蛋白積聚，以及 ARDS。GM-CSF 抑制劑可用於治療罹患各種皮膚失調的病患，包括但不限於疱疹皮膚炎(Duhring's disease)，異位性皮膚炎，接觸性皮炎，蕁麻疹(包括慢性原發性蕁麻疹)，以及自體免疫起水泡疾病，包括尋常型天皰瘡(pemphigus

vulgaris)以及大水疱性類天皰瘡(bullous pemphigoid)。可以GM-CSF抑制劑組合治療之其他疾病包括重症肌無力，類肉瘤病(sarcoidosis)，包括肺類肉瘤病，硬皮症，反應性關節炎，高IgE症候群，多發性硬化症及原發性高嗜伊紅白血球症候群。本發明之療法亦可用於治療對藥物治療的過敏性反應以及作為對過敏免疫療法之佐劑。

在一具體例中，GM-CSF抑制劑組成物可用於治療神經系統之退化症狀，例如多發性硬化症，復發-緩解型多發性硬化症，惡化-復發型多發性硬化症，原發性及繼發性進行性多發性硬化症。對準GM-CSF在多發性硬化症的臨床前模式是有效的，以及多發性硬化症中GM-CSF路徑的治療干涉，當免除適應性的免疫反應時透過直接作用在單核球、巨噬細胞及樹突細胞可降低CNS發炎。GM-CSF踢除小鼠對活動性實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)誘發有抗性，McQualter, et al., 2001, J. Exp. Med. 194:873-881。表現GM-CSF經反轉錄病毒轉導之T細胞的授受性轉移可誘發EAE惡化，Marusic et al., 2002, Neurosci. Lett. 332: 185-9。GM-CSF踢除之T細胞的授受性轉移無法誘發EAE，Ponomarev et al., 2007, J. Immunol., 178:39-48。申請人已證明，相較於以同型物對照組單株抗體治療，以抗-老鼠GM-CSF抗體在復發-緩解型多發性硬化症SJL-PLP<sub>139-151</sub>EAE模式的預防性治療顯著延遲開始及降低疾病發生率與降低體重流失及平均臨床計分，參閱第1及2圖。以抗-mGM-CSF單株抗體治療性處理SJL/PLP 125-151 EAE會顯著降低疾病嚴重性及CNS發炎，以及加速復元。

相較於以同型物對照組單株抗體治療，以抗-mGM-CSF單株抗體於 SJL-PLP<sub>139-151</sub> AT-EAE 的預防性及治療性處理會降低平均臨床計分，參閱第 2 圖。GM-CSF 抑制劑組成物能單獨使用或組合其他藥劑，例如干擾素  $\beta$ -1a (AVONEX<sup>®</sup>; Biogen-Idec 及 REBIF<sup>®</sup> EDM Serono, Inc., Pfizer, Inc.)，干擾素  $\beta$ -1b (B SERON<sup>®</sup>; Bayer Health Care.)，醋酸格拉默 (glatiramer acetate) (COPAXONE<sup>®</sup>; Teva Pharmaceuticals) 及 / 或抗-VLA4 mAb (TYSABRI<sup>®</sup>, Biogen-Idec, Elan)。

在本發明一具體例中，揭示於本文中可以用 GM-CSF 抑制劑 (例如 GM-CSF 抗體) 治療之各種醫學失調，是與另一細胞激素或細胞激素抑制劑組合治療。例如 GM-CSF 抑制劑可以組成物投與，該組成物也含有抑制其他發炎性細胞激素與其受體相互作用之化合物。GM-CSF 抑制劑及其他細胞激素抑制劑可以分開的組成物投與，且這些可經由相同或不同路徑投與。用於與 GM-CSF 抑制劑組合之細胞激素抑制劑實例，包括可那些可拮抗例如 TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 或 IL-8 及 TNF，特別是 TNF- $\alpha$ 。GM-CSF 抑制劑與 IL-6 的組合可用於治療及預防發作的復發，包括由 GABA-A 受體拮抗誘發的發作，與 EEG 持續狀態有關的發作以及癲癇狀態期間運動肢發作的發生。再者，GM-CSF 抑制劑與 IFN- $\gamma$ -1b 的組合及 / 或 c-套組抑制劑可用於治療原發性肺纖維化及囊狀纖維化。治療疾病的其他組合包括使用 GM-CSF 抑制劑與妨礙 RANK 與 RANK-配體 (例如 RANK-配體抑制劑) 結合的化合物，或 RANK 的適宜形式 (包括 RANK:Fc)。例如 GM-CSF 抑

制劑與 RANK:Fc 的組合可用於預防各種情況的骨破壞，包括但不限於各種風濕病疾病，骨質疏鬆，多發性骨髓瘤或導致骨退化的其他惡性腫瘤，或防止轉移到骨頭為目的之抗-腫瘤治療，或與義肢磨損殘骸或牙周病有關的骨破壞。

本文中揭示之 GM-CSF 抑制劑、組成物及組合療法可用於治療細菌、病毒或原生動物感染產生之副作用及/或併發症用藥。根據此具體例，當感染引起免疫系統過度刺激以至於 GM-CSF 的產生及/或活性導致對病人負面影響，以 GM-CSF 抑制劑治療感染的病患可用於改善與該感染或用於治療該感染之治療劑有關的這些副作用及/或併發症或。此等感染劑及感染的非限制例為黴漿菌肺炎，AIDS 及與 AIDS 聯合及/或有關於 AIDS 之症狀，例如 AIDS 癡呆複合體，與 AIDS 有關的消耗，由於抗反轉錄病毒治療引起之脂肪失養症，CMV(巨細胞病毒)，卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)，原生動物疾病(包括瘧疾及血吸蟲病)，癩瘋結節性紅斑，細菌或病毒腦膜炎，肺結核(包括肺結核)以及細菌或病毒感染之繼發性肺炎，例如回歸熱疏螺旋體(*Borrelia recurrentis*)引起之體蝨回歸熱(louse-borne relapsing fevers)，疱疹病毒之疱疹基質角膜炎(herpetic stromal keratitis)、角膜損害，以及病毒誘發之角膜失調，人類乳突病毒感染，流行性感胃感染及傳染性單核白血球增多症。

心血管失調及損傷可以所揭示之 GM-CSF 抑制劑、醫藥組成物或組合療法治療及/或預防。特別是心血管失調可以 GM-CSF 抑制劑組成物單獨或組合 TNF 抑制劑(例如 ENBREL)



及/或其他上述試劑來治療。如此可治療之心血管失調包括主動脈瘤(包括腹主動脈瘤，急性冠心症候群，動脈炎)，血流阻斷(包括腦動脈阻斷)，冠狀繞道手術併發症，缺血/再灌注損傷，心臟疾病(包括動脈硬化性心臟病，心肌炎：包括慢性自體免疫心肌炎及病毒心肌炎)，心臟衰竭(包括慢性心臟衰竭，鬱血性心臟衰竭，惡病質之心臟衰竭)，心肌梗塞，心臟手術後或頸動脈球血管成形術後之血管再狹窄及/或動脈硬化，無症狀的心肌缺血，左心室收縮異常，左心室輔助器之移植後併發，雷諾氏現象(Raynaud's phenomena)，血栓靜脈炎，血管炎(包括川崎氏血管炎(Kawasaki's vasculitis))，靜脈阻塞性疾病，巨細胞動脈炎，韋格納肉芽腫(Wegener's granulomatosis)，心肺繞道手術後之心智混亂，以及紫斑症(Schoenlein-Henoch purpura)。GM-CSF抑制劑、TNF抑制劑及血管新生抑制劑(例如抗-VEGF)之組合可用於治療特定心血管疾病，例如主動脈瘤及腫瘤。

此外，使用本發明之GM-CSF抑制劑、組成物及組合療法來治療慢性疼痛症狀，例如慢性骨盆疼痛包括慢性攝護腺炎/骨盆疼痛症候群。如進一步實施例，使用本發明之GM-CSF抑制劑及組成物及組合療法來治療疱疹後神經痛。

除人類病人之外，GM-CSF抑制劑可用於治療非人類動物，例如寵物(狗，貓，鳥，靈長類等等)，馴養之農場動物(馬，牛，綿羊，豬，鳥等等)，或任何動物罹患IL-1仲介之發炎或關節炎症狀。於此情形，適當劑量可根據動物體重決定。舉例而言，可使用一劑0.2-1 mg/kg。另外，根據動物

表面積決定劑量，示範性劑量範圍為 0.1-20 mg/m<sup>2</sup>，或更佳為 5-12 mg/m<sup>2</sup>。對於小動物，例如狗或貓之適宜劑量為 0.4 mg/kg。GM-CSF 抑制劑(較佳構築自衍生自接受者物種的基因)或另一可溶 IL-1 受體模擬物的投與，是經由注射或其他適合的路徑每週一次或一次以上直到該動物的症狀改善，或可無限期投與。

## 2. 診斷方法

所述抗原結合蛋白質可用於偵測、診斷或監測與 GM-CSF 有關之疾病及/或症狀之診斷用途。所揭示者提供用於偵測樣本中 GM-CSF 的存在，其係使用熟悉該項技藝者已知的典型免疫組織染色法(例如 Tijssen, 1993, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen *et al.*, 1985, *J. Cell. Biol.* 101:976-985; Jalkanen *et al.*, 1987, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096)。GM-CSF 的偵測可在活體內或活體外進行。

本文中提供之診斷應用包括使用抗原結合蛋白質來偵測 GM-CSF 的表現以及配體對 GM-CSF 的結合。可用於偵測 GM-CSF 存在的方法實例包括免疫分析法，例如酵素連接免疫吸附分析(ELISA)以及放射性免疫分析(RIA)。

對於診斷應用，抗原結合蛋白質典型將以可偵測標記基團標記。適合的標記基團包括但不限為下列：放射性同位素或放射性核種(例如 <sup>3</sup>H，<sup>14</sup>C，<sup>15</sup>N，<sup>35</sup>S，<sup>90</sup>Y，<sup>99</sup>Tc，<sup>111</sup>In，<sup>125</sup>I，<sup>131</sup>I)，螢光基團(例如 FITC，若丹明(rhodamine)，鏷

系磷光體 (lanthanide phosphors))，酵素基團 (例如山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase)， $\beta$ -半乳糖苷酶，蟲螢光素酶 (luciferase)，鹼性磷酸酶)，化學發光基團，生物素基團或由二級報告子 (例如白胺酸拉鍊配對序列，二級抗體、金屬結合功能部位、抗原決定基標籤之結合位置) 辨認之預定多肽抗原決定基。在若干具體例中，標記基團是透過各種長度連接體臂偶合到抗原結合蛋白質以降低可能的立體阻礙。各種標記蛋白質之方法為技藝已知且可用於進行本發明。

所揭示之一態樣提供用於鑑定表現 GM-CSF 之一個細胞或細胞們。在專一具體例中，以標記基團標記抗原結合蛋白質以及偵測經標記抗原結合蛋白質結合至 GM-CSF。在另一專一具體例中，抗原結合蛋白質結合至 GM-CSF 是在活體內偵測。在另專一具體例中，使用技藝已知技術單離及測量 GM-CSF 抗原結合蛋白質。參閱例如 *Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 and periodic supplements); *John E. Coligan, ed., 1993, Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons。

本發明之另一態樣提供用於偵測與所提供抗原結合蛋白質競爭結合至 GM-CSF 之試驗分子的存在。此等分析之一實例將包括於存在或缺乏試驗分子下偵測一含有 GM-CSF 量之溶液中游離抗原結合蛋白質的含量。游離抗原結合蛋白質的含量增加 (亦即抗原結合蛋白質未結合至 GM-CSF) 代表該試驗分子能與抗原結合蛋白質競爭 GM-CSF 結合。在一具體

例中，以標記基團標記抗原結合蛋白質。另外，試驗分子經標記以及於抗原結合蛋白質存在或缺乏下監測游離試驗分子的量。

### 3.治療方法：醫藥調配物，投與路徑

也提供使用抗原結合蛋白質之方法。在若干方法中，提供抗原結合蛋白質給病人。抗原結合蛋白質抑制 GM-CSFR 結合至人類 GM-CSF。在若干方法中投與抗原結合蛋白質也能經由抑制 GM-CSFR 結合至人類 GM-CSF 而抑制人類 GM-CSF 的自磷酸化。再者，在特定方法中，經由投與有效量之至少一種抗原結合蛋白質到病人來降低單核球趨化性。在若干方法中，經由投與有效量之抗原結合蛋白質可抑制單核球遷移到腫瘤。此外，經由投與文中提供之抗原結合蛋白質可抑制腫瘤中與腫瘤有關之巨噬細胞的積聚。

也提供醫藥組成物，含有治療有效量之一種或複數種本發明之抗原結合蛋白一起與醫藥可接受稀釋劑、載劑 (carrier)、助溶劑、乳化劑、防腐劑及/或佐劑。此外，本發明提供投與此等醫藥組成物以治療病人之方法。用語“病人”包括人類病人。

可接受的調配物材料其所用劑量及濃度對接受者是無毒性。在一專一具體例中，提供含有治療有效量人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質之醫藥組成物。

在特定具體例中，可接受的調配物材料較佳為其所用劑量及濃度對接受者是無毒性。在特定具體例中，醫藥組成物可含有調配物材料用於修飾、維持或保存例如 pH、滲透性、

黏性、清澈度、顏色、等滲壓性、氣味、無菌、安定性、溶解或釋放率、組成物之吸附或穿透性。於此具體例中，適合的調配物材料包括但不限為胺基酸(例如甘胺酸，麩醯胺酸，天冬醯胺酸，精胺酸或離胺酸)；抗微生物劑；抗氧化劑(例如抗壞血酸，亞硫酸鈉或亞硫酸氫鈉)；緩衝液(例如硼酸鹽，碳酸氫鹽，Tris-HCl，檸檬酸鹽，磷酸鹽或其他有機酸)；增體劑(例如甘露醇或甘胺酸)；螯合劑(例如乙二胺四醋酸(EDTA))；複合劑(例如咖啡因，聚乙烯吡咯酮， $\beta$ -環糊精或羥基丙基- $\beta$ -環糊精)；填充物；單醣；雙醣；及其他碳水化合物(例如葡萄糖，甘露糖或糊精)；蛋白質(例如血清白蛋白，明膠或免疫球蛋白)；著色劑，調味劑及稀釋劑；乳化劑；親水性聚合物(例如聚乙烯吡咯酮)；低分子量多肽；形成鹽之反離子(例如鈉)；防腐劑(例如氯化銨，苯甲酸，水楊酸，硫柳汞(thimerosal)，苯乙醇，對羥基苯甲酸甲酯(methylparaben)，對羥基苯甲酸丙酯(propylparaben)，氯己定(chlorhexidine)，山梨酸或過氧化氫)；溶劑(例如甘油，丙二醇或聚乙二醇)；糖醇類(例如甘露醇或山梨糖醇)；懸浮劑；界面活性劑或潤濕劑(wetting agent)(例如普朗尼克類(pluronic)，PEG，山梨醇酐酯，聚山梨醇酯類例如聚山梨醇酯 20，醇酯(triton)，胺基丁三醇，卵磷脂，膽固醇，太羅朋(tyloxapal))；安定性增強劑(例如蔗糖或山梨糖醇)；滲漲度增強劑(tonicity enhancing agent)(例如鹼金屬鹵化物，較佳為氯化鈉或氯化鉀，甘露醇 山梨糖醇)；運輸用運載體(vehicle)；稀釋劑；賦形劑及/或醫藥佐劑。參閱 Remington's

Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1995, Mack Publishing Company。

在特定具體例中，最佳醫藥組成物將由熟習該項技藝者依據例如所欲投與的路徑、運輸的格式以及所欲劑量決定。參閱例如 Remington's Pharmaceutical Sciences，同上。在特定具體例中，此等組成物可影響所揭示之抗原結合蛋白質的物理狀態、安定性、活體內釋放率及活體內清除率。在特定具體例中，醫藥組成物中主要的運載體(vehicle)或載劑本質上可為水溶液或非水溶液。例如適宜的運載體(vehicle)或載劑可為注射用水，生理食鹽水溶液或人造腦脊髓液，可補充非經腸投與用組成物常見之其他物質。中性緩衝之生理食鹽水或混與血清白蛋白之生理食鹽水是進一步之示範性運載體(vehicle)。在專一具體例中，醫藥組成物含有約 pH 7.0-8.5 之 Tris 緩衝液，或約 pH 4.0-5.5 之醋酸鹽緩衝液，以及可進一步包括山梨糖醇或為此之適當取代。在特定具體例中，人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質組成物可經由混合所選具有所欲純度之組成物與選擇之調配劑製備為凍乾塊或水溶液形式用於保存 (Remington's Pharmaceutical Sciences，同上)。又在特定具體例中，人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質可使用適合的賦形劑例如蔗糖調配為凍乾物。

該醫藥組成物能選擇用於非經腸運輸。另外，組成物可選擇用於吸入劑或透過消化道運輸，例如口服。此等醫藥可接受組成物之製備是在技藝之技術中。

調配物成分較佳以投與位置可接受的濃度存。在特定具

體例中，緩衝液用於維持組成物在生理的 pH 或在稍低 pH，典型在 pH 約 5 至約 8 範圍內。

當考慮非經腸投與時，該治療性組成物可以含有所欲人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質於醫藥可接受運載體 (vehicle) 之無熱原、非經腸可接受水溶液之形式提供。特別適用於非經腸注射之運載體 (vehicle) 是無菌蒸餾水，其中人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質調配為無菌、等滲透溶液、經適當保存。在特定具體例中，製備物能包含調配物具有所欲分子與試劑，例如可提供控制或持續釋放產物、能透過積存注射之注射微小球、生物可浸蝕顆粒、聚合性化合物 (例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠或微脂粒。在特定具體例中，亦可使用玻尿酸，在循環期間具有促進持續的效果。在特定具體例中，可植入之藥物運輸裝置可用於導入所欲抗原結合蛋白質。

某些醫藥組成物調配為吸入劑。在某些具體例中，人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質調配為乾燥、可吸入粉末。在專一具體例中，人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質吸入劑溶液亦可與推進物調配用於氣霧劑運輸。在特定具體例中，溶液可經噴霧狀化。肺部投與及其調配方法進一步敘述於 PCT 公開號 WO94/20069，且敘述經化學修飾蛋白質之肺運輸。也考慮能口服投與之調配物。以此方式投與之人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質能與或不與習慣用於化合固體劑型 (例如錠劑及膠囊) 之載劑調配。在特定具體例中，膠囊可設計以釋放調配物的活性部分在胃腸道之點當生物利用率是最大化且前全身性分解是最小化時。額外試劑能包括以促進人類 GM-CSF

抗原結合蛋白質的吸收。亦可使用稀釋劑、調味劑、低熔點蠟、植物油、潤滑劑、懸浮劑、錠劑崩散劑及結合劑。

某些醫藥組成物含有有效量之一種或複數種人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質與適於製造錠劑之無毒賦形劑於混合物中。經由溶解錠劑於無菌水或另一適當的運載體 (vehicle)，可將溶液製備為單位劑型。適合的賦形劑包括但不限為惰性稀釋劑，例如碳酸鈣、碳酸鈉或碳酸氫鹽、乳糖、或磷酸鈣；或結合劑，例如澱粉、明膠或阿拉伯膠；或潤滑劑例如硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石。

額外醫藥組成物對熟習該項技藝者是明顯的，包括調配物含有人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質於持續型-或控制型-運輸調配物。調配各其他持續型-或控制型-運輸工具例如微脂粒載劑、生物可浸蝕微顆粒或多孔珠及積存注射之技術，亦知於熟習該項技藝者。參閱例如 PCT 公開號 WO 93/15722，且敘述運輸醫藥組成物用多孔聚合性微顆粒之控制釋放。持續釋放製備物可包括成形物品形式例如膜或微膠囊之半滲透型聚合物基質。持續釋放基質包括聚酯類，水膠類 (hydrogels)，聚乳酸酯 (例如敘述於美國專利第 3,773,919 號及歐洲專利申請案第 EP 058481 號)，L-麩胺酸及  $\gamma$  乙基-L-麩胺酸之共聚合 (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 2:547-556)，聚(2-羥基乙基-甲丙烯酸) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105)，乙烯-醋酸乙烯 (Langer *et al.*, 1981, 同上) 或聚-D(-)-3-羥基丁酸 (歐洲專利申請案第 EP 133,988 號)。持續釋放組成物亦可包括微脂



粒，能以數種技藝已知方法之任一製備。參閱例如 Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-3692；歐洲專利申請公開號 EP 036,676；EP 088,046 及 EP 143,949。

用於活體內投與之醫藥組成物典型以無菌製備物提供。無菌作用能透過無菌濾膜經由過濾達成。當組成物是凍乾時，使用此方法之無菌作用可在凍乾及復原之前或之後進行。投與用組成物能以凍乾形式或溶液貯存。非經腸組成物通常置於具有無菌出口的容器中，例如靜脈溶液袋或具有以皮下注射針可穿刺塞子之小瓶。

一旦醫藥組成物經調配，可以溶液、懸浮液、凝膠、乳液、固體、結晶或經脫水或凍乾粉末保存於無菌小瓶內。此等調配物可以立即使用之形式或投與前復原之形式(例如凍乾)保存。也提供製造單劑投與單位用之套組。特定套組含有具有乾燥蛋白質之第一容器以及具有水溶液調配物之第二容器。在特定具體例中，提供含有單一及多室預填充注射器(例如液體注射器及凍乾注射器)之套組。

欲使用含人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質之醫藥組成物的治療有效量將隨，例如治療背景及目標而異。熟習該項技藝者應知治療用適當劑量水平，在某種程度上將依據運送的分子、所用人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質之適應症、投與路徑及病患大小(體重，體表面或器官大小)及/或健康狀況(年齡及健康概況)而異。在特定具體例中，臨床醫生可定量劑量及修改投與路徑以得到最佳治療效果。

典型劑量可為從約 0.1  $\mu$ g/kg 至最高約 30 mg/kg 或以

上之範圍，視以上提及之因子而異。在專一具體例中，劑量可為從  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$  至最高約  $30 \text{mg}/\text{kg}$  之範圍，可從  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  至最高約  $30 \text{mg}/\text{kg}$ ，可從  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  至最高約  $10 \text{mg}/\text{kg}$ ，可從約  $0.1 \text{mg}/\text{kg}$  至  $5 \text{mg}/\text{kg}$ ，或可從約  $0.3 \text{mg}/\text{kg}$  至  $3 \text{mg}/\text{kg}$ 。

給藥頻率將視特殊人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質於所用調配物之藥物動力學參數而異。通常臨床醫生投與組成物直到劑量達到所欲效果。因此組成物可以單劑或兩劑或以上(其可以或不可以含有相同量之所欲分子)投與一段時間，或透過植入裝置或導管持續灌注。適當劑量之確定可利用適當劑量-反應數據。在特定具體例中，抗原結合蛋白質能投與病人經一延長期間。抗原結合蛋白質之慢性投與可將常與抗原結合蛋白質(其為非完全人類，例如在非人類動物中產生抗人類抗原之抗體，例如在非人類物種製造之非完全人類抗體或非人類抗體)有關的不利免疫或過敏反應最小化。

醫藥組成物之投與路徑是依據已知方法，例如口服，透過靜脈內、腹膜內、腦內(實質內)、腦室內、肌肉內、眼內、動脈內、門靜脈內或病灶內路徑注射；經由持續釋放系統或經由植入裝置。在特定具體例中，組成物可經由快速注射(bolus injection)或連續式輸注或經由植入裝置投與。

組成物也可透過已吸附於其上或填裝入所欲分子之植入膜、藥棉或另一適當材料來局部投與。在特定具體例中，使用植入裝置，該裝置可植入任何適合的組織或器官，以及所欲分子的運輸可透過擴散、定時釋放藥丸或持續投與。

亦可依所欲使用依據所揭示之人類 GM-CSF 抗原結合

蛋白質醫藥組成物於生體外 (*ex vivo*)。於此情形，從病患移出之細胞、組織或器官暴露於人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質之醫藥組成物，之後該細胞、組織及 / 或器官隨後植回該病患。

特別是人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質能經由植入特定細胞 (其通常已經過遺傳工程處理) 來運送，使用方法例如那些文中所述者，以表現及分泌該多胜肽。在特定具體例中，此等細胞可為動物或人類細胞，以及可為自體移植的、異體移植的、異種移植的。在特定具體例中，細胞可為不死的。在其他具體例中，為減少免疫反應的機會，細胞可裝入膠囊內避免周圍組織的滲透。在進一步具體例中，裝入膠囊的物質典型是生物可相容性，半滲透性聚合封入物或膜，能使蛋白質產物釋放但防止因病患免疫系統或來自組織周遭其他有害因子之細胞破壞。

所確認之全部專利及其他刊物是以說明及揭示之目的明確併入本中參考；舉例而言，此等刊物所述方法學可能用於有關聯之所述者。提供這些刊物僅因他們的揭示早於本申請案申請日。於此方面沒有任何事項應被解讀為承認由於此先前發明或任何其他理由，本案發明人未享有早於此等揭示之權力。關於日期的所有陳述或關於這些文件內容的表述是根據本案申請人可得的資訊，且不構成任何方面承認該等日期或關於這些文件內容的正確性。

提供下列實施例，包括實施之實驗及所得結果僅為用於舉例說明之目的，且不因此解讀為限制所附申請專利範圍之

範圍。

實施例

實施例 1：用於產生、篩選及特性描述抗-GM-CSF 單株抗體之 GM-CSF 及其他分子的說明

使用數種不同重組及天然 GM-CSF 分子產生、篩選及特性描述抗-GM-CSF 融合瘤及單株抗體。

**人類 GM-CSF**

人類 GM-CSF 有兩個天然存在的對偶變異體，其差異在位置 117 之單一胺基酸。從短暫轉染 CHO 或 COS 細胞製造在胺基酸位置 117 為酰胺酸 (rhGM-CSF-Thr, SEQ ID NO:146) 或異白胺酸 (GM-CSF-Ile, SEQ ID NO:145) 之重組人類 GM-CSF 分子並經親和力純化。天然人類 GM-CSF (nhGM-CSF) 經親和力純化自以 PMA (0.01 ug/ml)、離子黴素 (ionomycin) (0.5 ug/ml) 及 EGF (0.02 ug/ml) 刺激後之 A431 細胞上清液，自以 PMA (10 ng/mL) 及離子黴素 (500 ng/mL) 在 37°C 刺激 48 小時後之人類週邊血液單核細胞 (PBMCs) 上清液，或以 TNF $\alpha$  (25 ng/ml) 及 IL-1 (10 ng/ml) 刺激後之人類小氣道上皮細胞 (SAEC) 上清液。大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 是購買自 R&D 系統 (Minneapolis, MN)。在胺基酸位置 23 具有白胺酸取代精胺酸之酵母菌衍生之 rhGM-CSF (Leukine<sup>®</sup>) 是購買自 Berlex, Inc. (Montville, NJ)。大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF-R23L 是在胺基酸位置 23 具有白胺酸取代精胺酸之大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF。酵母菌衍生之 rhGM-CSF nhGM-CSF (Leukine<sup>®</sup>)、

大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 及大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF-R23L 在 TF-1 STAT5 磷酸化分析中已證明相等 GM-CSF 活性。

#### 長尾獼猴 (*Cynomolgus macaque*) GM-CSF

從轉染大腸桿菌 (*E. coli*) 製造重組長尾獼猴 GM-CSF (rcynoGM-CSF, SEQ ID NO:53)。天然長尾獼猴 GM-CSF (ncynoGM-CSF) 經親和力純化自以 TNF $\alpha$  (25 ng/ml) 及 IL-1 (10 ng/ml) 刺激後之切碎肺組織上清液，或自以 PMA (10 ng/mL) 及離子黴素 (500 ng/mL) 在 37°C 刺激 48 小時後之長尾獼猴 PBMC 上清液。

#### 犬 GM-CSF

從轉形之大腸桿菌 (*E. coli*) 製造犬 GM-CSF (SEQ ID NO:54) 並使用標準管柱色層分析從包涵體純化。

#### 兔子 GM-CSF

從 2936E 細胞製造含有 His 標籤之重組兔子 GM-CSF (SEQ ID NO:82)，並以 Talon 鈷 IMAC 純化經以 5mM 咪唑、20mM NaPO<sub>4</sub>、300mM NaCl、pH 7.2 清洗並以咪唑梯度 (10mM 至 300mM) 溶析。

#### 小鼠 GM-CSF

從轉形之酵母菌細胞製造重組小鼠 GM-CSF (SEQ ID NO:58)，並以三管柱色層分析步驟純化：SP-Sepharose (捕捉)，C18 (逆相純化) 以及 SP-Sepharose (調換緩衝液)。

#### 大鼠 GM-CSF

重組大鼠 GM-CSF 是購買自 R&D 系統。

## 親和力純化

從經刺激細胞之上清液親和力純化 GM-CSF 的進行是經由上清液循環經抗-GM-CSF mAb(M8)親和力樹脂，以 pH 6.0 檸檬酸鈉清洗，並以 pH 4.5 檸檬酸鈉溶析。匯集有關分層並調換緩衝液為 PBS。以 OD<sub>280</sub> 測定重組 GM-CSF 濃度，而以 ELISA 測定天然 GM-CSF 濃度。

## 用於特性描述抗-GM-CSF mAb 之非-GM-CSF 試劑

重組人類 CSF-1 是購買自 R&D 系統。從轉染 CHO 細胞製造重組 hIL-15 並使用兩管柱步驟之純化方法純化。陰離子交換純化是以載入 10mg/ml 樹脂 pH 7.5 之 Fractogel TMAE 650M 來進行，然後以 20mM Hepes pH 7.5、然後 20mM MES pH 6.5、然後 100mM NaCl、20mM MES 清洗。以 200mM NaCl、20mM MES pH 6.5 溶析重組 hIL-15。保持蛋白質於 10mM NaHPO<sub>4</sub> pH 2.0 達 1 小時(病毒去活化步驟)，然後以載入 20 mg/ml 樹脂於 10mM NaHPO<sub>4</sub> pH 2.0 之 Fractogel EMD SO3-650(M)進行陽離子交換純化步驟，以 10mM 檸檬酸鈉、10mM 醋酸鈉、10mM MES、pH 4.0 清洗，並以 10mM 檸檬酸鈉、10mM 醋酸鈉、10mM MES、pH 6.0 之梯度溶析液溶析，並調換緩衝液為 PBS。

## 實施例 2：中和性人類抗-GM-CSF 抗體之製造及篩選

### 2.1 結合 GM-CSF 之融合瘤的免疫及篩選

針對對抗人類 GM-CSF 之完全人類單株抗體的研發，是使用 Xenomouse®技術獲得。兩分開世代之 10 KL Xenomice 每 3-4 天以大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 或另注射哺

乳動物細胞衍生之 rhGM-CSF-Ile 及 rhGM-CSF-Thr 免疫達 7 週(共 16 次注射)。第 7 及第 11 次追加後經由酵素連接免疫吸附分析(ELISA)監測血清力價，並在第 16 次追加後 4 天將具最佳力價的小鼠脾臟細胞融合到夥伴細胞株以產生融合瘤。所得多株融合瘤上清液經由 ELISA 篩選結合至 GM-CSF 者，以及經由  $\alpha$  篩選人類重鏈及  $\kappa$  及/或  $\lambda$  輕鏈的存在。此免疫戰役產生 499 株表現人類重鏈及輕鏈之具 GM-CSF-結合活性者。

## 2.2 使用 hGM-CSF-依存性細胞系生物分析法確認具 GM-CSF 中和活性之融合瘤

使用兩種細胞系生物分析法：在 TF-1 細胞之 GM-CSF 誘發 STAT5 磷酸化(2.2.1)以及 AML-5 細胞之 GM-CSF-誘發增殖(2.2.2)來特性描述 499 融合瘤上清液之 GM-CSF 中和活性。從這些結果篩選 14 個融合瘤用於選殖。

### 2.2.1 在 TF-1 細胞抑制 GM-CSF-誘發 STAT-5 磷酸化

在 37°C、10% CO<sub>2</sub> 於補充 5% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-麩醯胺酸、50 U/mL 青黴素、50  $\mu$ g/mL 鏈黴素、55  $\mu$ M  $\beta$ -巰基乙醇及 10 ng/mL 大腸桿菌(*E. coli*)衍生之 rhGM-CSF 的 IMDM 中增殖 TF-1 細胞。分析前 1 天，以 350xg 離心 6 分鐘收取 TF-1 細胞，並於 PBS 清洗 3 次。以 1x10<sup>6</sup>/mL 再懸浮細胞並在 37°C、10% CO<sub>2</sub> 於 IMDM + 0.5% FBS 不含 GM-CSF 中培養隔夜。在 2 mL 96-井圓底平板以 100  $\mu$ L 總體積進行分析。以 1:4 最終稀釋將融合瘤上清液置入平板製備一式兩份並以 rhGM-CSF-Ile(0.4 ng/mL 終濃度)在 37°C 培育 30 分

鐘。收取血清 - 及 GM-CSF-缺乏之 TF-1 細胞，於 PBS 清洗並以  $6 \times 10^6$  細胞/mL 再懸浮於含 0.5% FBS 之 IMDM。添加 50  $\mu$ L 細胞懸浮液 ( $3 \times 10^5$  細胞/井) 並將平板置 37°C 培育 15 分鐘。為固定細胞，添加 25  $\mu$ L 之 10% 三聚甲醛 (paraformaldehyde) 於 PBS 為終濃度 2% 三聚甲醛，並將平板置 37°C 培育 15 分鐘。添加 200  $\mu$ L IMDM + 0.5% FBS 至井以終止固定作用，然後以 350xg 離心平板 7 分鐘。移除細胞上清液，並一邊用力混合細胞下緩慢添加 400  $\mu$ L 的 90% MeOH。-20°C 培育隔夜後旋轉該平板，以 400  $\mu$ L PBS/2% FCS 清洗並以 50  $\mu$ L 1:5 稀釋 (含 2% FBS 於 PBS) 之抗 -PhosphoSTAT5-Alexa488 (Becton Dickinson 612598, Franklin Lakes, NJ) 在室溫培育 30 分鐘。以含 2% FBS 於 PBS 清洗、再懸浮細胞並轉移到圓底微力價平板，使用 MultiWell FACScalibur (Becton Dickinson) 進行流式細胞技術分析。使用 FlowJo FACS 分析軟體測定 STAT5<sup>+</sup> 細胞的百分比。使用下列方程式計算融合瘤上清液之 STAT5 磷酸化的抑制百分比：

$$100 - \left( \frac{A \text{ 之 STAT5+ \%} - B \text{ 之 STAT5+ \%}}{C \text{ 之 STAT5+ \%} - B \text{ 之 STAT5+ \%}} \right) * 100$$

其中 A = 細胞 + 融合瘤上清液 + rhGM-CSF，B = 只有細胞，C = 細胞 + rhGM-CSF

對於每一分析測定以大於閾值抑制 GM-CSF-依存性 STAT5 磷酸化之融合瘤上清液，使用 IL-3-誘發之 STAT5 磷酸化進一步特性描述其專一性，並使用 TF-1 Phosflow 生物分析法及 AML-5 細胞株 GM-CSF-誘發增殖之生物分析法特性描述對抗 nhGM-CSF 及 rcynoGM-CSF 的效力 (2.2.2)。顯示



GM-CSF-依存性磷-STAT5 反應及抗-hGM-CSF 抗體 (MAB215, R&D 系統) 抑制由 0.4 ng/mL rhGM-CSF-Ile 誘發 STAT5 磷酸化能力之代表性實驗示於第 3 圖。第 4 圖顯示以大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 所免疫世代的融合瘤上清液，對 rhGM-CSF-Ile-誘發 STAT5 磷酸化之抑制百分比的長方條統計圖。

### 2.2.2 經由融合瘤上清液之 AML-5 細胞 GM-CSF-依存性增殖的抑制作用

在 37°C、10% CO<sub>2</sub> 於補充 5% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-麩醯胺酸、50 U/mL 青黴素、50 μg/mL 鏈黴素、55 μM β-巯基乙醇及 10 ng/mL 大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 的 IMDM 中增殖 AML-5 細胞。實驗當天，以 350xg 離心 AML-5 細胞 5 分鐘並於 PBS 清洗 4 次移除殘留 GM-CSF。為測試 AML-5 細胞之 GM-CSF-或 CSF-1-誘發增殖的抑制作用，將多株融合瘤上清液以 1:10 及 / 或 1:30 及 / 或 1:90 最終稀釋置於 96-井平底微力價平板製備 2 份，並添加事先已測定 EC90 值之細胞激素：0.05 ng/mL 之 A431 細胞衍生之 nhGM-CSF 及 rcynoGM-CSF；0.15 ng/mL 之 rhGM-CSF-Ile 及 rhGM-CSF-Thr；以及 10 ng/mL 之 rhCSF-1。以對 100 μL 總體積為 5x10<sup>4</sup> 細胞/mL (2.5 x 10<sup>3</sup> 細胞/井) 添加 50 μL AML-5 細胞之前，在 37°C 培育抗體/細胞激素混合物 30 分鐘。在 37°C、10% CO<sub>2</sub> 培育平板 72 小時。為偵測 AML-5 細胞增殖，平板脈衝以 1 微居里 (μc) 的氘化胸腺核苷 (tritiated thymidine)，6 小時後收取並以液態閃爍計數器讀取。使用

下列方程式計算融合瘤上清液之 AML-5 增殖的抑制百分比：

$$100 - (\{ A \text{ 之 CPM} / B \text{ 之 CPM} \} * 100)$$

其中 A = 細胞 + 融合瘤上清液 + 細胞激素，以及 B = 細胞 + 細胞激素

篩選以 1:30 稀釋有效抑制人類及長尾獼猴 GM-CSF-誘發、但非人類 CSF-1-誘發 AML-5 細胞增殖之融合瘤上清液，用於選殖來製造單株抗-GM-CSF 融合瘤。第 5 圖顯示展現 GM-CSF-依存性增殖反應及抗-hGM-CSF 抗體 (MAB215, R&D 系統) 抑制由 0.15 ng/mL rhGM-CSF-Ile 誘發 AML-5 細胞增殖之能力的代表性實驗。

### 2.3 單株融合瘤細胞株之製造

根據該生物分析篩選結果，篩選 14 個多株融合瘤株用於經由限制稀釋選殖單株性。計數多株融合瘤平板之細胞，以 48 細胞/mL 再懸浮並稀釋至 24 細胞/mL、4.8 細胞/mL 及 2.4 細胞/mL 於 20 mL 培養基。以 200 $\mu$ l/井將細胞置於平板，對每一選殖之細胞株製造 4 種不同密度的平板 (10 細胞/井、5 細胞/井、1 細胞/井以及 0.5 細胞/井)。選殖後兩週內，在顯微鏡下目視檢查平板並從來自 1 細胞/井及 0.5 細胞/井的選殖用平板 (其中只偵測到單一群落) 之各井收取上清液。經由 ELISA 篩選上清液的抗原專一性，並經由 ELISA 分析抗原陽性之上清液的重鏈及輕鏈物種及同型物組成物。只保持並冷凍來自己證明井中僅單一群落生長之每一細胞株的 1 至 3 個子代選殖株，抗原專一免疫反應性以及人類  $\lambda$  或  $\kappa$  及 IgG 組合。經由每一子代選殖株之序列分析確認單株性。

## 2.4 純化自單株融合瘤上清液之抗-GM-CSF 抗體的 GM-CSF 中和活性特性描述

### 2.4.1 從融合瘤上清液純化 IgG

使用蛋白質 A 管柱色層分析從單株融合瘤上清液親和力純化 IgG，以及使用 NanoDrop ND-1000 UV-Vis 分光光度計在 A280(Nanodrop Technologies, Wilmington, DE)定量。

### 2.4.2 以單株抗體抑制 AML-5 細胞之 GM-CSF-依存性增殖

如實施例 2.2.2 所述增殖及製備 AML-5 細胞用於分析。為評估純化自融合瘤上清液之單株抗體抑制 GM-CSF-或 CSF-1-誘發 AML-5 細胞增殖的能力，在 96-井平底平板滴定各抗體製備 2 份(開始以 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  做 8 倍連續稀釋)。添加事先已測定 EC90 值之細胞激素：0.1  $\text{ng}/\text{mL}$  之 nhGM-CSF(A431 或衍生自人類 PBMC)；0.3  $\text{ng}/\text{mL}$  之 rhGM-CSF-Ile；0.8  $\text{ng}/\text{mL}$  之 rhGM-CSF-Thr；0.05  $\text{ng}/\text{mL}$  之 rCynoGM-CSF；以及 3  $\text{ng}/\text{mL}$  之 rhCSF-1。在每一實驗中，也以 2 倍連續稀釋滴定 GM-CSF 及 CSF-1 以計算在該實驗中的 EC90 值。在添加 100  $\mu\text{L}$  總體積之  $2.5 \times 10^4$  細胞/ $\text{mL}$  的 AML-5 細胞之前，在 37°C 培育細胞激素及抗體 30 分鐘。在 37°C、10%  $\text{CO}_2$  培育平板。3 天之後，平板脈衝以 1 微居里( $\mu\text{c}$ )的氡化胸腺核，6 小時後收取並以液態閃爍計數器讀取。使用下列方程式計算純化自融合瘤上清液之 mAb 抑制 AML-5 增殖的百分比：

$$([A \text{ 之 CPM} - B \text{ 之 CPM}] / [A \text{ 之 CPM} - C \text{ 之 CPM}]) * 100$$

其中 A=細胞+細胞激素，B=細胞+mAb+細胞激素，以及 C=只有細胞

使用 Microsoft Excel(Redmond, WA)產生非線性回歸分析以及增殖之 50%抑制 (IC<sub>50</sub>)值計算。實驗中用於刺激細胞之細胞激素量在其 EC<sub>90</sub> 值的兩倍內者，用於計算單株融合瘤抗體的平均 IC<sub>50</sub> 值(表 5)。使用一個或一個以上同一 mAb 選殖株(已經由序列確認)之實驗包括於平均中。

表 5：純化自融合瘤上清液之 mAb 於 AML-5 增殖及 TF-1 Stat5 磷酸化分析中之 IC<sub>50</sub>(nM)值的表

分析	細胞激素	IgG A	IgG B	IgG C	IgG D	IgG E	IgG F
AML-5 增殖分析	rhGM-CSF-Ile	0.302	0.627	0.347	0.176	0.376	0.193
	rhGM-CSF-Thr	0.286	0.470	0.501	0.315	0.296	0.179
	nhGM-CSF (A431)	0.414	0.299	0.442	0.299	0.323	0.179
	nhGM-CSF(PBMC)	0.235	0.947	0.659	1.373	0.575	0.214
	reynoGM-CSF	0.710	0.574	0.496	0.169	0.669	0.897
TF-1 Stat5 磷酸化分析	rhGM-CSF-Ile	0.046	0.060	0.049	0.114	0.042	0.055
	rhGM-CSF-Thr	0.016	0.023	0.027	0.061	0.035	0.027
	nhGM-CSF (A431)	0.143	0.075	0.074	0.116	0.067	0.081
	reynoGM-CSF	0.057	0.075	0.066	0.066	0.274	0.063

如第 6 圖及表 5 所示，來自融合瘤上清液之數個單株抗體以劑量依存性方式抑制 GM-CSF-誘發，而非 CSF-1-誘發之 AML-5 細胞增殖。經由相稱於增殖之最大抑制作用的一半，在此分析中單株抗體對抗測試之 GM-CSF 形式具有 IC<sub>50</sub> 值 < 1 nM。

#### 2.4.3 TF-1 細胞中經由純化自融合瘤上清液之抗-GM-CSF 單株抗體的 GM-CSF-依存性 STAT-5 磷酸化抑制作用

如實施例 2.2.1 所述增殖及製備 TF-1 細胞用於分析。為評估 TF-1 細胞的 GM-CSF-或 rhIL-3-誘發 STAT5 磷酸化之

抑制作用，純化自融合瘤上清液之單株抗體，各在 96-井圓底深井平板中滴定製備 2 份(開始以 2 $\mu$ g/mL 做 5 倍連續稀釋)。添加事先已測定 EC90 值之細胞激素：0.3 ng/mL 之 nhGM-CSF(A431) 及 rcynoGM-CSF；0.9 ng/mL 之 rhGM-CSF-Ile 及 rhGM-CSF-Thr；以及 30 ng/mL 之 rhIL-3。在每一分析中，也以 2 倍連續稀釋滴定 GM-CSF 及 IL-3 以計算每一分析中的 EC90 值。在添加 100 $\mu$ L 總體積之 3x10<sup>5</sup> 細胞/mL 血清及 GM-CSF 缺乏之 TF-1 細胞之前，在 37°C 培育細胞激素及抗體 30 分鐘。在 37°C 刺激細胞 15 分鐘然後固定，如實施例 2.2.1 所述可滲透及分析 STAT5 磷酸化。使用下列方程式計算純化自融合瘤上清液之 mAb 抑制 Stat5 磷酸化的百分比：

$$([A \text{ 之 Stat5+ \%} - B \text{ 之 Stat5+ \%}] / [A \text{ 之 Stat5+ \%} - C \text{ 之 Stat5+ \%}]) * 100$$

此處 A = 細胞+細胞激素，B=細胞+mAb+細胞激素，以及 C=只有細胞

使用 GraphPad Prism 4.01 計算非線性回歸分析以及增殖之最大抑制作用的一半 (IC<sub>50<sub>hm</sub></sub>) 值。用於刺激細胞之細胞激素量在其 EC90 值兩倍內之實驗被用於計算單株抗體的平均 IC<sub>50</sub> 值(表 5)。

如第 7 圖及表 5 所示，在 TF-1 細胞中數種單株抗體以劑量依存性方式抑制 GM-CSF-誘發、但非 rhIL-3-誘發之 STAT5 磷酸化。在此分析中單株抗體具有 <0.3 nM 之 IC<sub>50<sub>hm</sub></sub> 值對抗測試之 GM-CSF 形式。

**實施例 3：來自轉染細胞株之重組單株抗體 (mAb) 的選殖及表現**

用於抗體選殖株之重鏈及輕鏈可變區域被次選殖到人類 IgG2 骨架 (framework) 並短暫或穩定轉染及表現於 COS(短暫轉染)或 CHO(穩定轉染)細胞。經由短暫轉染表現於 COS 細胞之抗體是純化自上清液，使用結合於 TBS、pH 7.4 之 2.2x10cm MabSelectSurer 蛋白質 A，以 50mM 檸檬酸、pH 3.4+/-0.2 溶析。使用庫存 pH 8.0 之 1M Tris 鹼調整溶析液至 pH 6.0 並使用透析調換緩衝液為 10mM 乙酸、9%蔗糖、pH 5.2。得到一選殖株繼續透析為具有 10mM KP、161mM L-Arg、pH 7.6 之緩衝液，然後濃縮為 20mg/mL。

表現自穩定 CHO 細胞株之抗體是純化自上清液，使用結合於 TBS、pH 7.4 之 1.1x10cm MabSelectSurer 蛋白質 A，以 100mM 乙酸、pH 3.6 溶析。使用 GE 去鹽管柱將溶析液經調換緩衝液 5mg 為 10mM 乙酸、9%蔗糖、pH 5.2。然後使用 GE 去鹽管柱將 20-30mg 的材料調換緩衝液為 Cellgro PBS、pH 7.2。來自第二細胞轉染之材料經第二次純化並維持於 10mM M 乙酸、9%蔗糖、pH 5.2 緩衝液。

#### 實施例 4：經由表面電漿共振之重組 mAb 對 rhGM-CSF-Ile 的動力學結合分析

使用表面電漿共振在 25°C、使用裝配 CM4 感應晶片之 Biacore 3000 儀 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 進行抗-GM-CSF 重組單株抗體之動力學結合分析。使用標準含 HBS-EP 之胺偶合化學作為進行緩衝液將山羊抗-人類 IgG 捕捉抗體共價固定於晶片。簡言之，以 0.1 M NHS 及 0.4 M EDC 之 1:1(v/v) 混合物以流速 5  $\mu$ L/分鐘活化每一流式細胞 7 分

鐘。山羊抗-人類 IgG 以 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  於 10 mM 乙酸鈉、pH 5.5 以密度  $\sim 3200$  RU 固定在兩流式細胞。於 7-分鐘以 5  $\mu\text{L}/\text{分鐘}$  注射 1 M 乙醇胺將殘留反應表面去活性。以 100  $\mu\text{L}/\text{分鐘}$  將 50  $\mu\text{L}$  之 10 mM 甘胺酸 HCl、pH 1.5 注射 3 次於每一流式細胞以移除任何殘留之非共價結合的捕捉抗體並適應每一表面。將進行緩衝液轉換為含 0.1 mg/mL BSA 及 2 mg/mL CM-葡聚糖之 HBS-EP 用於所有剩餘步驟。

以 10  $\mu\text{L}/\text{分鐘}$  注射 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之重組抗-GM-CSF mAb 於山羊抗-人類 IgG 表面 1.5 分鐘以得到表面密度  $\sim 111$  RU。剩餘之山羊抗-人類 IgG 表面留下未經修飾作為參考。開始進行 5 個循環之緩衝液空白以適應晶片表面。製備濃度 300、100、33.3、11.1、3.70 及 1.23 nM 一式三份之重組 hGM-CSF-Ile 樣本，並與 6 緩衝液空白以 100  $\mu\text{L}/\text{分鐘}$  隨機順序注射於捕捉重組抗-GM-CSF IgG 及參考表面。使每一複合體結合 2.5 分鐘，並分離 2.5 分鐘。此外，100 nM rhGM-CSF-Ile 及緩衝液空白之一式三份樣本另以 100  $\mu\text{L}/\text{分鐘}$  注射於兩表面，並使結合 2.5 分鐘及分離 90 分鐘以收集更多分離相數據。表面再生於每一 rhGM-CSF-Ile 或緩衝液以 100  $\mu\text{L}/\text{分鐘}$  注射 10 mM 甘胺酸 HCl、pH 1.5 達 30-秒及隨後注射緩衝液 30-秒之後。

數據是經由減去參考表面反應以移除大部分的折射指數變化之雙重參考，然後減去平均之緩衝液空白反應以移除來自流式細胞之系統性人造物。由於缺乏動力學資訊從分析刪除收集自 300 nM 曲線之數據，因該數據缺乏曲率及濃度

爲  $\sim 6000 \times K_D$ 。數據經以 Scrubber(2.0a 版, BioLogic Software, Campbell, Australia)處理及全面性適於 1:1 相互作用模式以得到動力學速率常數  $k_d$  及  $k_a$ , 以及平衡結合常數  $K_D$ 。結果示於表 6。

表 6: 經由表面電漿共振之重組 mAb 對 rhGM-CSF-Ile 的動力學結合分析

mAb	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	$K_D(pM)$
IgG A	$3.34 \times 10^5$	$3.03 \times 10^{-5}$	90
IgG B	$6.54 \times 10^5$	$3.19 \times 10^{-5}$	49
IgB C	$8.67 \times 10^5$	$7.05 \times 10^{-5}$	81
IgG E	$9.12 \times 10^5$	$1.16 \times 10^{-5}$	128

#### 實施例 5: 抗-GM-CSF 抗體對其他物種之 GM-CSF 以 ELISA 測量的交叉反應性

評估融合瘤 mAb 選殖株及來自以上之重組 mAb 結合 rhGM-CSF-Ile、rhGM-CSF-Thr、酵母菌衍生之 rhGM-CSF (Leukine®)、*E. coli* 衍生之 rhGM-CSF、nhGM-CSF 及/或來自一個或一個以上下列物種: 小鼠、大鼠、兔子、犬及長尾獼猴之重組 GM-CSF 的能力(第 8A 及 8B 圖)。以 50  $\mu$ L 的 1  $\mu$ g/mL GM-CSF 溶液或對照組蛋白質塗覆 96-井平板的個別井並在 4°C 培育隔夜。以 PBS/Tween 清白平板 4 次, 然後以 2  $\mu$ g/ml 添加以上抗-GM-CSF mAb(或對照組抗體)與各 GM-CSF 蛋白質至井, 在室溫培育 1 小時, 然後以 PBS/Tween 清白 4 次。以 1:8000 添加 HRP-共軛之抗-人類 IgG, 在室溫培育 1 小時, 然後以 PBS/Tween 清白平板 4 次。添加 TMB



顯影劑，培育 10 分鐘並在平板讀取儀於 650nm 讀取平板。抗 -GM-CSF mAb 選殖株及重組 mAb 結合至 rhGM-CSF-Ile、rhGM-CSF-Thr、*E. coli* 衍生之 rhGM-CSF 及重組 cynoGM-CSF，但未結合至小鼠、大鼠或犬 GM-CSF。某些但非全部的選殖株也結合至酵母菌衍生之 rhGM-CSF(Leukine®)(第 8A 圖)。在一分開分析中，一來自融合瘤上清液之抗 -GM-CSF mAb 選殖及第二穩定細胞株(SCL)轉染結合至 PBMC 衍生之 rhGM-CSF、rhGM-CSF-Ile 及 rcynoGM-CSF，但未結合至小鼠、大鼠、兔子或犬 GM-CSF(第 8B 圖)。

#### 實施例 6: 對於重組抗 -GM-CSF mAb 於細胞系生物分析法及人類全體血液使用多 GM-CSF 分子之 IC50 值測定

如上所述，從短暫轉染細胞及穩定轉染細胞株表現完全人類重組抗 -hGM-CSF 抗體。從兩獨立的短暫轉染(第一 TT 及第二 TT)以及兩分開收取之穩定細胞株(第一 SCL 及第二 SCL)純化材料。下列實驗說明對於對抗不同形式之人類及長尾獼猴 GM-CSF 的六個重組抗體選殖株之 IC50 值測定(表 7-9)。

#### 6.1 經由重組抗 -GM-CSF mAb 之 AML-5 細胞 GM-CSF-依存性增殖的抑制作用

如實施例 2.4.2 所述使用 mAb 開始以 10 µg/mL 的 9-倍連續稀釋及事先測定 EC90 濃度之細胞激素進行 AML-5 增殖分析。對於使用第二 TT 及第二 SCL 材料之實驗(第 9 圖)，以下列濃度添加細胞激素：0.2 ng/mL 之 PBMC 衍生之

nhGM-CSF; 0.4 ng/mL 之 rhGM-CSF-Ile; 以及 0.1 ng/mL 之 rCynoGM-CSF。對於其他分析，除以上細胞激素之外測試 rhGM-CSF-Thr(0.4 ng/mL)及肺組織衍生之 ncynoGM-CSF(3 ng/mL)。在每一實驗中，也使用 2-倍連續稀釋滴定所用之細胞激素來計算該實驗之 EC90 值。添加  $2.5 \times 10^4$  AML-5 細胞/mL 於總體積 100 $\mu$ L 之前，在 37°C 培育細胞激素及抗體 30 分鐘。在 37°C、10% CO<sub>2</sub> 72 小時之後，每一井添加 1 微居里氬化胸腺核苷。6 小時後收取細胞培養，並以液態閃爍計數器測量併入之氬化胸腺核苷。如實施例 2.4.2 計算經由重組 mAb 之 AML-5 增殖的抑制百分比。使用 Microsoft Excel 產生非線性回歸分析以及增殖之 50%抑制 (IC50) 值計算。實驗中用於刺激細胞之細胞激素量在其 EC90 值的兩倍內者，用於計算各 mAb 的平均 IC50 值。

全部短暫-及穩定細胞株產生之之重組抗體以劑量依存性方式抑制 GM-CSF-誘發的 AML-5 細胞增殖。全部來自短暫轉染的六個上述抗體以 IC50 值 <0.8 nM 抑制人類 GM-CSF 以及以 IC50 值 <3.5 nM 抑制長尾獼猴 GM-CSF。全部六個穩定細胞株上述抗體以 IC50 值 <1.5 nM 抑制人類 GM-CSF 以及以 IC50 值 <3.5 nM 抑制長尾獼猴 GM-CSF。對於三種抗體的結果示於第 9 圖。對於 AML-5 增殖分析所測試之全部抗體 IC50 值及細胞激素之概述示於表 7。

表 7：AML-5 增殖分析中重組 mAb 的 IC50(nM) 值

細胞激素	抗體	n	IgG A	IgG B	IgG C	IgG E
rhGM-CMS-Ile	第一 TT	2	0.545	0.286(n4)	0.258(n4)	0.403
	第二 TT	3	0.579	0.581	0.380	0.380(n2)
	第一 SCL	3	0.844	1.192	0.766	0.971(n2)
	第二 SCL	1	0.966	0.943	0.595	
rhGM-CSF-Thr	第一 TT	2	0.475	0.540	0.469	0.371
	第二 TT	1	0.181	0.200	0.165	0.249
	第一 SCL	2	0.706	0.509	0.557	0.549
nhGM-CSF (PBMC)	第一 TT	2	0.264	0.155	0.190	0.247
	第二 TT	2	0.195	0.232	0.312	0.574(n1)
	第一 SCL	2	0.308	0.270	0.160	0.360(n1)
	第二 SCL	1	0.251	0.213	0.081	
rcynoGM-CSF	第一 TT	1	0.395	0.072	0.253	0.215
	第二 TT	1	1.607	1.319	0.864	0.693
	第一 SCL	2	3.267	1.177	1.624	2.479(n1)
	第二 SCL	1	2.488	0.842	1.755	
ncynoGM-CSF (lung)	第二 TT	1	1.530	3.242	1.222	1.331
	第一 SCL	1	1.471	2.683	1.696	1.604

## 6.2 在 TF-1 細胞中經由重組抗-GM-CSF mAb 之 GM-CSF-依 存性 STAT5 磷酸化的抑制作用

如實施例 2.4.3 所述使用 mAb 開始以 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 6-倍連續稀釋及事先測定 EC90 濃度之細胞激素進行 TF-1 STAT5 磷酸化分析。對於使用第二 TT 及第二 SCL 材料之實驗(第 10 圖)，以下列濃度添加細胞激素：0.6  $\text{ng}/\text{mL}$  之 PBMC 衍生之 nhGM-CSF 及 rhGM-CSF-Ile；0.1  $\text{ng}/\text{mL}$  之 rcynoGM-CSF。對於使用第一 TT 材料之實驗(第 11 圖)，使用來自經刺激人類小呼吸道上皮細胞(SAEC)培養上清液(最終 nhGM-CSF 濃度為 0.2  $\text{ng}/\text{mL}$ )及來自經刺激長尾獼猴肺培養上清液(最終 ncynoGM-CSF 濃度為 0.1  $\text{ng}/\text{mL}$ )。第 12 圖中，添加來自經刺激長尾獼猴 PBMC 培養上清液(最終 GM-CSF 濃度為 1  $\text{ng}/\text{mL}$ )

至來自第二 SCL 之 GM-CSF mAb。對於其他分析，除以上細胞激素之外測試 0.75 ng/mL 之 rhGM-CSF-Thr。在每一實驗中，也使用 2-倍連續稀釋滴定所用之細胞激素來計算該實驗之 EC90 值。15 分鐘之後，固定及滲透細胞，以及如上實施例 2.2.1 及 2.4.3 所述使用抗-磷-STAT5 抗體偵測 STAT5 磷酸化的量。如實施例 2.4.3 計算經由重組 mAb 之 Stat5 磷酸化的抑制百分比。使用 GraphPad Prism 4.01 計算非線性回歸分析以及增殖之最大抑制作用的一半 (IC50<sub>hm</sub>) 值。實驗中用於刺激細胞之細胞激素量在其 EC90 值的兩倍內者，用於計算該單株抗體的平均 IC50 值。

### 6.3 經由重組抗-GM-CSF mAb 之原始人類單核球的 GM-CSF-依存性活化抑制作用

為評估 mAb 中和人類單核球中 GM-CSF-誘發之代謝活性的能力，使用單核球單離套組 II (Miltenyi Biotech) 從白血球分離包 (Amgen 華盛頓血液捐贈計畫) 單離原始單核球。負篩選的細胞是 90%-95% CD14<sup>+</sup> 細胞如流式細胞技術評估 (數據未示)。在 96-井平底平板中，PBMC 衍生之 nhGM-CSF 或 rhGM-CSF-Ile (0.05 ng/mL) 與開始以 20 µg/mL 之 6-倍連續稀釋的 mAb 培育 30 分鐘。添加 CD14<sup>+</sup> 細胞 (150,000/mL) 於共 100 µL 培養基 (補充以 10% FCS、10 mM HEPES、2 mM 麩醯胺酸、50 U/mL 青黴素、50 µg/mL 鏈黴素及 55 µM β-巰基乙醇之 RPMI) 至平板並在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培育 5 天。經由添加 20 µL 之 Alamar Blue (BioSource, DAL1025, Invitrogen, Carlsbad, CA) 與培養基之 1:1 混合物評估 GM-CSF-誘發的代謝活性，並在 4-8 小時後計算 570-600 nm 的吸光率。使用下列方程式計算經由

重組 mAb 之人類 CD14<sup>+</sup>單核球活性的抑制百分比：

$$([A \text{ 之 } OD_{570-600} - B \text{ 之 } OD_{570-600} \text{ of}] / [A \text{ 之 } OD_{570-600} - C \text{ 之 } OD_{570-600}]) * 100$$

其中 A=細胞+細胞激素，B=細胞+mAb+細胞激素，以及 C=只有細胞

使用 Microsoft Excel 產生非線性回歸分析及增殖之 50%抑制作用 (IC<sub>50</sub>)值計算。實驗中用於刺激細胞之細胞激素量在其 EC<sub>90</sub> 值的兩倍內者，用於計算該 mAb 的平均 IC<sub>50</sub> 值 (表 8)。短暫-及穩定細胞株產生之之重組抗體以劑量依存性方式抑制 GM-CSF-誘發的 AML-5 細胞增殖。該抗體以 IC<sub>50<sub>hm</sub></sub> 值 <0.13 nM 抑制人類 GM-CSF 以及以 IC<sub>50<sub>hm</sub></sub> 值 <0.31 nM 抑制長尾獼猴 GM-CSF。

表 8：TF-1 Stat5 磷酸化分析中重組 mAb 的 IC<sub>50</sub>(nM)值

細胞激素	抗體	n	IgG A	IgG B	IgG C	IgG E
rhGM-CMS-Ile	第一 TT	1	0.117	0.046	0.072	0.101
	第二 TT	2	0.016	0.013	0.012	
	第一 SCL	1	0.011	0.008	0.002	
	第二 SCL	1	0.027	0.009	0.011	
rhGM-CSF-Thr	第一 TT	1	0.114	0.052	0.050	0.068
nhGM-CSF (PBMC)	第二 TT	1	0.009	0.008	0.009	
	第二 SCL	1	0.010	0.008	0.009	
nhGM-CSF (SAEC 上清液)	第一 TT	1	0.042	0.025	0.022	0.030
rcynoGM-CSF	第一 TT	2	0.050	0.021	0.031	0.052
	第二 TT	1	0.230	0.183	0.305	
	第二 SCL	1	0.128	0.149	0.196	
ncynoGM-CSF (肺上清液)	第二 TT	1	0.179	0.079	0.141	0.191
ncynoGM-CSF (PBMC 上清液)	第一 TT	1		0.0022		
	第二 SCL	1		0.0004		

短暫-及穩定細胞株產生之重組抗體以劑量依存性方式抑制 GM-CSF-誘發的人類單核球活性。不顧表現方法，上述抗體皆以 IC<sub>50</sub> 值 <0.55 nM 抑制天然及重組 hGM-CSF。對於第一 TT 材料之結果示於第 13 圖。人類單核球分析中對於全部測試抗體之 IC<sub>50</sub> 值概述示於表 9。

表 9：人類單核球分析中重組 mAb 的 IC<sub>50</sub>(nM)值

細胞激素	抗體	n	IgG A	IgG B	IgG C	IgG E
rhGM-CMS-Ile	第一 TT	1	0.076	0.078	0.034	0.089
	第二 TT	2	0.136	0.096	0.083	0.142
	第一 SCL	1	0.028	0.051	0.046	
	第二 SCL	1	0.130	0.150	0.089	
nhGM-CSF (PBMC)	第一 TT	1	0.549	0.253	0.301	0.490
	第二 TT	2	0.210	0.219	0.161	0.305
	第一 SCL	2	0.149	0.151	0.085	0.210(n1)
	第二 SCL	1	0.171	0.204	0.114	

#### 6.4 經由穩定 CHO 細胞株製造之重組抗-GM-CSF 於人類整體血液產生 GM-CSF-誘發之 ENA-78 或 MIP-1 $\beta$ 的抑制作用

製備重組 hGM-CSF-Ile(終濃度 2 ng/mL)於補充 10% 正常人類血清、100 U/mL 青黴素、100  $\mu$ g/mL 鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸及 25 mM HepsS 之 RPMI，並在 96-井平底平板添加至以 100  $\mu$ g/mL 開始 6-倍連續稀釋之穩定 CHO 細胞株的重組 mAb。將相配於人類 IgG<sub>2</sub> 之同型物單株抗體(抗-KLH)添加至全部井中至最終總 IgG 濃度為 100  $\mu$ g/mL，並在 37°C 培育平板 30 分鐘。於 4-倍連續稀釋 +/- 100  $\mu$ g/mL 相配於人類 IgG<sub>2</sub> 之同型物滴定細胞激素來計算該實驗 EC<sub>90</sub> 值。收集人類整體血液至 Amgen 整體血液捐贈計畫之 Na-肝素採血管

(Becton Dickinson), 以及添加 228  $\mu\text{L}$  (285  $\mu\text{L}$  總體積) 血液至井並以緩慢吸量混合。在 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培育 40 小時後, 以 730 $\times$ g 旋轉平板 5 分鐘, 然後小心收集 55  $\mu\text{L}$  血漿並轉移到新的 96 井平板及冷凍。使用 R&D 系統之 hENA78 及 hMIP-1b DuoSets 試劑及方法步驟經由 ELISA 分析 ENA78 及 MIP-1b 之前, 解凍血漿並匯合一式兩份的井。使用 GraphPad Prism 4.01 計算非線性回歸分析以及增殖之最大抑制作用的一半 ( $\text{IC}_{50_{\text{hm}}}$ ) 值。

在此人類整體血液分析中, 重組人類 GM-CSF mAb 呈現抑制 GM-CSF-誘發製造 ENA78 及 MIP-1b。 $\text{IC}_{50_{\text{hm}}}$  值之測定, 對於 ENA78 製造為 0.155 nM 以及 MIP-1b 製造為 0.299 nM (第 14 圖)。

實施例 7: GM-CSF-誘發 AML-5 增殖分析人類單核球生物分析及 TF-1 細胞分析中 GM-CSF-誘發 TF-1 STAT-5 磷酸化之酵母菌衍生之 rhGM-CSF (Leukine®)、A431 衍生之 nhGM-CSF、大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF 及大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF-R23L 的中和作用

如實施例 2.4.2 所述使用純化自融合瘤上清液之 GM-CSF mAb 開始以 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 9-倍連續稀釋及事先測定 EC90 濃度之細胞激素 (大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 為 0.1  $\text{ng}/\text{mL}$ , 酵母菌衍生之 rhGM-CSF 為 0.05  $\text{ng}/\text{mL}$ ) 進行 AML-5 增殖分析。也使用 2-倍連續稀釋滴定所用之細胞激素來計算該實驗之 EC90 值。添加  $2.5 \times 10^4$  AML-5 細胞 / mL 於總體積 100  $\mu\text{L}$  之前, 在 37°C 培育細胞激素及抗體 30 分鐘。

在 37°C、10% CO<sub>2</sub> 72 小時之後，每一井添加 1 微居里氚化胸腺核苷。6 小時後收取細胞培養，並以液態閃爍計數器測量併入之氚化胸腺核苷。如第 15a 圖所示，四個 mAb 能中和 *E. coli* 衍生之 rhGM-CSF 的活性，但不能中和酵母菌衍生之 rhGM-CSF(Leukine®)。

如實施例 6.3 所述使用純化自融合瘤上清液之 mAb 開始以 12 g/mL 的 3-倍連續稀釋及事先測定 EC<sub>90</sub> 濃度之細胞激素 (A431 細胞衍生之 nhGM-CSF 以及酵母菌衍生之 rhGM-CSF 為 0.04 ng/mL) 進行人類單核球分析。也使用 2-倍連續稀釋滴定所用之細胞激素來計算該實驗之 EC<sub>90</sub> 值。添加 1.5x10<sup>5</sup> 人類 CD14<sup>+</sup> 細胞/mL 於總體積 100μL 之前，在 37°C 一起培育細胞激素及抗體 30 分鐘。在 37°C 於 5% CO<sub>2</sub> 培育平板 5 天，並經由測量 Alamar Blue 的還原來評估 GM-CSF-誘發的代謝活性。對於兩分析，使用 Microsoft Excel 產生非線性回歸分析以及增殖之 50% 抑制 (IC<sub>50</sub>) 值計算。實驗中用於刺激細胞之細胞激素量在其 EC<sub>90</sub> 值的兩倍內者包括在分析中。如第 15b 圖所示，四個 mAb 能中和 A431 細胞衍生之 rhGM-CSF 的活性，但不能中和酵母菌衍生之 rhGM-CSF(Leukine®)。

如實施例 2.2.1 所述使用重組抗 -GM-CSF mAb 進行 TF-1 STAT5 磷酸化分析。在一式兩份之 96 井平板中，抗 -GM-CSF mAb 開始以 2 μg/mL 的 6-倍連續稀釋及事先測定 EC<sub>90</sub> 濃度之細胞激素 (大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF 及大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF-R23L 為 0.5 ng/mL，酵母菌衍生



之 rhGM-CSF-R23L(Leukine®)為 0.2 ng/mL)。30 分鐘培育後，添加  $3 \times 10^5$  TF-1 細胞/ml 至總體積 100  $\mu$ L。在 37°C 培育平板 15 分鐘。為固定細胞，添加 25  $\mu$ L 的 10% 三聚甲醛於 PBS 至終濃度為 2% 三聚甲醛，以及在 37°C 培育平板 10 分鐘。將 200  $\mu$ L IMDM+0.5% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-麩醯胺酸、50 U/mL 青黴素、50  $\mu$ g/mL 鏈黴素、55  $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇添加至井中以終止固定作用，然後以 350xg 離心平板 10 分鐘。移除細胞上清液並強力混合細胞時緩慢添加 400  $\mu$ L 之 90% MeOH。在 -20°C 隔夜培育後旋轉平板，以 600  $\mu$ L 的 PBS/2% FCS 清洗並與 50  $\mu$ L 之 1:5 稀釋(於含 2% FBS 之 PBS)抗-磷 STAT5-Alexa488(Becton Dickinson 612598, Franklin Lakes, NJ)在室溫培育 30 分鐘。清洗細胞，再懸浮於含 2% FBS 之 PBS，然後使用 MultiWell FACScalibur (Becton Dickinson)轉移至圓底微力價平板用於流式細胞技術分析。使用 FlowJo FACS 分析軟體測定 STAT5<sup>+</sup>細胞的百分比。使用下列方程式計算經由融合瘤上清液之 STAT5 磷酸化的抑制百分比：

$$100 - \left( \frac{A \text{ 之 STAT5+} \% - B \text{ 之 STAT5+} \%}{C \text{ 之 STAT5+} \% - B \text{ 之 STAT5+} \%} \right) * 100$$

其中 A=細胞+融合瘤上清液+rhGM-CSF，B=只有細胞，C=細胞+rhGM-CSF

在 GM-CSF-誘發 TF-1 細胞 pSTAT5 分析中，大腸桿菌 (*E. coli*) 衍生之 rhGM-CSF-R23L 展現 EC90 (0.384 ng/mL) 可媲美於酵母菌衍生之 rhGM-CSF-R23L(Leukine®) (0.130 ng/mL) 及大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF (0.298 ng/mL)。如第 16

圖所示，抗-GM-CSF mAb 中和大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF，但不中和酵母菌衍生之 (Leukine®) 或未醱化大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF-R23L。此使人聯想到該差別的基礎是由於相較於天然 GM-CSF，酵母菌衍生之 rhGM-CSF-R23L (Leukine®) 及大腸桿菌 rhGM-CSF-R23L 之一級序列中同一單一胺基酸差異 (在位置 23 的白胺酸為精胺酸)，而非因為酵母菌表現之糖化作用差異。

### 實施例 8：經由結合競爭之上述六個抗-GM-CSF 單株抗體的抗原決定基結合

使用結合競爭分析進行抗原決定基結合，其中一經標記 mAb 與過量其他未標記 mAb 競爭結合至 rhGM-CSF-Ile。與另一競爭之抗體被分配於同一群中。上述六個抗-GM-CSF mAb 有五個彼此競爭結合至 rhGM-CSF，而有一個未如此。

#### 【圖式簡單說明】

第 1a-d 圖：A) 在活動性 EAE 中預防性投與抗-老鼠 GM-CSF Mab 會延遲疾病開始及降低發生率。為誘發活動性 SJL/PLP<sub>139-151</sub> EAE，對 11 小鼠皮下給予 250  $\mu$ g PLP<sub>139-151</sub>+CFA 並進行 3 週評估。在免疫當日對每組 11 隻小鼠給予 500  $\mu$ g 抗-老鼠 GM-CSF mAb、同型物對照組 mAb 或 PBS。取每日重量及計分。臨床計分 0：沒有疾病；1：無力的尾巴；2：扶直反射的輕微損害或步伐異常；3：嚴重後肢虛弱，部分後肢麻痺；4：全部的后肢麻痺，使用前肢移動。相較於對照組，抗-GM-CSF mAb 顯示開始延遲，以及以 45% 的發生率相較於對照組的 91-100%。

B 及 C)預防性投與抗 -GM-CSF mAb 防止體重損失(B)及降低平均臨床計分(C)。

D)500  $\mu$ g 的單劑抗 -mGM-CSF mAb、同型物對照組 mAb 或 PBS 在疾病開始日的結果，n=14 小鼠。在活動性 EAE 治療性投與抗 -GM-CSF mAb 可降低平均臨床計分。P<0.05 對同型物對照組或 PBS。

第 2a-c 圖：A)在活動性 EAE 治療性投與抗 -mGM-CSF mAb 加速復元。復元=減少 $\geq 1$  全部計分 $\geq 2$ d 連續地計分 $\leq 1$ 。

B)相較於處以抗 -mGM-CSF mAb、同型物對照組 mAb 或 PBS 對照組之小鼠，在疾病開始日(免疫後第 13 天)的治療性抗 -mGM-CSF mAb 處理可降低 CNS 發炎。

C 及 D)在授受性轉移 EAE，預防性或治療性投與抗 -mGM-CSF mAb 可改善疾病。在授受性轉移 EAE 模式中，對 15 隻小鼠給予 100  $\mu$ g PLP<sub>139-151</sub>+CFA，以及在活體外以 PLP 胜肽刺激 4 天之免疫後第 10 天收取淋巴結，然後注射到小鼠接受者。對小鼠進行 3 週的體重評估及臨床計分。第 C 圖顯示細胞轉移日之處理，第 D 圖顯示 EAE 開始之日的處理。

第 3 圖：代表性 TF-1 Stat5 磷酸化分析顯示抗 -GM-CSF mAb 抑制作用或 0.4 ng/ml rhGM-CSF-Ile。

第 4 圖：長方條統計圖顯示大腸桿菌 (*E. coli*)rhGM-CSF 免疫之小鼠的融合瘤上清液於 TF-1 STAT5 磷酸化分析中 rhGM-CSF-Ile 之抑制作用分佈。

第 5 圖：代表性 AML-5 增殖分析顯示抗 -GM-CSF mAb

抑制 0.15 ng/ml rhGM-CSF-Ile。

第 6a-f 圖：純化自融合瘤上清液之 mAb 於 AML-5 增殖分析中抑制 GM-CSF 及 CSF-1。

第 7a-b 圖：純化自融合瘤上清液之 mAb 於 TF-1 Stat5 磷酸化分析中抑制 GM-CSF 及 IL-3。

第 8a-b 圖：以 ELISA 測量融合瘤上清液抗-GM-CSF mAb 或重組抗-GM-CSF mAb 結合至各種物種之 GM-CSF 的結果。

第 9 圖：於 AML-5 增殖分析中重組 mAb(第二 TT 及第二 SCL)抑制人類及長尾獼猴 GM-CSF。

第 10 圖：於 TF-1 Stat-5 磷酸化分析中重組 mAb(第二 TT 及第二 SCL)抑制人類及長尾獼猴 GM-CSF。

第 11 圖：於 TF-1 Stat5 磷酸化分析中重組 mAb(第一 TT)抑制天然人類及長尾獼猴肺衍生之 GM-CSF。

第 12 圖：於 TF-1 Stat5 磷酸化分析中重組 mAb(第二 SCL)IgG B 抑制天然長尾獼猴 PBMC 衍生之 GM-CSF。

第 13 圖：在人類單核球分析中重組 mAb(第二 TT)抑制人類 GM-CSF。

第 14 圖：重組 mAb(第二 SCL)IgG B 抑制 GM-CSF-誘發製造 MIP-1b 及 ENA78 於整體血液。

第 15a-b 圖：在 AML-5 增殖分析(a)或單核球分析(b)中，純化自融合瘤上清液之 mAb 不會抑制酵母菌衍生之 rhGM-CSF(Leukine®)。

第 16 圖：mAb 中和大腸桿菌衍生 rhGM-CSF，但不中

和酵母菌衍生之 rhGM-CSF(Leukine®)或未醱化大腸桿菌衍生之 rhGM-CSF-R23L。

【主要元件符號說明】

無。

## 五、中文發明摘要：

提供結合至人類 GM-CSF 蛋白質之抗原結合蛋白質。也提供編碼該抗原結合蛋白質之核酸，載體以及編碼該抗原結合蛋白質之細胞。抗原結合蛋白質能抑制 GM-CSF 結合至 GM-CSFR，抑制 GM-CSF-誘發骨髓系統細胞株之增殖及傳訊息，以及抑制 GM-CSF-誘發之人類單核球的活化。

## 六、英文發明摘要：

Antigen binding proteins that bind to human GM-CSF protein are provided. Nucleic acids encoding the antigen binding protein, vectors, and cells encoding the same are also provided. The antigen binding proteins can inhibit binding of GM-CSF to GM-CSFR, inhibit GM-CSF-induced proliferation and signaling of myeloid lineage cell lines and inhibit GM-CSF-induced activation of human monocytes.

## 十、申請專利範圍：

1. 一種結合 GM-CSF 之經單離之抗原結合蛋白質，含有：

A) 一個或一個以上選自由以下所組群組之重鏈互補決定區域 (CDRH)：

(i) 選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；以及

(iv) 一 (i)、(ii) 及 (iii) 之 CDRH，含有不超過 4 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；

B) 一個或一個以上選自由以下所組群組之輕鏈互補決定區域 (CDRL)：

(i) 選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；以及

(iv) 一 (i)、(ii) 及 (iii) 之 CDRL，含有不超過 4 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；或

C)一個或一個以上 A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上 B)之輕鏈 CDRL。

2.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其含有至少一 A)之 CDRH 以及至少一 B)之 CDRL。

3.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其含有至少兩個 A)之 CDRH 以及至少兩個 B)之 CDRL。

4.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其含有該 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 及 CDRL3。

5.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該 A)之 CDRH 是選自由下所組群組：

(i) 選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；

(iii) 自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；以及

(iv) 一 (i)、(ii)及 (iii)之 CDRH，含有不超過 2 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；

該 B)之 CDRL 是選自由下所組群組：

(i) 選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2；



(iii) 選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；  
以及

(iv) 一 (i)、(ii) 及 (iii) 之 CDRL，含有不超過 2 個胺基酸之一個或一個以上胺基酸取代、刪除或插入；或

C) 一個或一個以上的 A) 之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的 B) 之輕鏈 CDRL。

6. 如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，含有

A) 選自由下所組群組之 CDRH：

(i) 選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；

B) 選自由下所組群組之 CDRL：

(i) 選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；  
或

C)一個或一個以上的 A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的 B)之輕鏈 CDRL。

7.如申請專利範圍第 6 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質含有：

A) SEQ ID NO:10、22、70 及 142 之 CDRH1，SEQ ID NO:11、23、35、47、59、71、95 及 143 之 CDRH2，以及 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、96、108、120、132 及 144 之 CDRH3；以及

B) SEQ ID NO:4、16、40、52、64、88、100、112、124 及 136 之 CDRL1，SEQ ID NO:5、17、29、41、65、77、89、101、113 及 137 之 CDRL2，以及 SEQ ID NO:6、18、42、66、78、126 及 138 之 CDRL3。

8.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質含有重鏈可變區域 (VH) 具有至少 80% 序列相同於選自由 SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129 及 141 所組群組之胺基酸序列，及/或可變輕鏈輕鏈可變區域 (VL) 具有至少 80% 序列相同於選自由 SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、123 及 135 所組群組之胺基酸序列。

9.如申請專利範圍第 8 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中 VH 具有至少 90% 序列相同於選自由 SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129 及 141 所組群組之胺基酸序列，及/或 VL 具有至少 90% 序列相同於選自由 SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、

123 及 135 所組群組之胺基酸序列。

10. 如申請專利範圍第 8 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中 VH 是選自由 SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129 及 141 所組群組，及 / 或 VL 是選自由 SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、123 及 135 所組群組。

11. 一種結合 GM-CSF 之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質含有：

A) 一個或一個以上選自由下所組群組之重鏈 CDRs(CDRH)：

(i) 選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；

B) 一個或一個以上選自由下所組群組之輕鏈 CDRs(CDRL)：

(i) 選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；

或

C)一個或一個以上的 A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的 B)之輕鏈 CDRL。

12.如申請專利範圍第 11 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質含有：

A)一個或一個以上選自由下所組群組之 CDRH：

(i) 選自由 SEQ ID NO:10、22、70、94 及 142 所組群組之 CDRH1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:11、23、28、35、47、59、71、95、106、119 及 143 所組群組之 CDRH2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、72、83、96、108、120、132 及 144 所組群組之 CDRH3；

B)一個或一個以上選自由下所組群組之 CDRL：

(i) 選自由 SEQ ID NO:4、16、30、40、52、64、88、100、107、112、118、124、125 及 136 所組群組之 CDRL1；

(ii) 選自由 SEQ ID NO:5、17、29、34、41、65、77、101、113、130、131 及 137 所組群組之 CDRL2；

(iii) 選自由 SEQ ID NO:6、18、42、46、66、78、84、89、90、102、114、126 及 138 所組群組之 CDRL3；  
或

C)一個或一個以上的 A)之重鏈 CDRH 以及一個或一個以上的 B)之輕鏈 CDRL。

13.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質是單株抗體，多株抗體，重組抗體，人

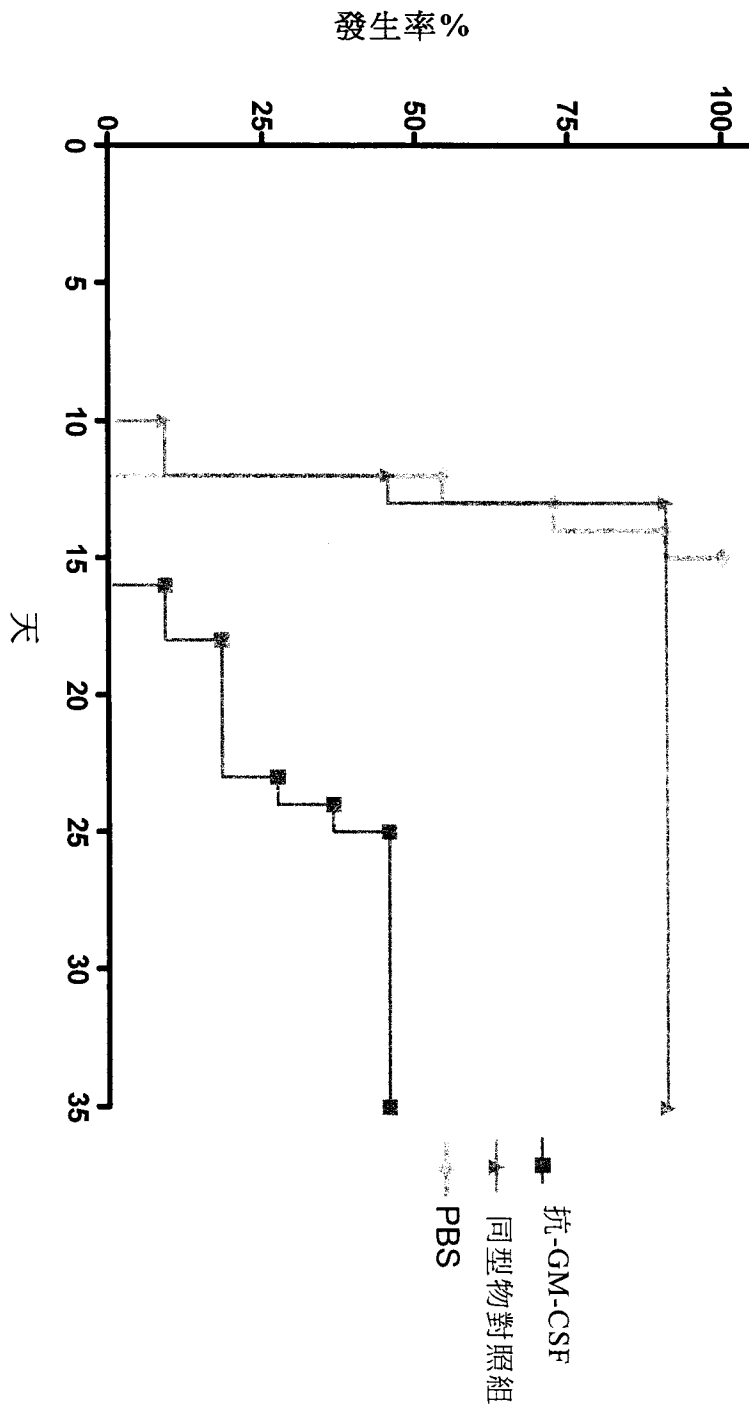
類抗體，人類化抗體，嵌合型抗體，多專一性抗體或其抗體片段。

- 14.如申請專利範圍第 13 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗體片段是 Fab 片段，Fab'片段，F(ab')<sub>2</sub> 片段，Fv 片段，雙鏈抗體(diabody)或單鏈抗體分子。
- 15.如申請專利範圍第 13 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質是人類抗體。
- 16.如申請專利範圍第 13 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質是單株抗體。
- 17.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質是 IgG1-、IgG2-、IgG3-或 IgG4-型。
- 18.如申請專利範圍第 17 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質是 IgG1-或 IgG2-型。
- 19.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質是偶合至標記基。
- 20.如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質，其中該抗原結合蛋白質抑制 GM-CSF 結合至人類 GM-CSF 的細胞外部分。
- 21.一種核酸分子，其係編碼如申請專利範圍第 1 項之抗原結合蛋白質。
- 22.如申請專利範圍第 21 項之核酸分子，其中該核酸分子是可操作地連接(operably linked)到一調節序列。
- 23.一種載體，含有如申請專利範圍第 21 項之核酸分子。
- 24.一種載體，含有如申請專利範圍第 22 項之核酸分子。

25. 一種宿主細胞，含有如申請專利範圍第 22 項之核酸分子。
26. 一種宿主細胞，含有如申請專利範圍第 24 項之載體。
27. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之抗原結合蛋白質之方法，其包括從分泌該抗原結合蛋白質之宿主細胞製備該抗原結合蛋白質之步驟。
28. 一種醫藥組成物，含有至少一如申請專利範圍第 1 項之抗原結合蛋白質以及醫藥可接受賦形劑。
29. 如申請專利範圍第 28 項之醫藥組成物，進一步含有額外活性劑。
30. 如申請專利範圍第 29 項之醫藥組成物，其中該額外活性劑是選自由放射性同位素、放射性核種、毒素或治療性及化學治療性基團所組群組。
31. 一種如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質之用途，其係用於製造在病人中治療或預防與 GM-CSF 有關症狀之藥劑。
32. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該症狀是選自由風濕病疾病、自體免疫疾病、血液疾病、腫瘤疾病、發炎疾病、神經系統之退化症狀、胃腸道、胃尿道症狀及內分泌失調所組群組。
33. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該症狀是選自由多發性硬化症、類風濕性關節炎、氣喘、牛皮癬、異位性皮膚炎及類肉瘤病(sarcoidosis)所組群組。
34. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該經單離之抗原結合蛋白質是單獨投與或作為組合治療。

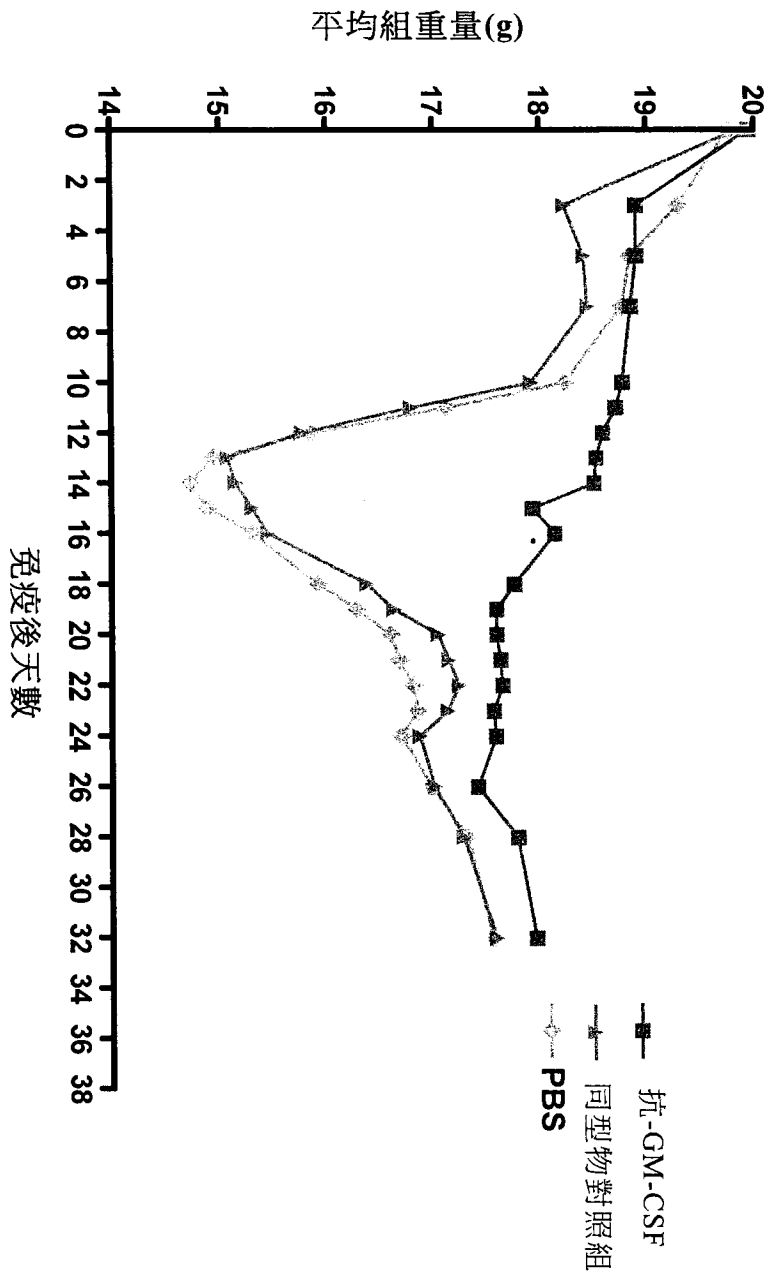
35. 一種如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質之用途，其係用於製造在病人中抑制 GM-CSF 結合至 GM-CSFR 之細胞外部分之藥劑。
36. 一種如申請專利範圍第 1 項之經單離之抗原結合蛋白質之用途，其係用於製造在病人中抑制 GM-CSF 活性之藥劑。
37. 如申請專利範圍第 36 項之用途，其中該 GM-CSF 活性是選自由骨髓系統細胞之分化、存活、增殖及活化所組群組。

十一、圖式：

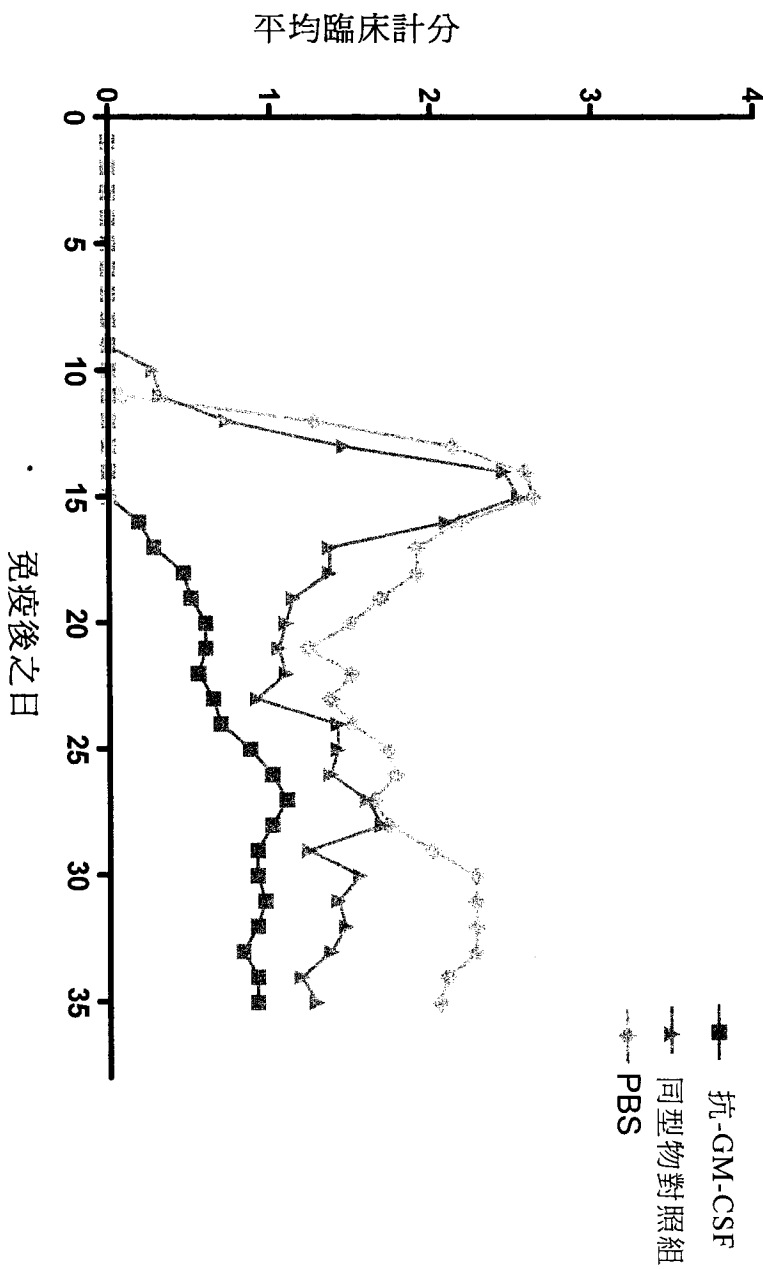


第 1a 圖

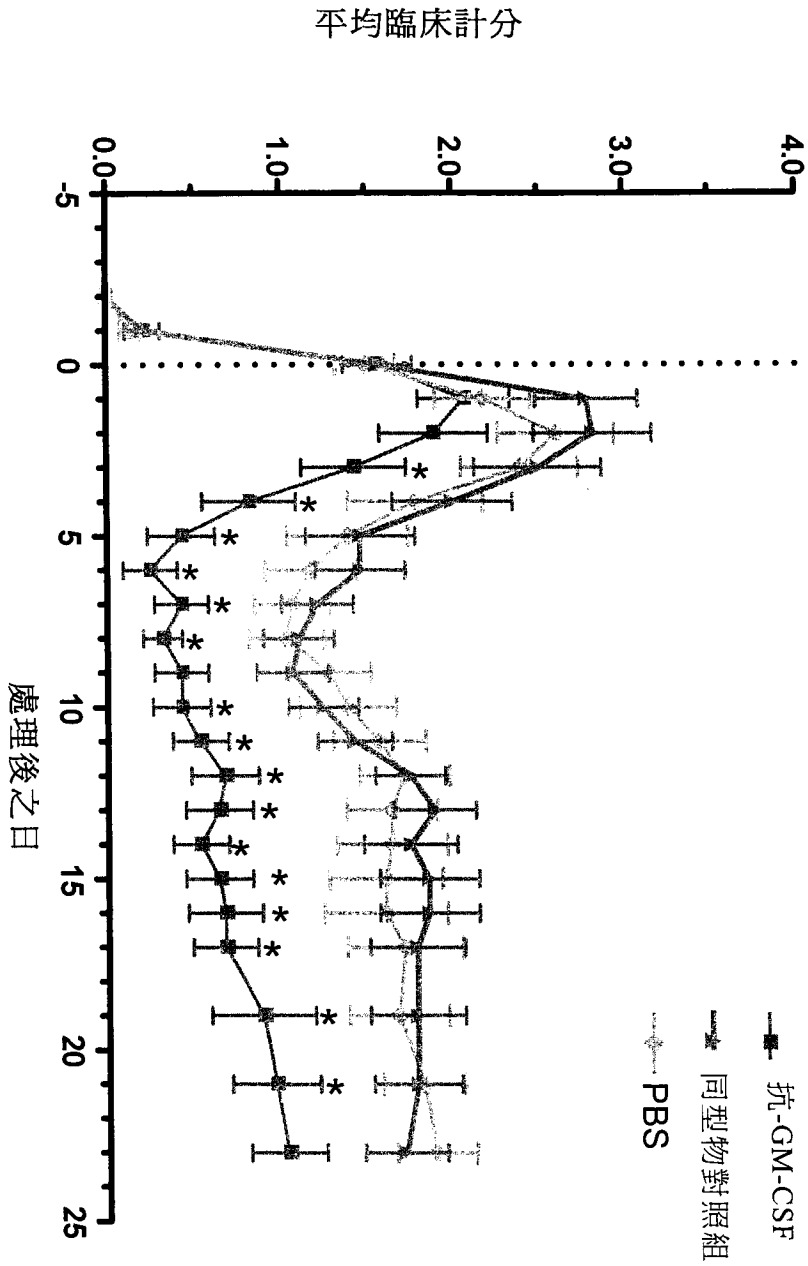




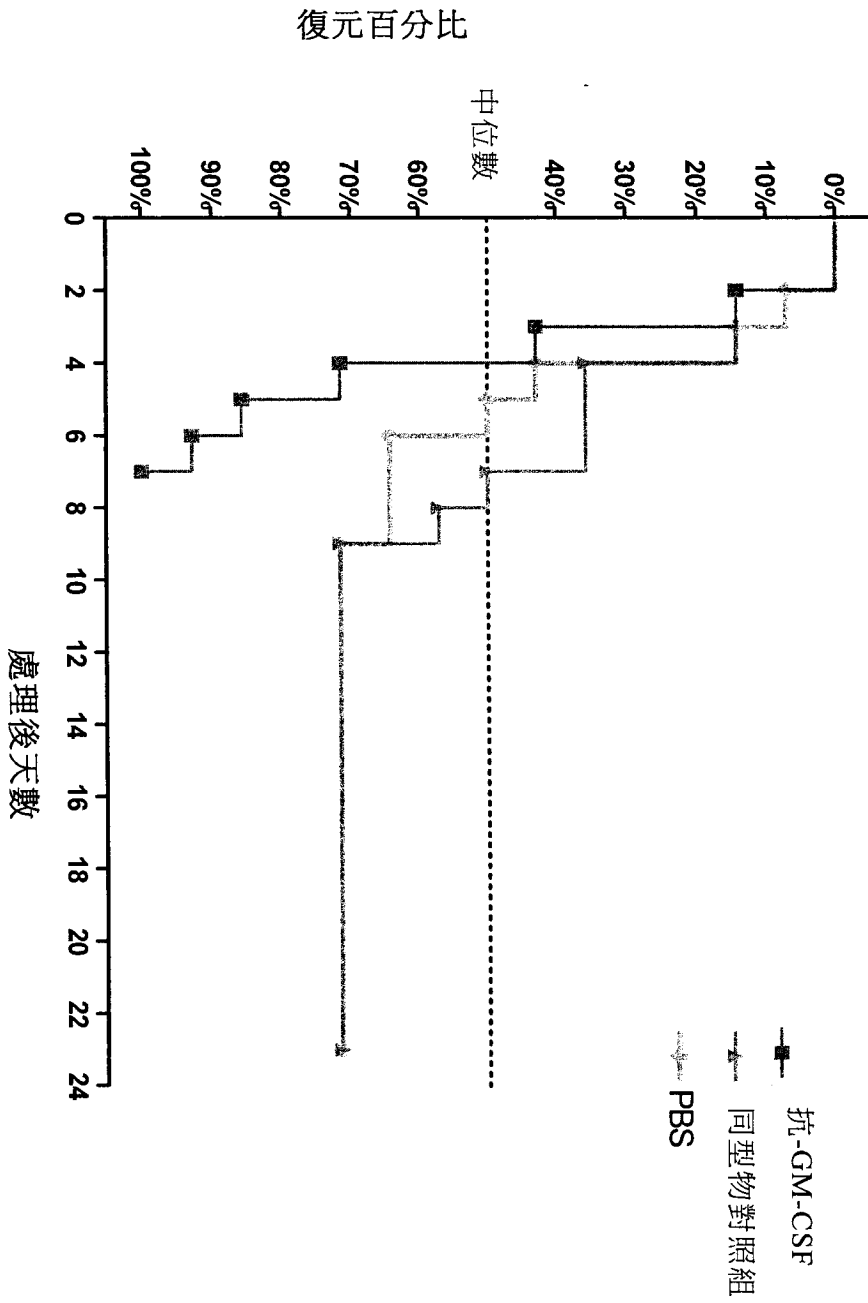
第 1b 圖



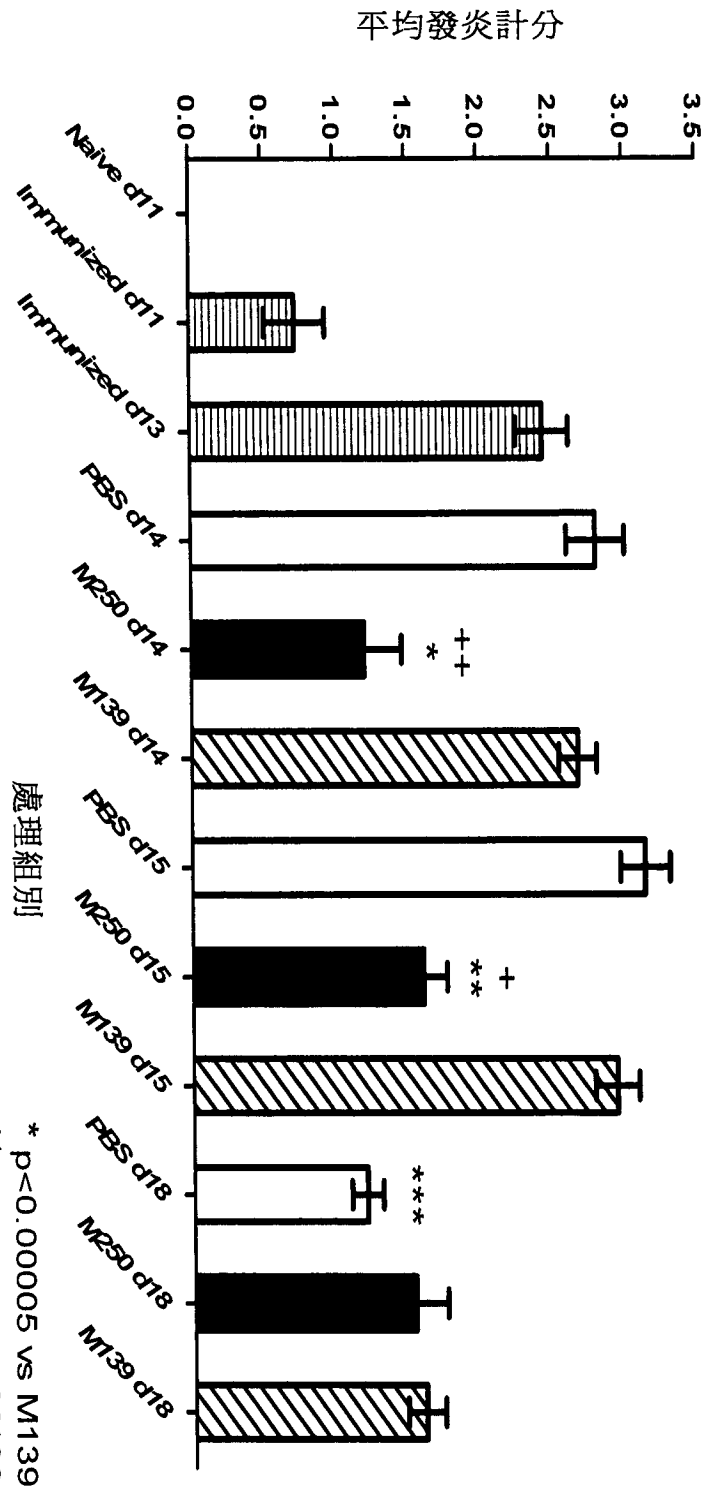
第 1c 圖



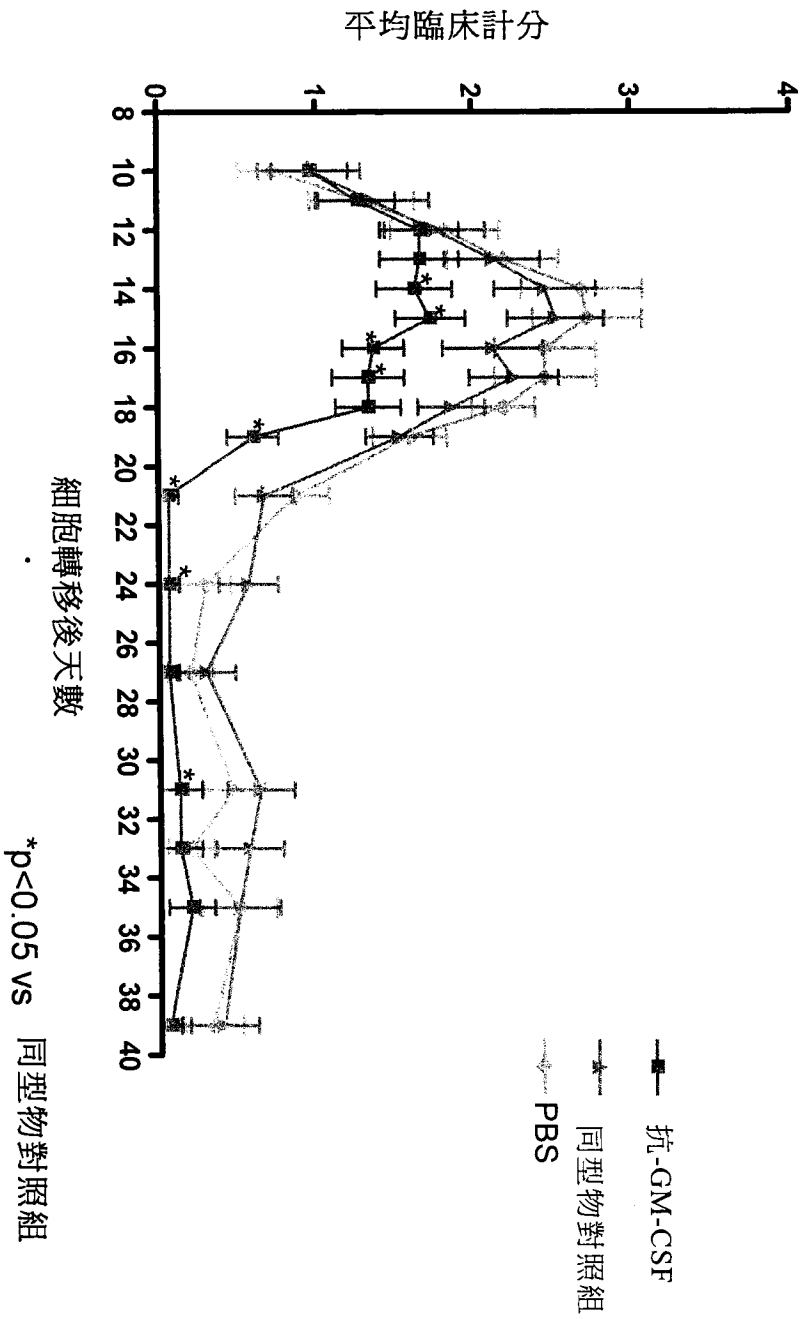
第 1d 圖



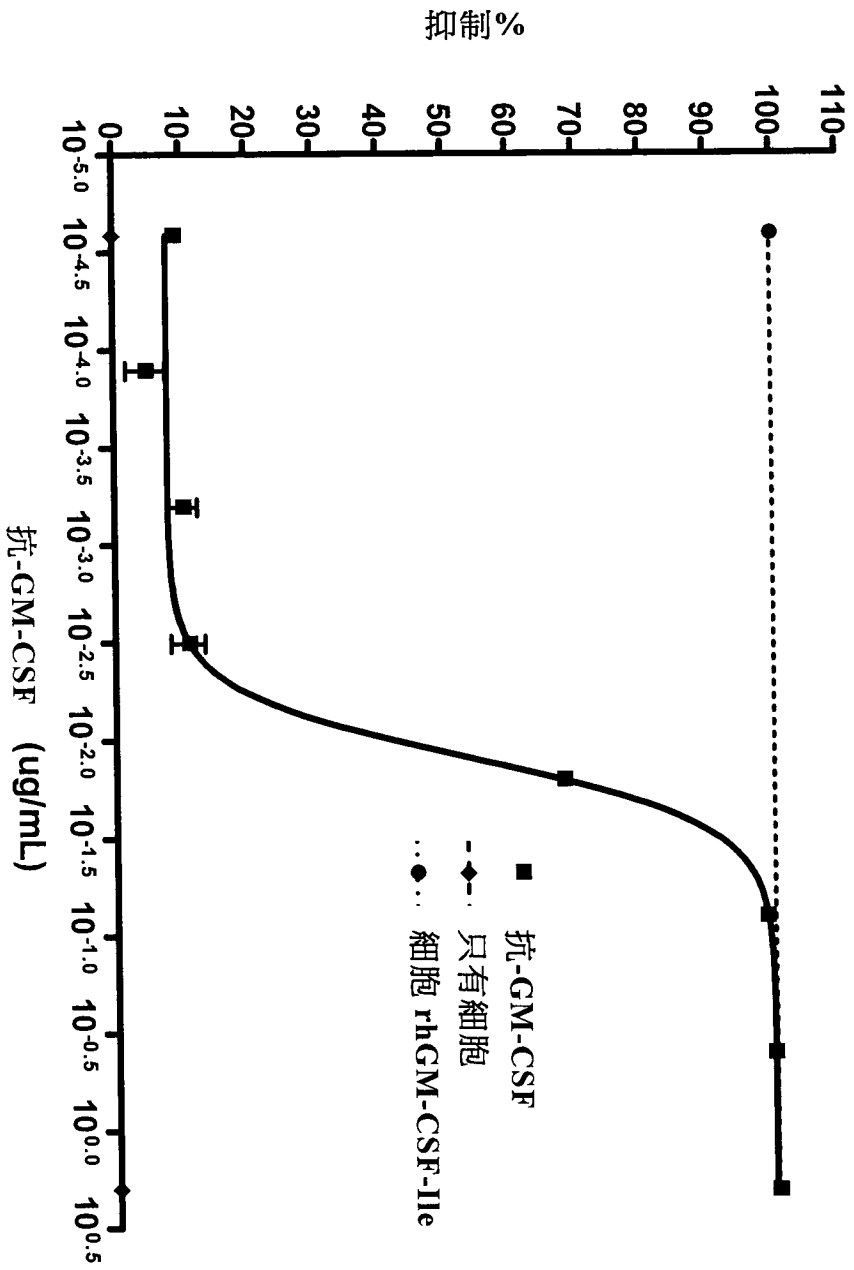
第 2a 圖



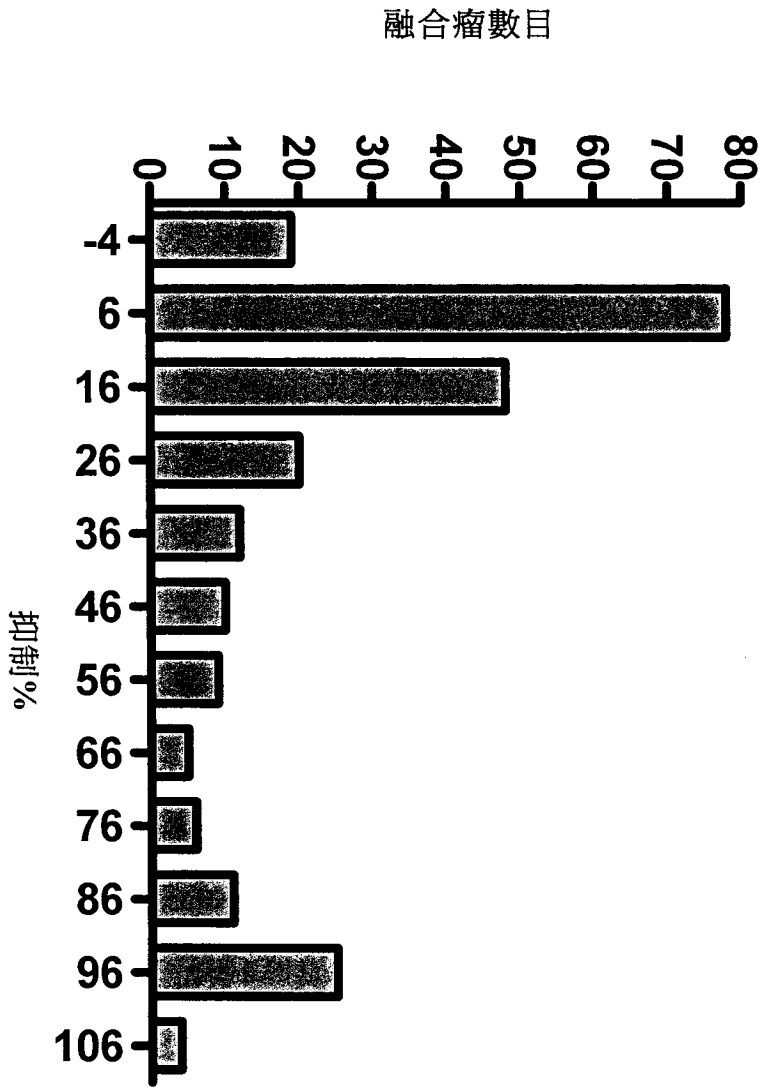
第 2b 圖  
脊髓



第 2c 圖

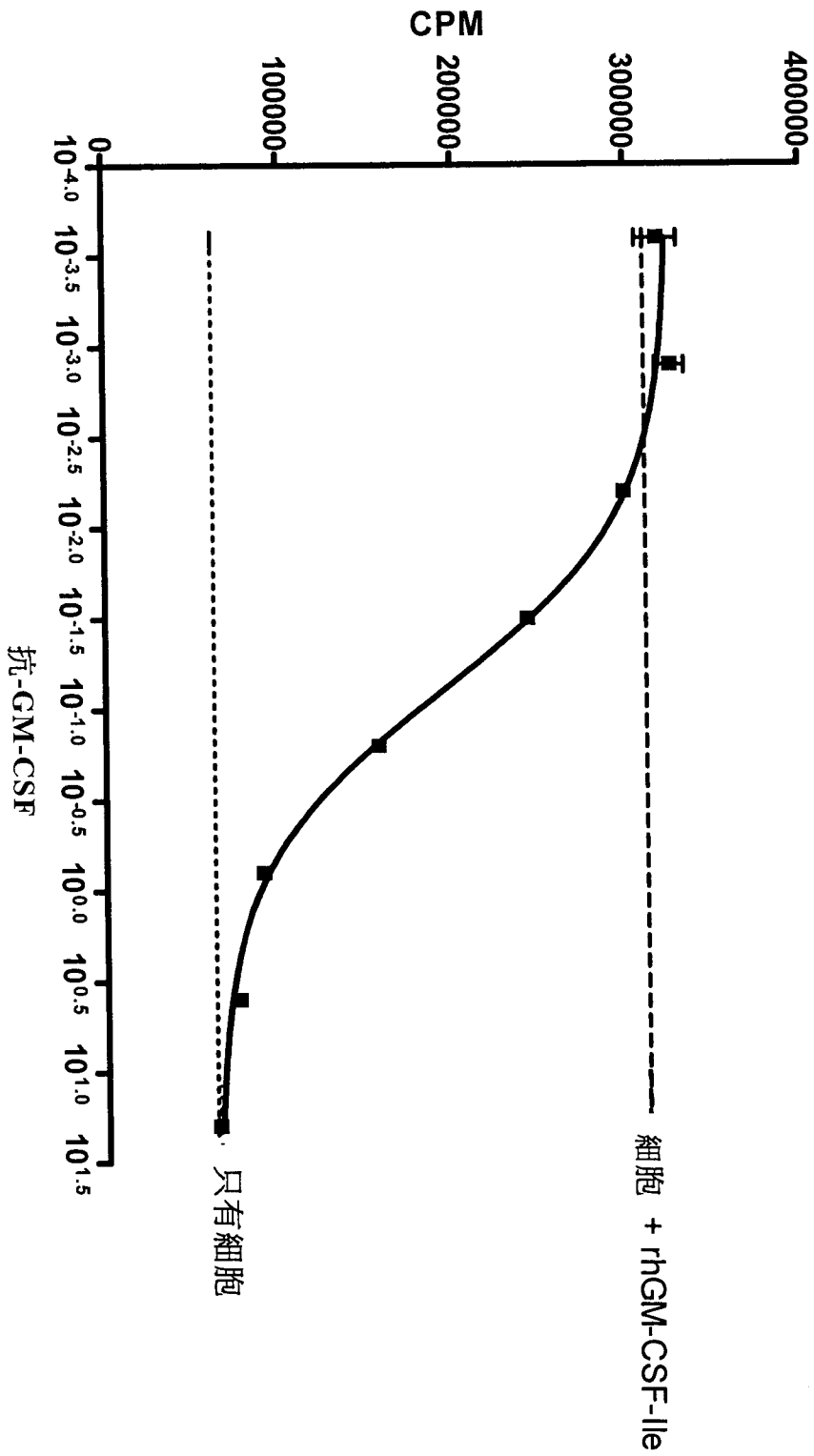


第 3 圖

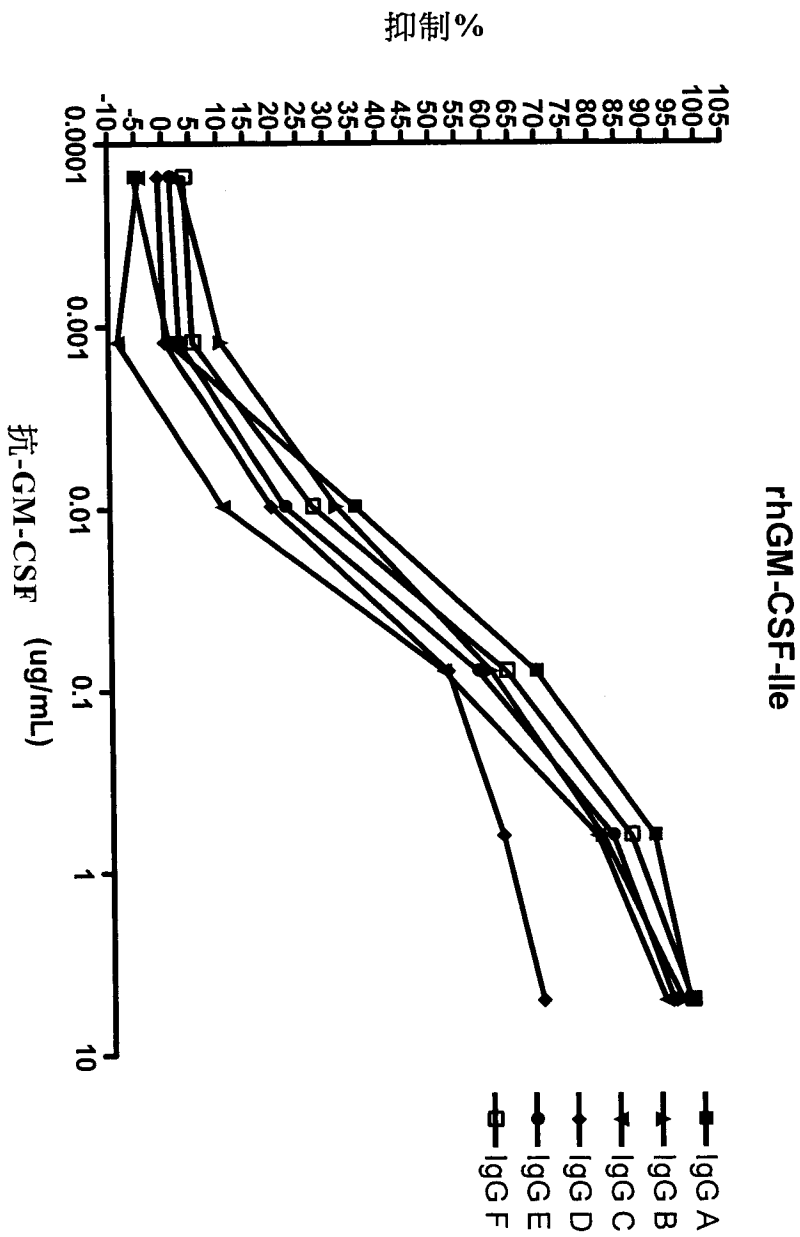


第 4 圖

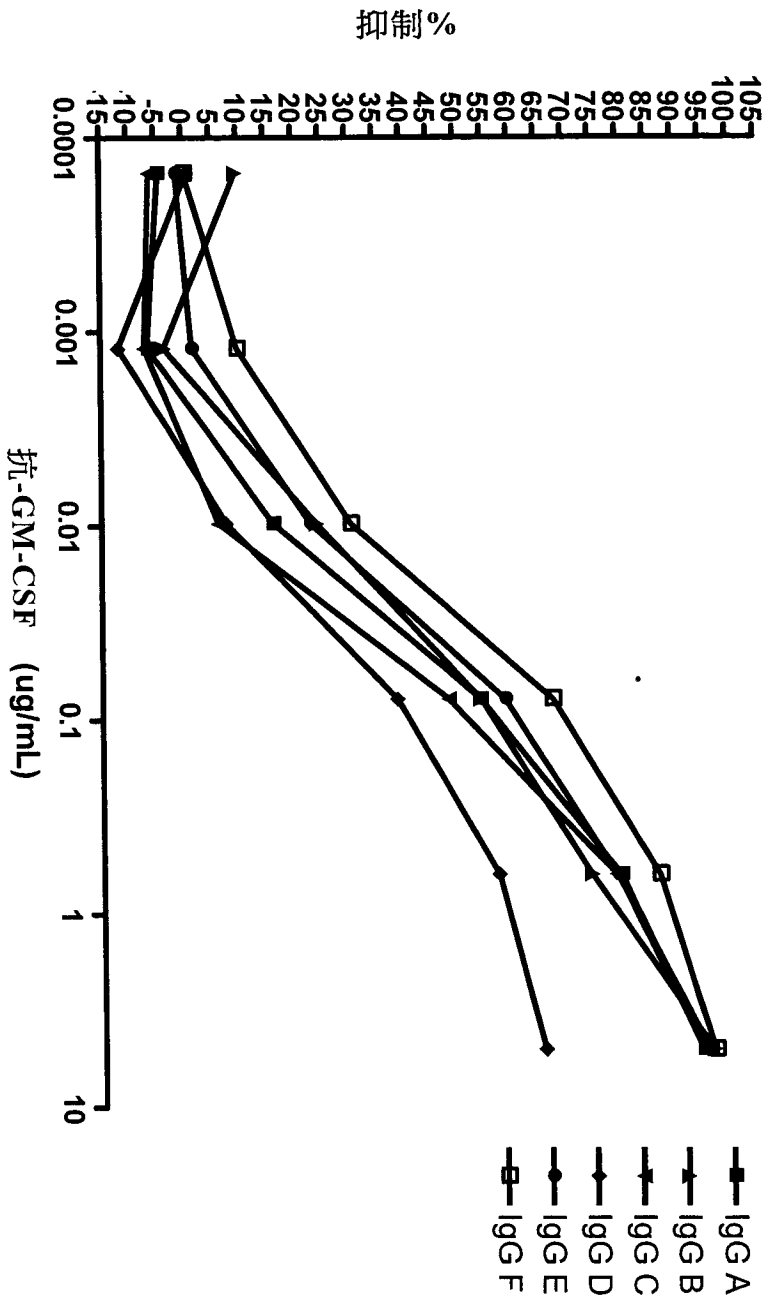




第 5 圖



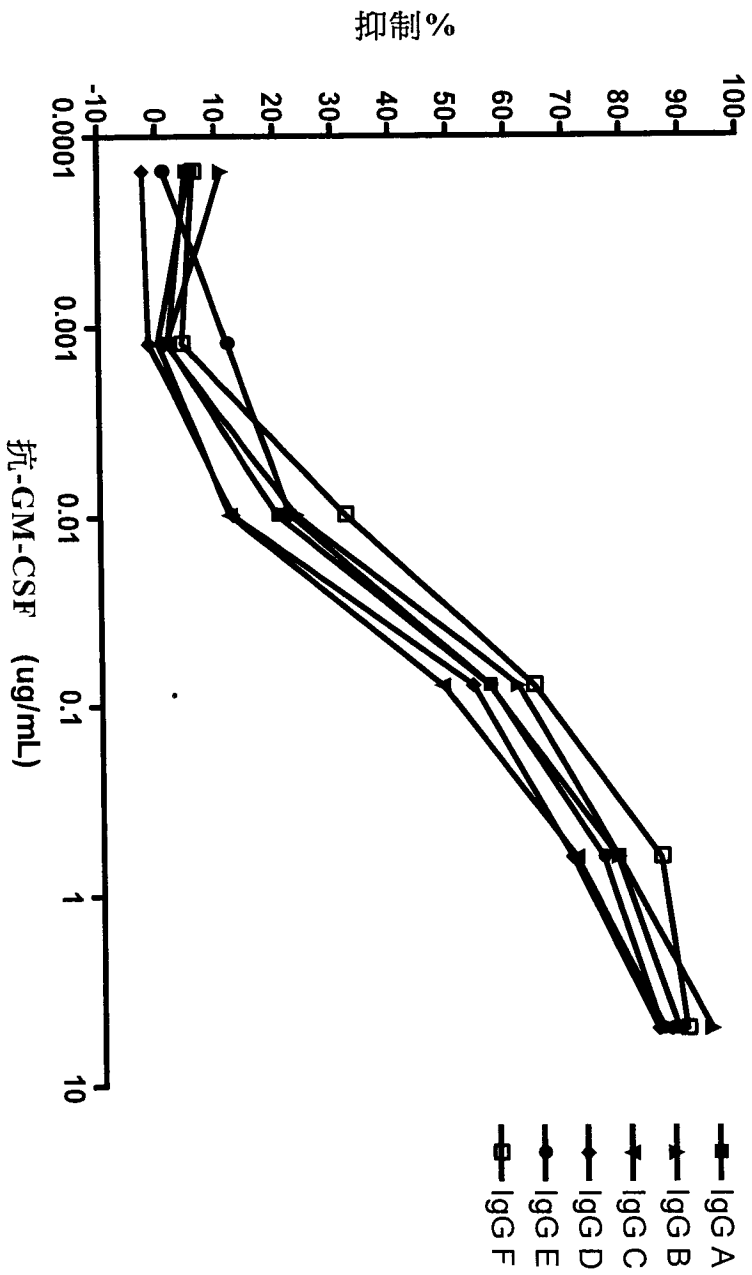
第 6a 圖



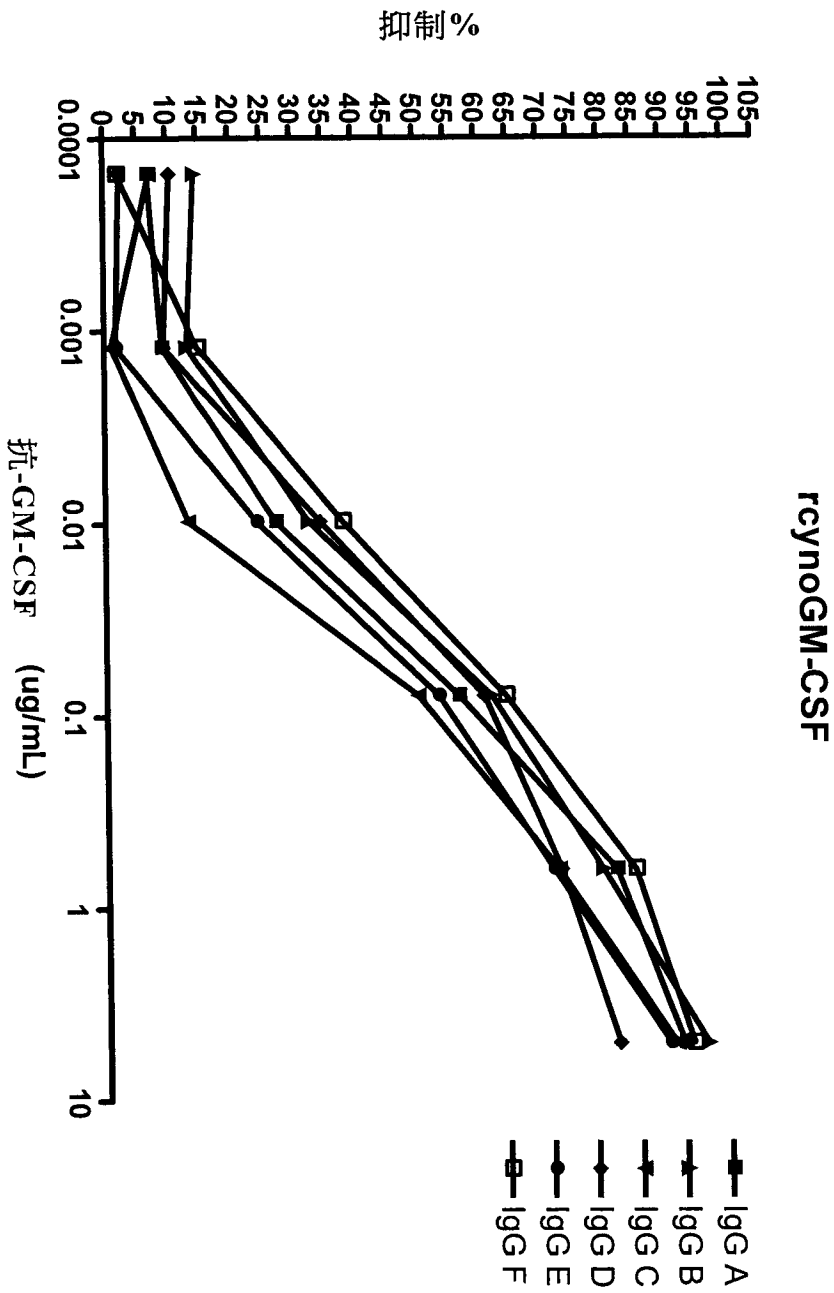
第 6b 圖

第 6c 圖

A431 細胞衍生之 nhGM-CSF

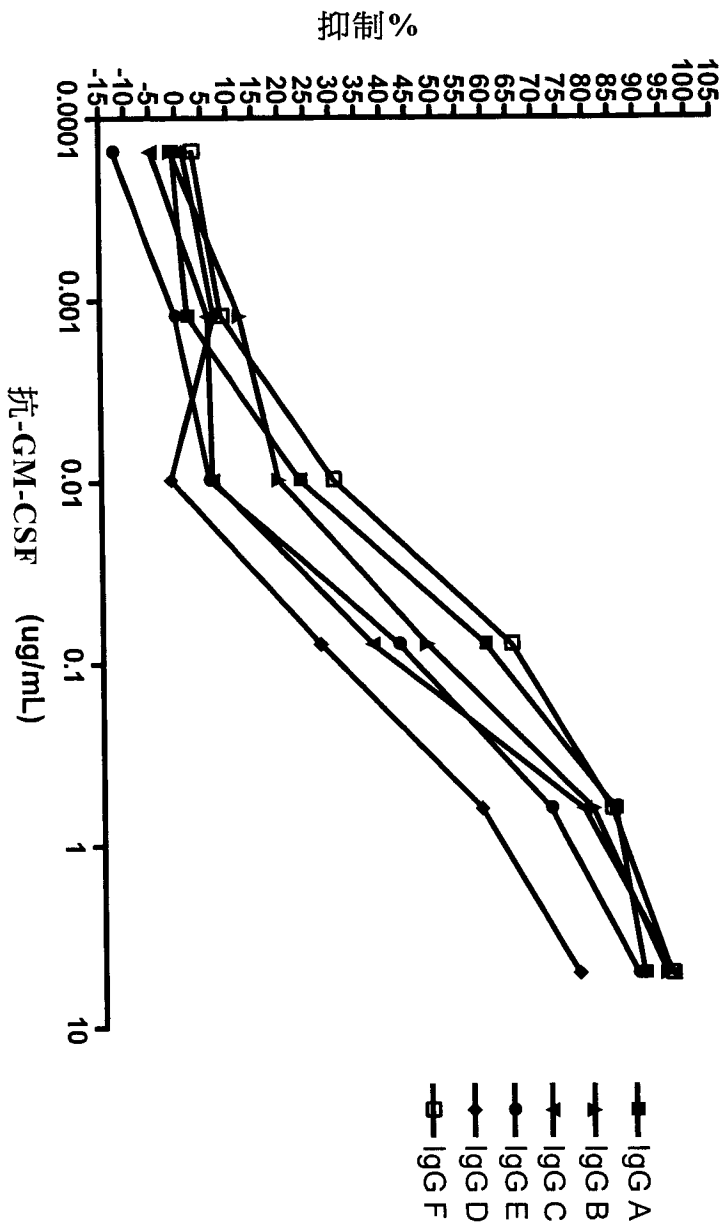


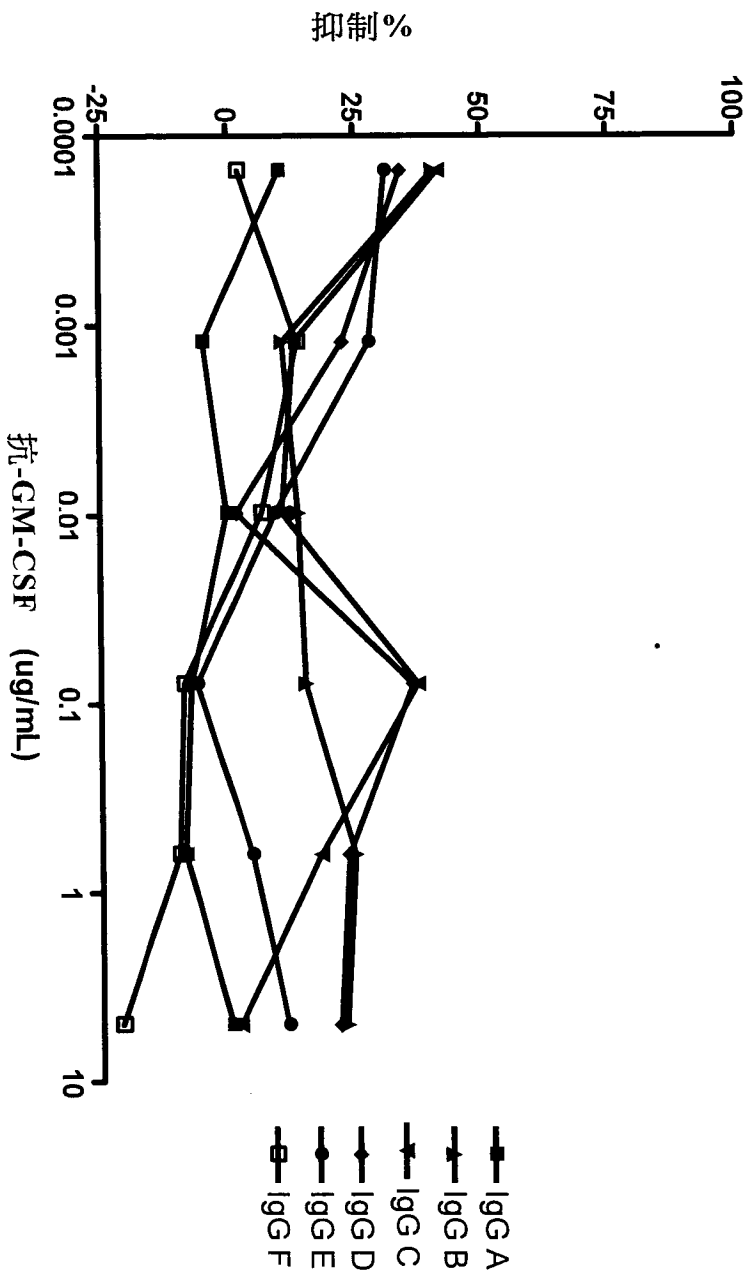
第 6d 圖



第 6e 圖

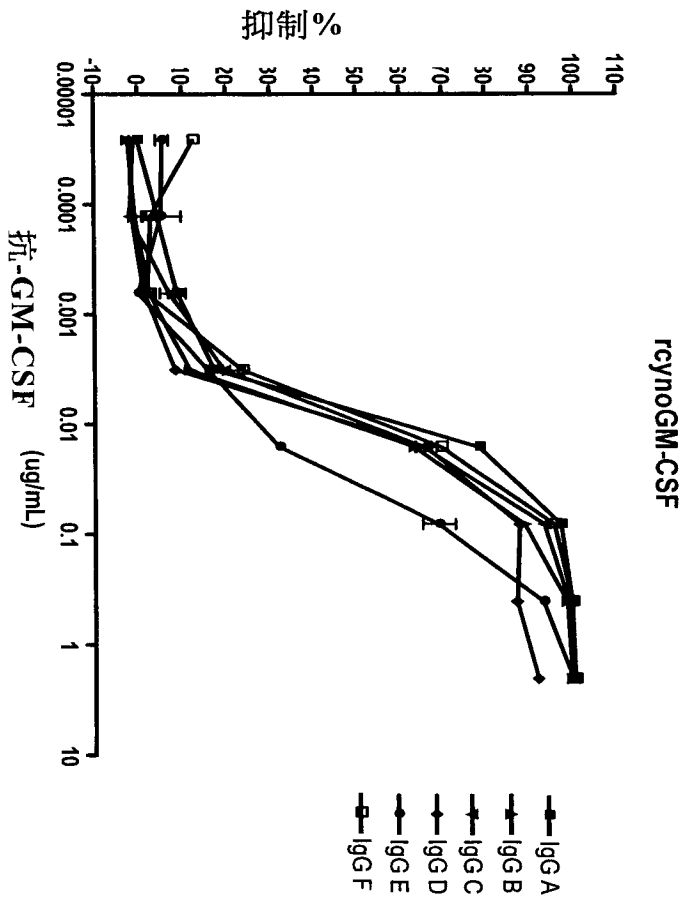
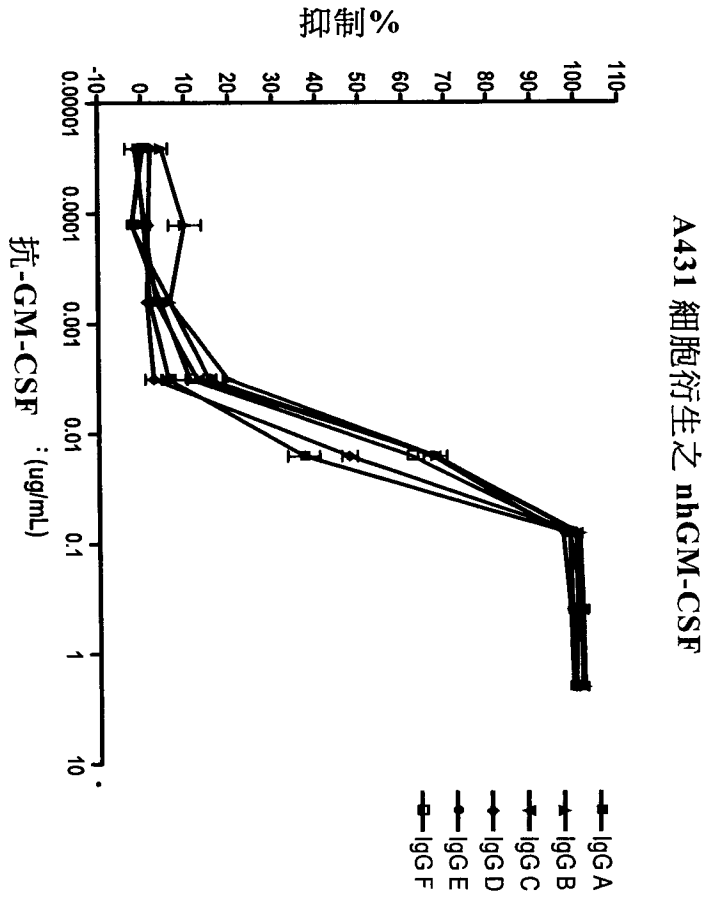
PBMC 衍生之 nhGM-CSF



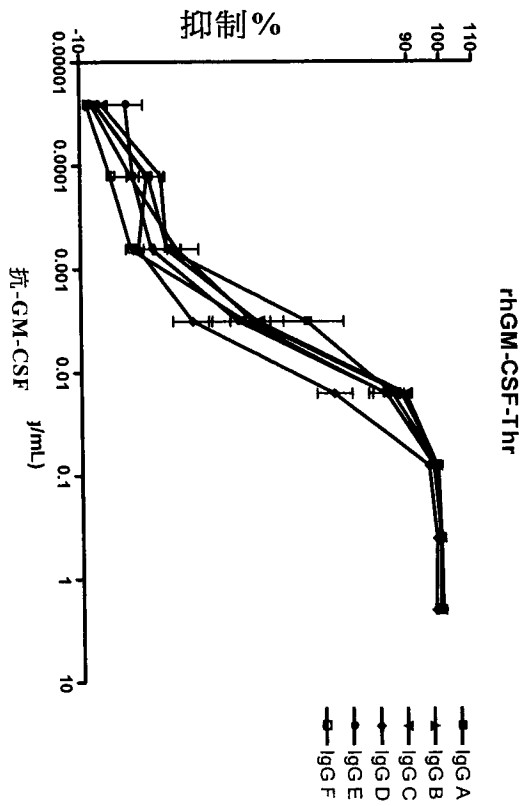
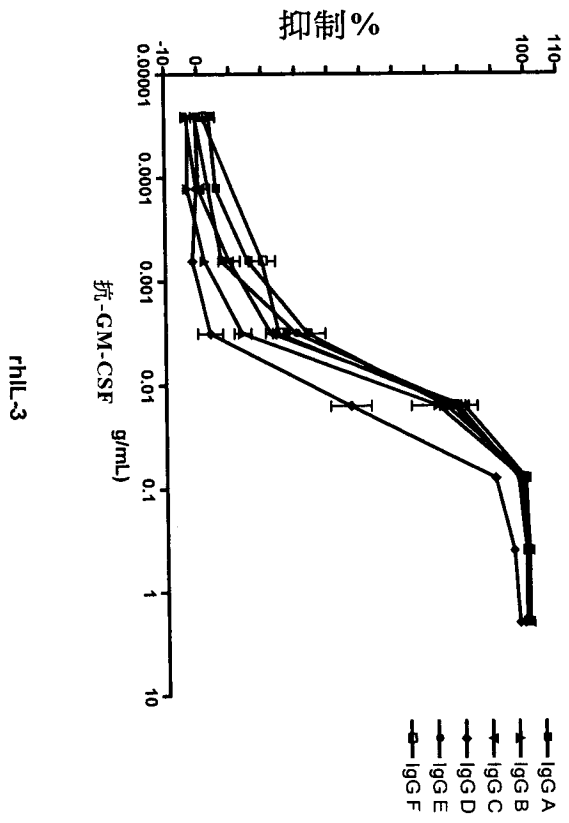
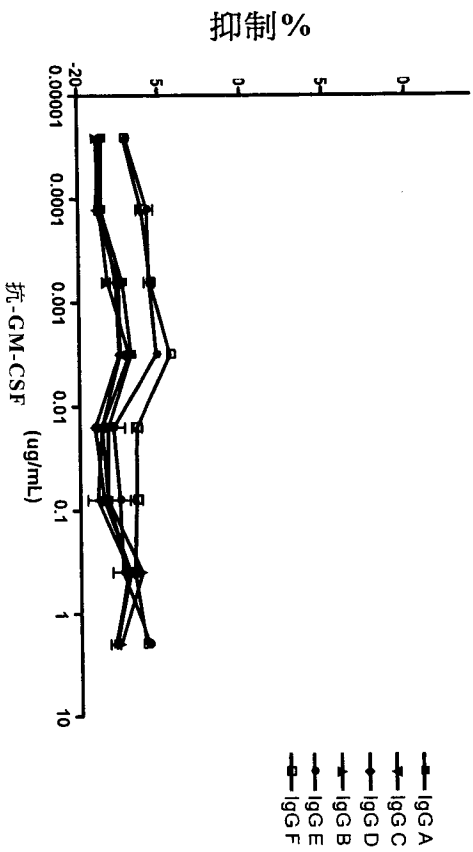


第 6f 圖

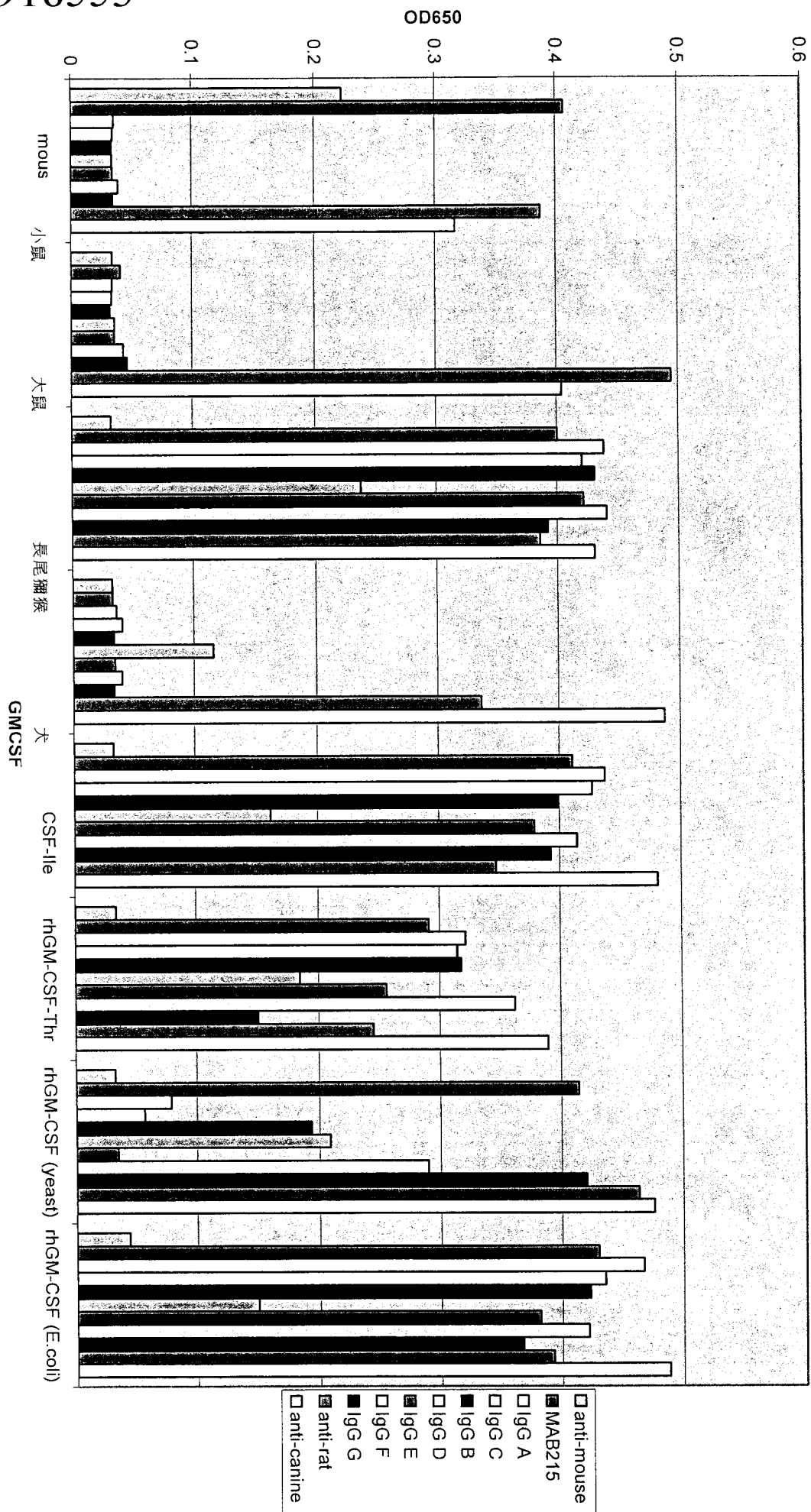
第 7a 圖





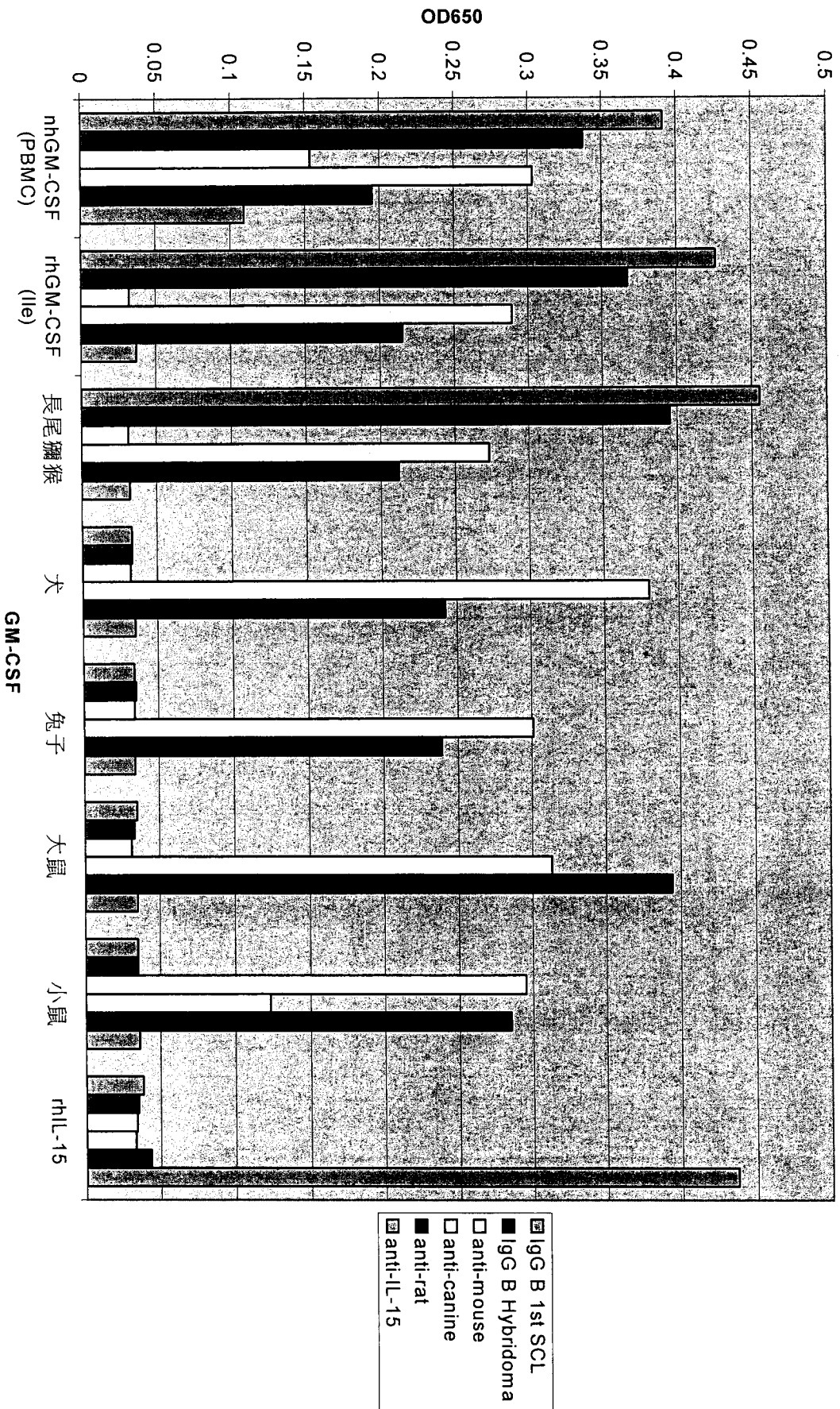


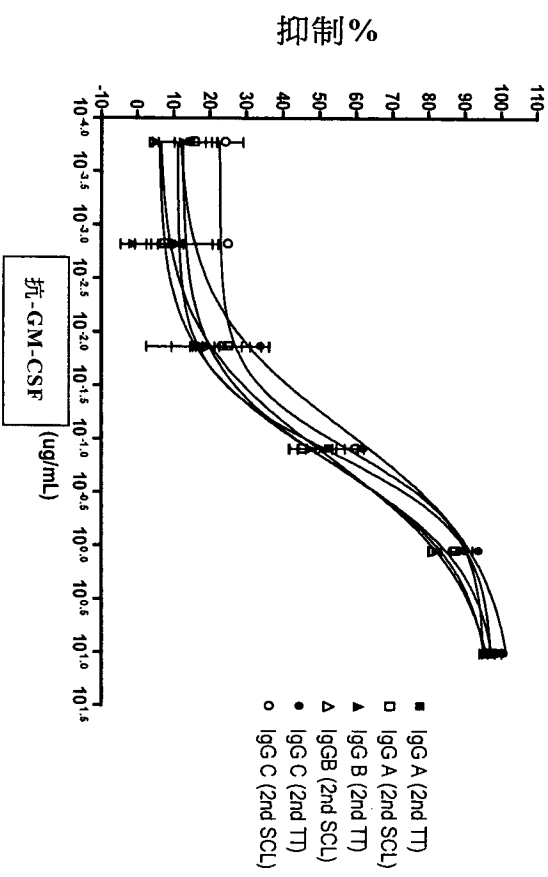
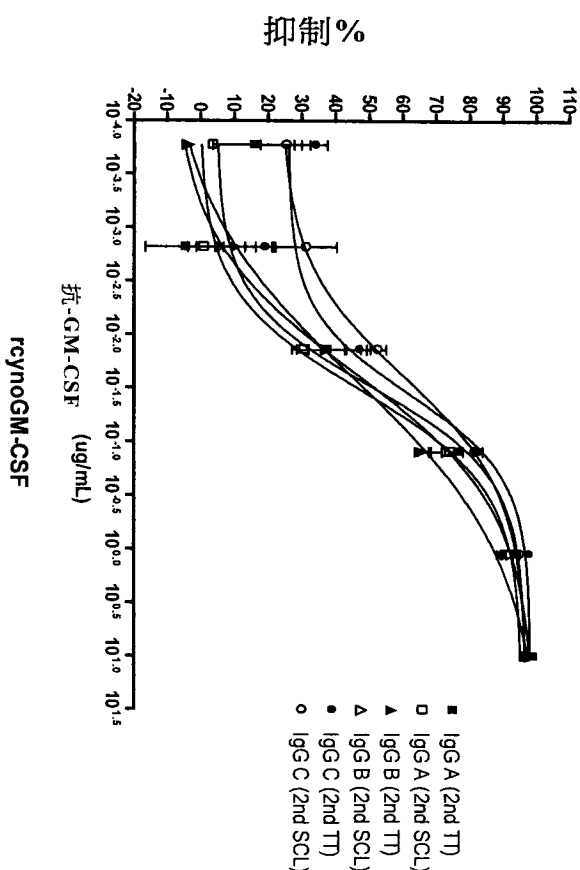
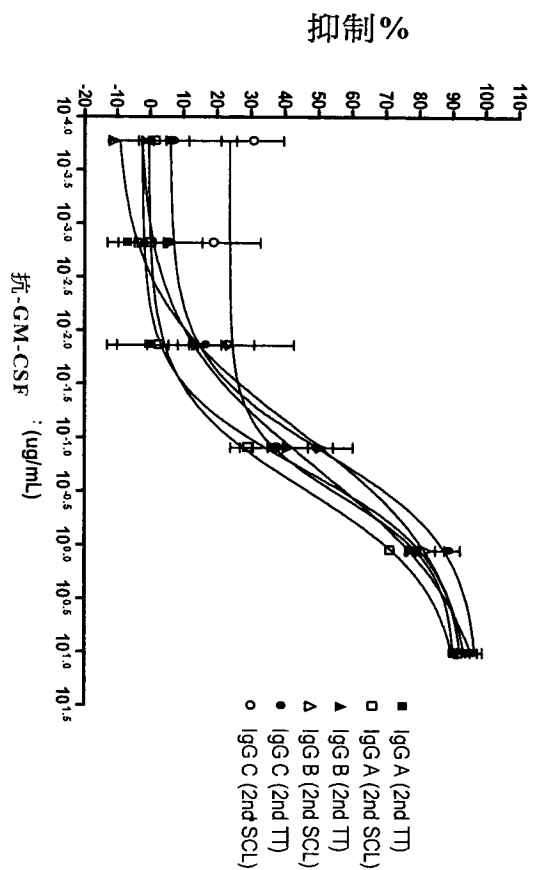
第 7b 圖



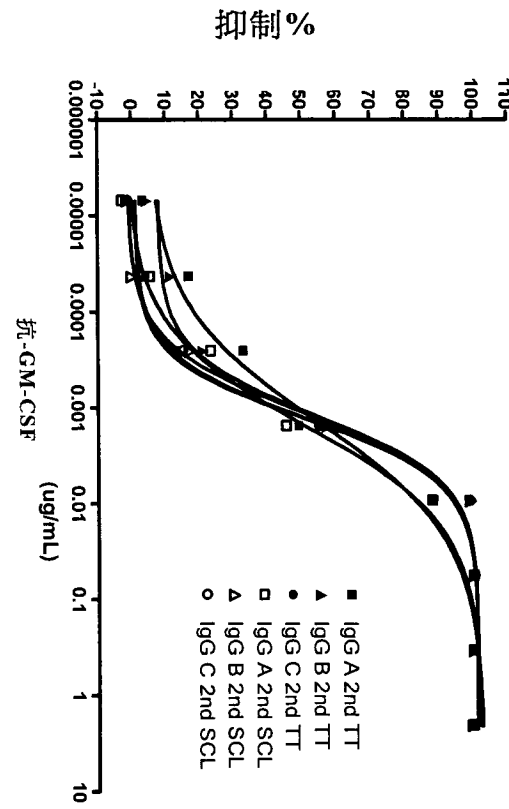
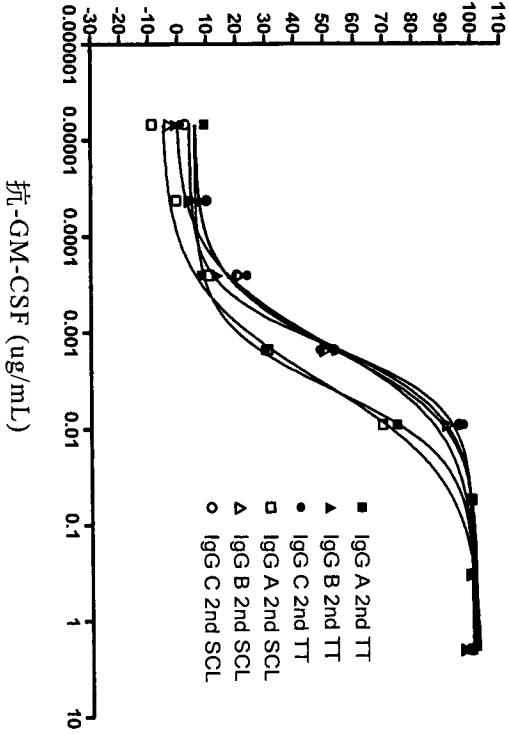
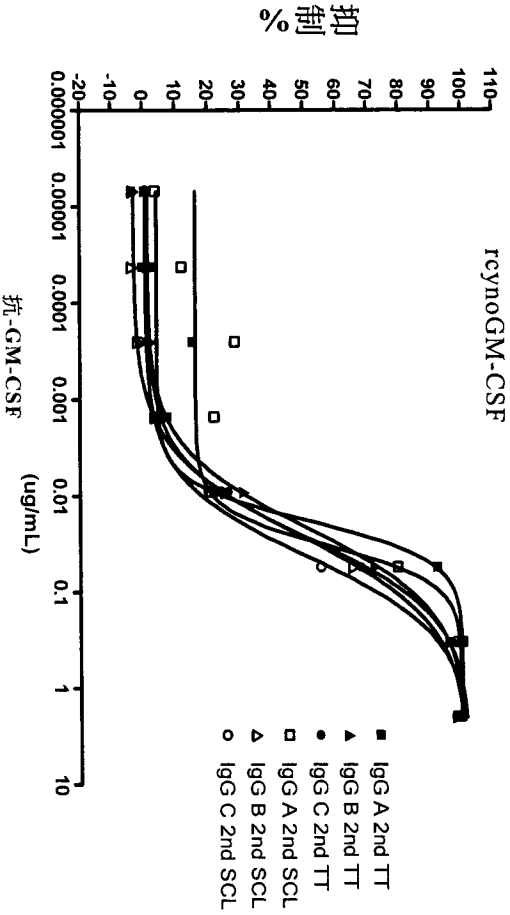
第 8a 圖

第 8b 圖





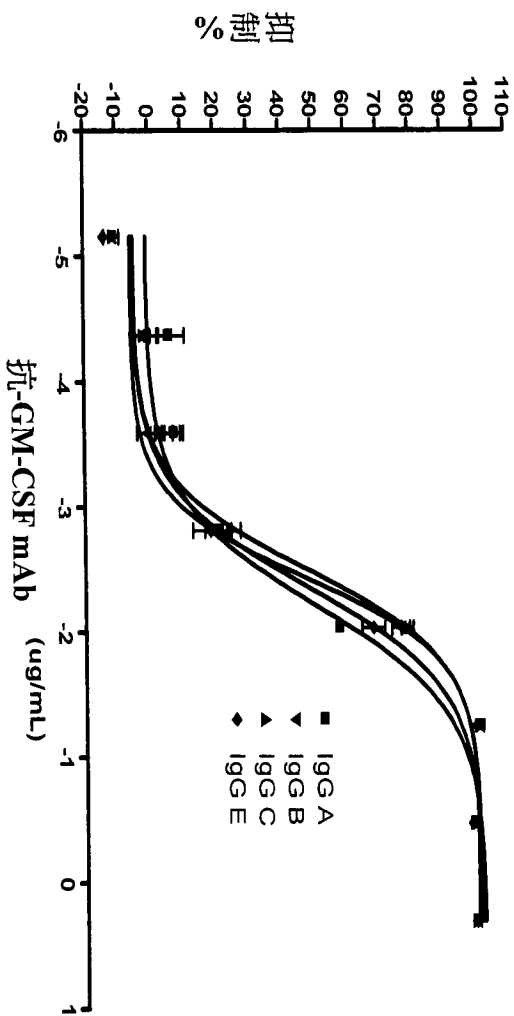
第 9 圖



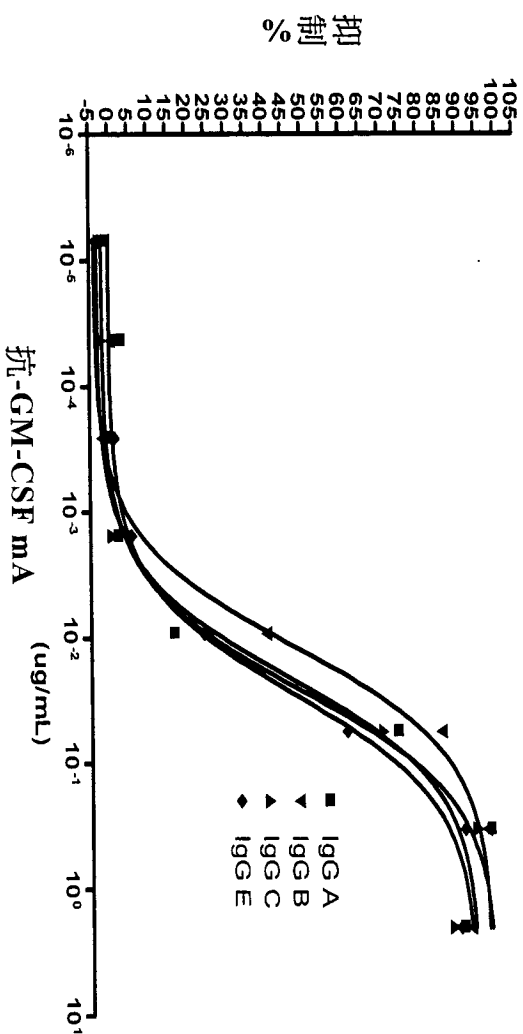
第 10 圖

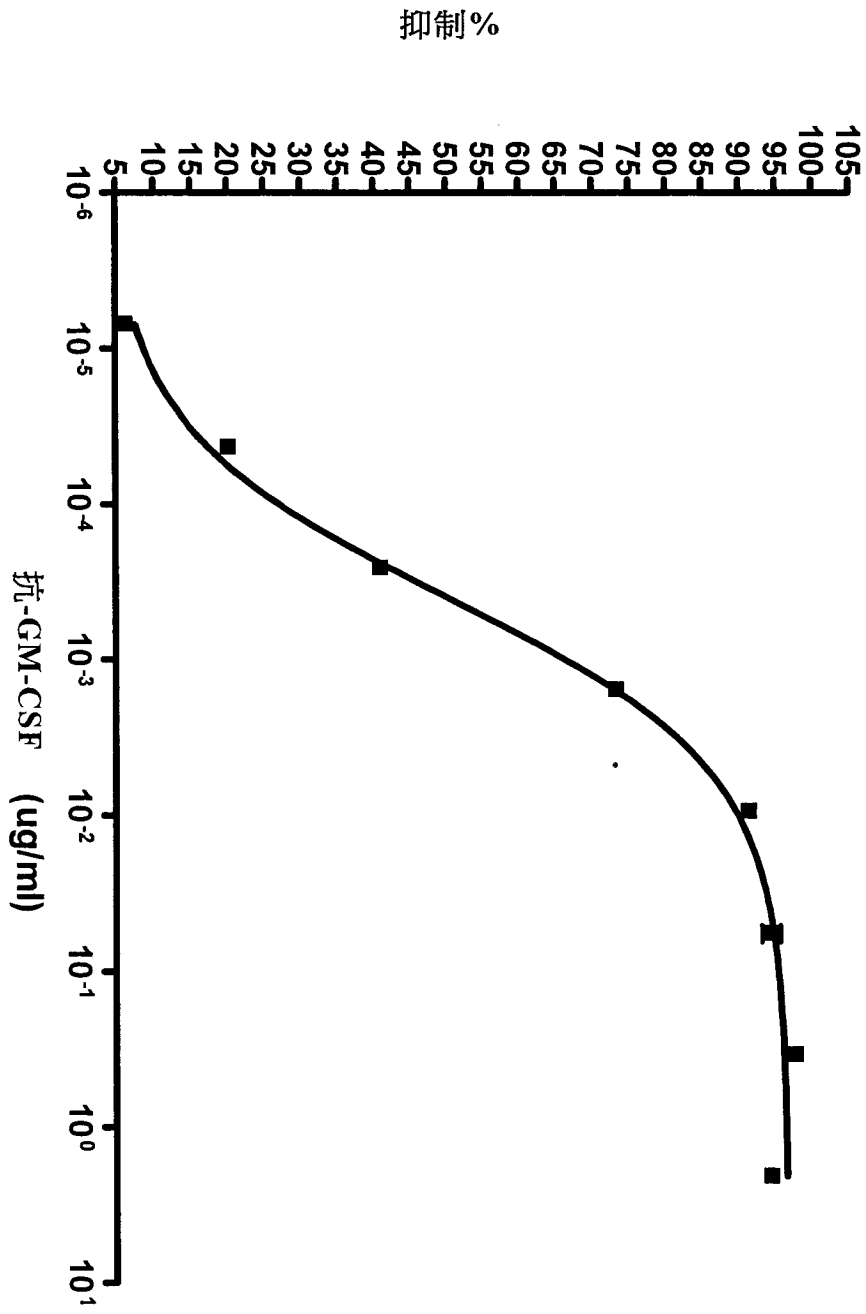
第 11 圖

SAEC 衍生之 nhGM-CSF (上清液)

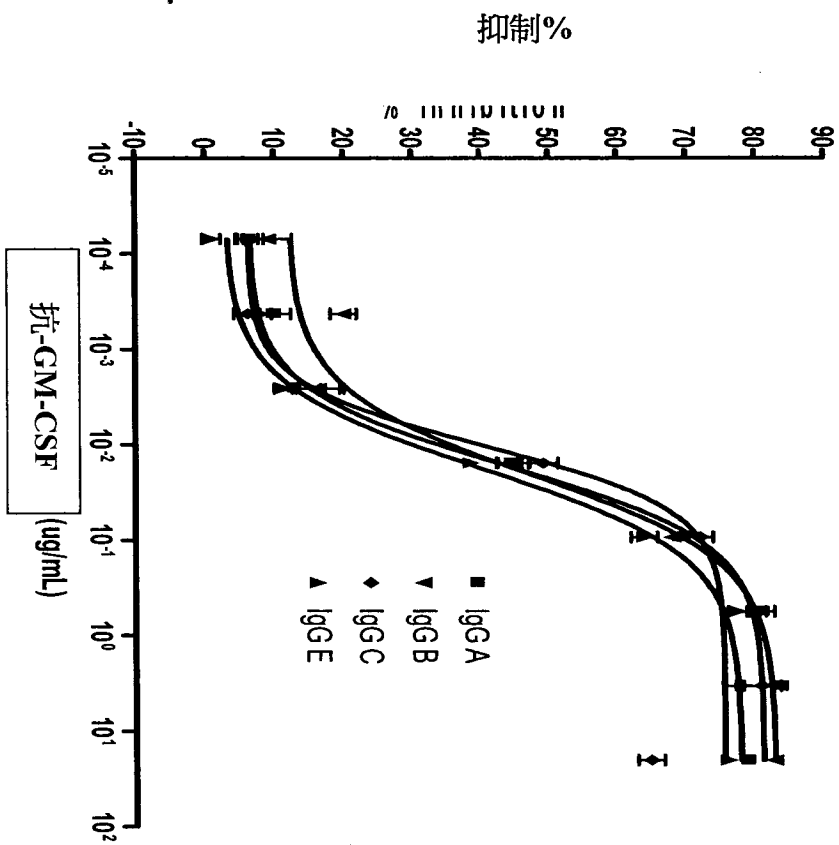
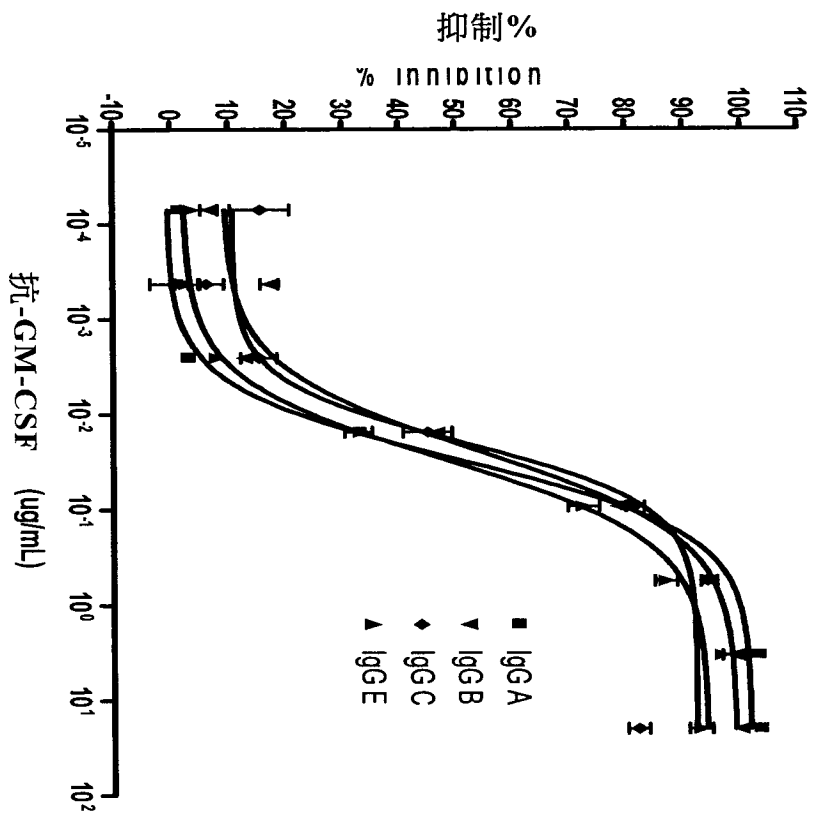


肺組織衍生之 ncynoGM-CSF (上清液)



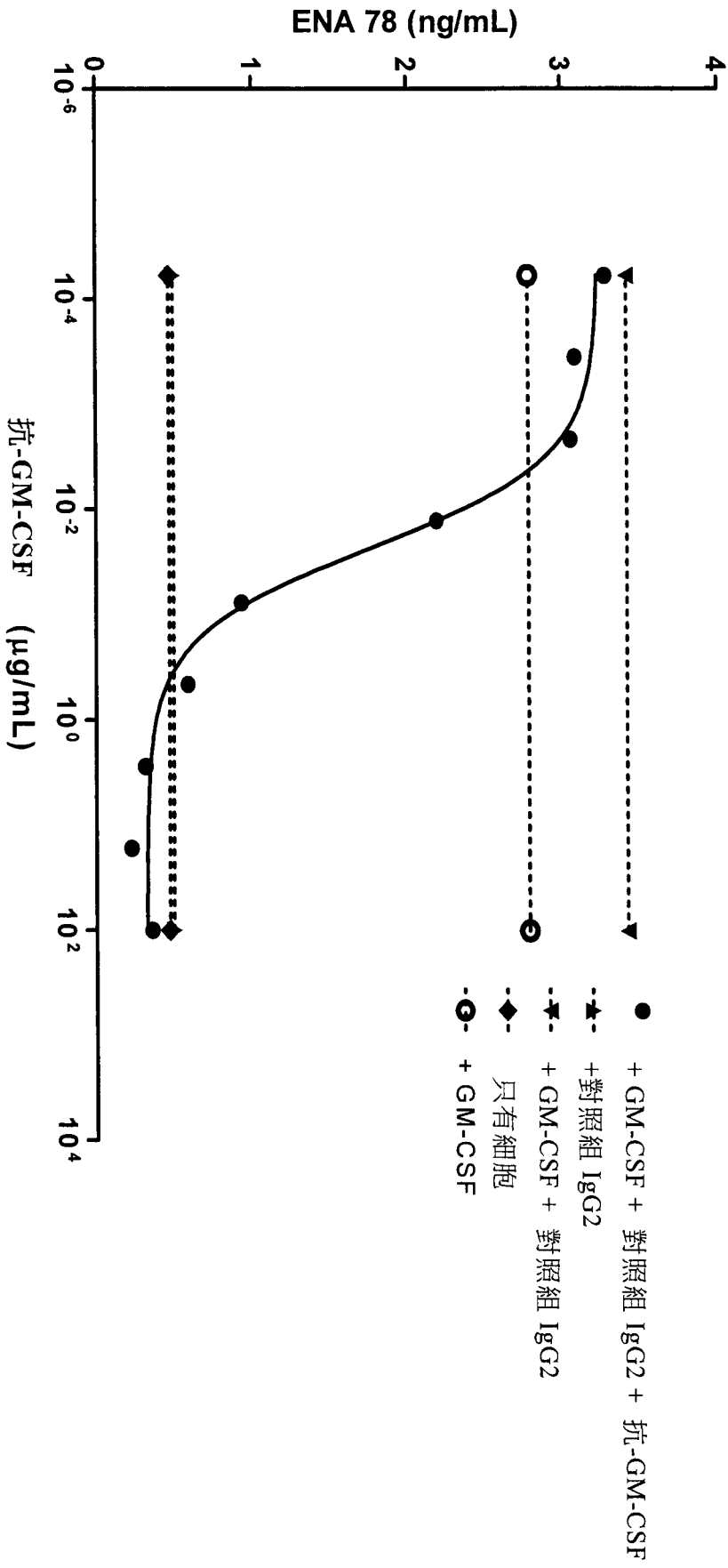


第 12 圖



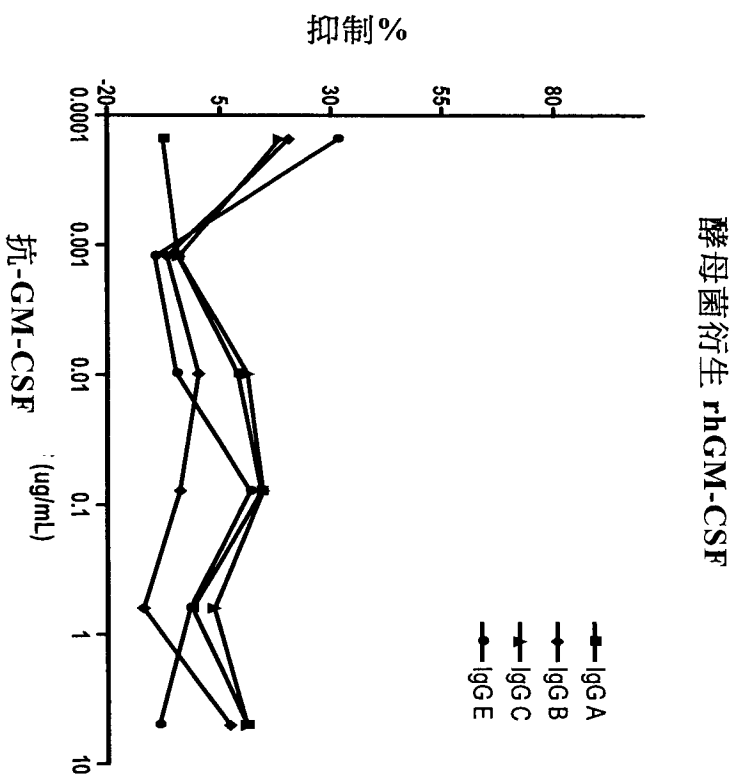
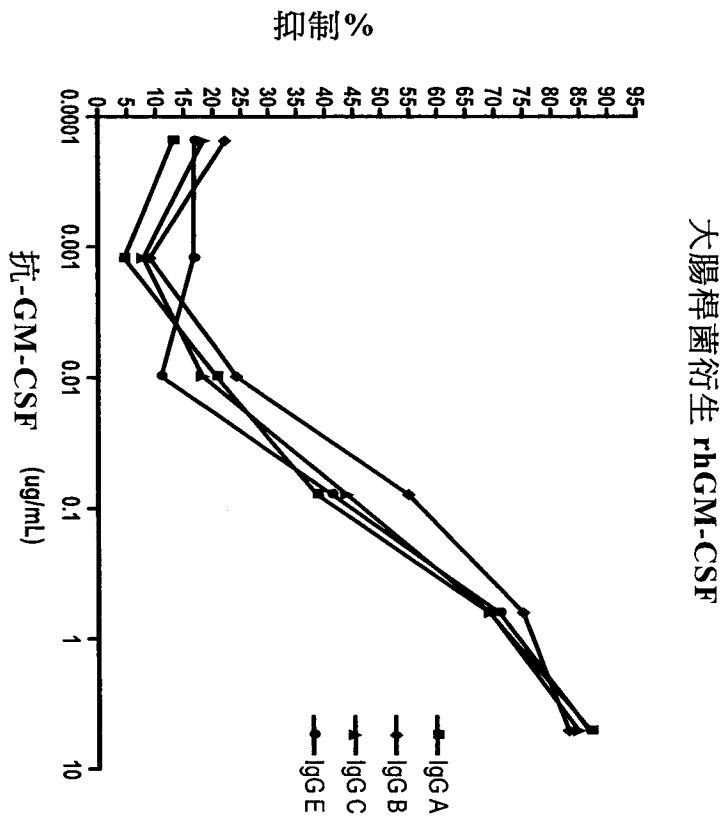
第 13 圖



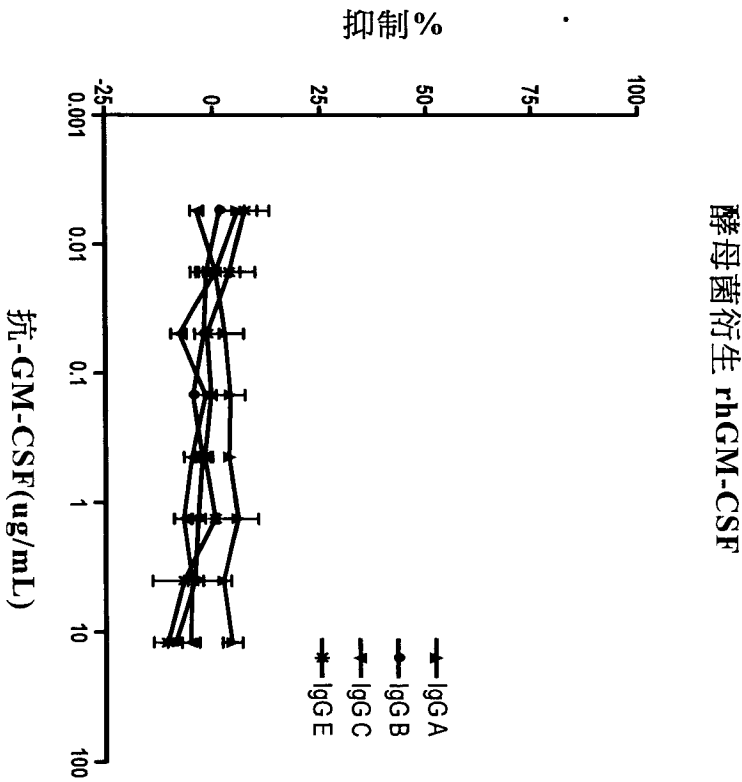
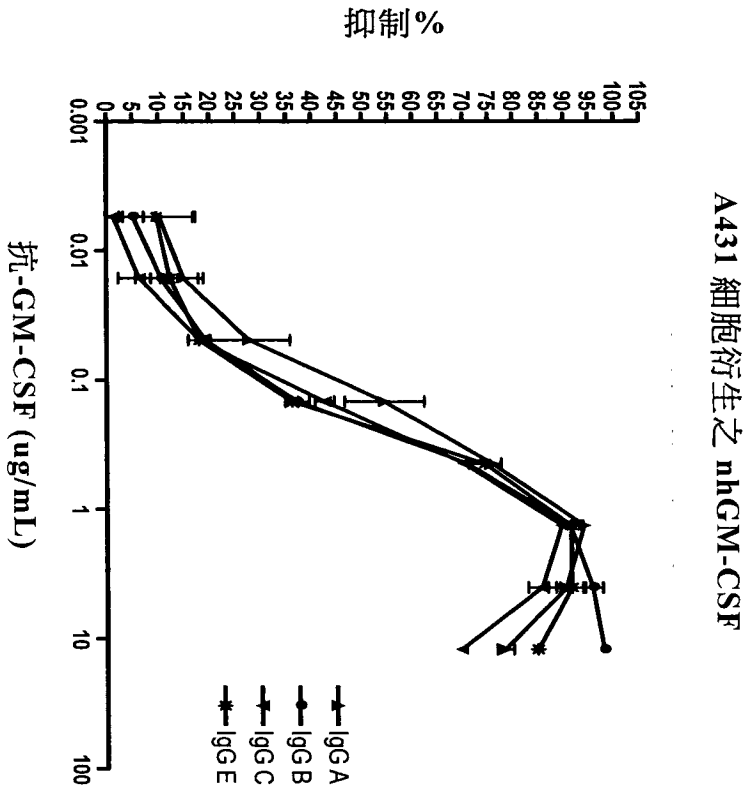


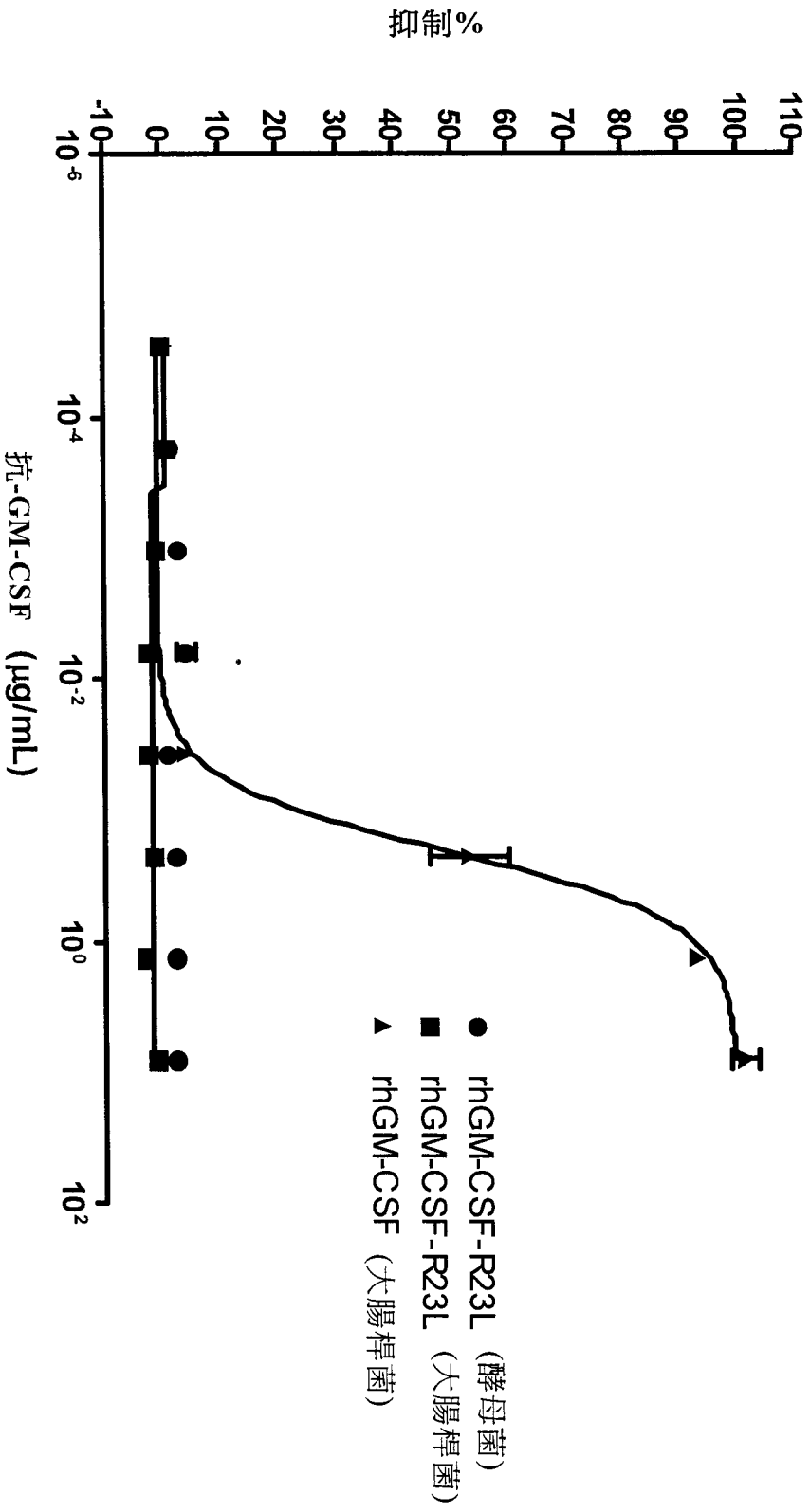
第 14 圖

第 15a 圖



第 15b 圖





第 16 圖

## 序列表

<110> 賈桂琳 A. 柯克納 (KIRCHNER, Jacqueline A)  
肯尼士 A. 布萊瑟 (BRASEL, Kenneth A)  
卡拉奧爾森 (OLSON, Kara)  
約瑟卡洛斯艾斯寇巴 (ESCOBAR, Jose Carlos)  
多芙尼包羅尼 (BARONE, Dauphine)

<120> 人類 GM-CSF 抗原結合蛋白質

<130> A-1292-US-PSP2

<140> 097134377

<141> 2008-09-08

<160> 147

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 輕鏈

<400> 1

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala  
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Ile Leu Tyr Ser Ser Ser Asn Glu Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln  
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Val Phe Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
115 120 125

Arg Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

<210> 2  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 2  
 atggtgctgc agaccaggt gtttattagc ctgctgctgt ggattagcgg cgcgtatggc 60  
 gacatcgtgc tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120  
 atcaactgca agtccagcca gagtatttta tacagctcca gcaatgagaa cttcttaact 180  
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggy 240  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 300  
 atcagcagcc tgcagcctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagtggt 360  
 tttcggacgt tcggccaagg gaccagggtg gaaatcaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420  
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480  
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540  
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600  
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660  
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720

200918553

<210> 3  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 可變功能部位

<400> 3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Ser Asn Glu Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Phe Ser Val Phe Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 4  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Ser Asn Glu Asn Phe Leu  
1 5 10 15

Thr

200918553

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 6

Gln Gln Tyr Phe Ser Val Phe Arg Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 465  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Ser Ala  
65 70 75 80

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



85

90

95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys  
 225 230 235 240

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val  
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu  
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 450 455 460

Lys  
 465

- <210> 8
- <211> 1395
- <212> DNA
- <213> 人造

- <220>
- <223> 重鏈

<400> 8  
 atggattgga cctggcgtat tctgtttctg gtggcggcgg cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatac actgggtgcg acaggcccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactctgca 240  
 cagaagtttc ggggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgcg agaggggtgga 360  
 tacagctatg gttactttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagct 420

agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcgccttgct ccaggagcac ctccgagagc 480  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttccagca acttcggcac ccagacctac 660  
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720  
 tgttggtgct agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780  
 ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt cacgtgcgtg 840  
 gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtcacgttca actggtacgt ggacggcgtg 900  
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960  
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 1020  
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080  
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140  
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200  
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260  
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320  
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagectctcc 1380  
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 9  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 9

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Ser Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

200918553

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 10

Gly Tyr Tyr Ile His  
1 5

<210> 11  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 11

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Ser Ala Gln Lys Phe Arg  
1 5 10 15

Gly

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 12

Glu Gly Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

200918553

<210> 13  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 13

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 14  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 14  
 atggaaaccc cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgcogga taccaccggc 60  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga cagagccacc 120  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcagctact ttgcctggta ccagcagaaa 180  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatttat ggtgcatcca gtagggccac tggcatccca 240  
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttactc tcaccatcag cagactggag 300  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata ggtcacctcg gacgttcggc 360  
 caagggacca agtggaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660  
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

<210> 15  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 15

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

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

Tyr Phe 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 Asp Arg Ser Pro  
85 90 95

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

<210> 16  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Phe Ala  
1 5 10

<210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 17

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 18

Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Pro Arg Thr

200918553

1

5

<210> 19  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 19

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Trp Leu Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly  
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190



Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 225 230 235 240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350

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

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430

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

435

440

445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 20  
 <211> 1389  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 重鏈

<400> 20  
 atggattgga cctggcgat tctgtttctg gtggcggcgg cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgtaagtctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggccoct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240  
 cagaagttta agggcagggc caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag agataagtg 360  
 ctggacggct ttgactactg gggccagga accctggcga ccgtctctc agctagcacc 420  
 aagggcccat cggctctccc cctggcgccc tgcctcagga gcacctccga gagcacagcg 480  
 gccctgggct gcctggcctc ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacacctc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac 600  
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660  
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagctct cctcttcccc 780  
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840  
 gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggc acgtggacgg cgtggaggtg 900  
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
 gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaggg gcagccccga 1080  
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260  
 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380

ccgggtaaa

1389

<210> 21  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 22  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR1

<400> 22

Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 23

200918553

<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 23

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

Gly

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

<220>  
<223> CDR3

<400> 24

Asp Lys Trp Leu Asp Gly Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 25  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 25

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val  
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 26  
<211> 705  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 26  
atggaaaccc cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tcgcctggta ccaacagaaa 180  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 240  
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccgtcag cagactggag 300  
cctgaggatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata ggtcacctcg gacgttcggc 360

caagggacca aggtggaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccc 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 600  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgccaagt cacccatcag 660  
 ggccctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

<210> 27  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 27

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

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

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

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

<210> 28  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa 是 Tyr 或 Ser

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa 是 Gln 或 Arg

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa 是 Lys 或 Arg

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa 是 Lys, Arg 或 Gln

<400> 28

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Xaa Ala Xaa Xaa Phe Xaa  
 1                   5                   10                   15

Gly

<210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR2

<400> 29

Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr  
 1                   5

<210> 30  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

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

<220>

200918553

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa 是 Val, Ile 或 Leu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa 是 Ser 或 Asn

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa 是 Ser, Thr 或 Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11)..(11)  
<223> Xaa 是 Phe 或 Leu

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Ala  
1 5 10

<210> 31  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> 人造序列

<220>  
<223> 重鏈

<400> 31

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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



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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
 115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 225 230 235 240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

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



ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac 600  
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 660  
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780  
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctcg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840  
 gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900  
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
 gtctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260  
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380  
 ccgggtaaa 1389

<210> 33  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 33

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

200918553

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

Ala Arg Asp Arg Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 34  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 共有序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa 是Ala 或 Thr

<400> 34

Gly Xaa Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 35  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 35

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

Gly

<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 36

Asp Arg Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5

<210> 37  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 37

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr  
35 40 45

Ile Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
50 55 60

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

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

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 38  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 38  
 atggaaacct cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
 ctctcctgca gggccagtca gtatattagc aacacctatt tagcctgggt ccagcagaaa 180  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcagcca ccagggccac tggcatcca 240  
 gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactt tcaccatcag cagactggag 300  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 360  
 caagggacca cggtggaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgogaagt cacccatcag 660  
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

<210> 39  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 39

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 Tyr Ile Ser Asn Thr  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe 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

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

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR1

<400> 40

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

<210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR2

<400> 41

Gly Ala Ala Thr Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR3

200918553

<400> 42

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 43

<211> 463

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 重鏈

<400> 43

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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

Gln Arg Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser  
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Tyr Asp Trp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175



Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 225 230 235 240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350

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

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 405 410 415

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

420

425

430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 44  
 <211> 1389  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 重鏈

<400> 44  
 atggattgga cctggcgtat tctgtttctg gtggcgggcg cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcagttgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240  
 cagaggtttc ggggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gaactgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agccccgtat 360  
 gactggacct ttgactactg gggccagga accctgggtca ccgtctctc agctagcacc 420  
 aagggcccat cgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480  
 gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacacctc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660  
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
 gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780  
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 840  
 gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900  
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
 gtctcaccg ttgtcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260

200918553

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380  
ccgggtaaa 1389

<210> 45  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 可變功能部位

<400> 45

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

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

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

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

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Pro Tyr Asp Trp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 46  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 共有序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa 是 Tyr 或 Ser

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa 是 Phe, Gly 或 Ala

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa 是 Ser, Thr 或 Trp

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa 是 Val, Ser 或 Phe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa 是 Phe 或 Pro

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa 是 Arg, Trp, 或 Ile

<400> 46

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr  
 1 5

<210> 47  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR2

<400> 47

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Arg  
 1 5 10 15

Gly

<210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR3

&lt;400&gt; 48

Ala Pro Tyr Asp Trp Thr Phe Asp Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人造

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 輕鏈

&lt;400&gt; 49

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 50  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 50  
 atggaaaccc cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
 gaagttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
 ctctcctgca gggccagtca gagcgtttgc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
 cctgaccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcgtcca gcagggccac tggcatccca 240  
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagcctggag 300  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata ggtcacctcg gacgttcggc 360  
 caagggacca aggtggagat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc 540  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 600  
 acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660  
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

<210> 51  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 51

Glu Val 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 Cys Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Ser 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 Ser Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

<210> 52  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR1

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Val Cys Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 144  
 <212> PRT  
 <213> 長尾獼猴(Macaca fascicularis)

<400> 53

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

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His  
 20 25 30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp  
 35 40 45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe  
50 55 60

Asp Leu Gln Glu Pro Ser Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys  
65 70 75 80

Gln Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met  
85 90 95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser  
100 105 110

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys  
115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu  
130 135 140

<210> 54

<211> 144

<212> PRT

<213> 犬(Canis familiaris)

<400> 54

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

Ser Ala Pro Thr Arg Ser Pro Thr Leu Val Thr Arg Pro Ser Gln His  
20 25 30

Val Asp Ala Ile Gln Glu Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Asn Asp  
35 40 45

Val Thr Ala Val Met Asn Lys Ala Val Lys Val Val Ser Glu Val Phe  
50 55 60

Asp Pro Glu Gly Pro Thr Cys Leu Glu Thr Arg Leu Gln Leu Tyr Lys  
65 70 75 80

Glu Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Ser Leu Lys Asn Pro Leu Thr Met  
85 90 95

Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Ser Pro  
100 105 110

Cys Ala Thr Gln Asn Ile Asn Phe Lys Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys  
115 120 125



Asp Phe Leu Phe Asn Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys  
 130 135 140

<210> 55  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 重鏈

<400> 55

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Arg Asn Tyr Ala  
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Trp Leu Asp Ala Phe Glu Ile Trp Gly  
 115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 56  
 <211> 1389  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 重鏈

<400> 56  
 atggattgga cctggcgtat tctgtttctg gtggcggcgg cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatac actgggtgcg acaggcccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcag aaactatgca 240  
 cagaagtttc agggcagggg caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaccggtgg 360  
 ctggatgctt ttgagatctg gggccaaggg acaatgggtca ccgtctcttc agctagcacc 420  
 aagggcccat cgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480  
 gccctgggct gctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540  
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcttc aggactctac 600  
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 660  
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
 gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780  
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840  
 gacgtgagcc acgaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 900  
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
 gtctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
 gaaccacagg tgtacacct gcccccattc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggtccttc 1260

200918553

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
tgctcogtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380  
ccgggtaaa 1389

<210> 57  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 可變功能部位

<400> 57

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Arg Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 58  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 58

Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Ile Val Val Tyr Ser Leu  
1 5 10 15

Ser Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His

20

25

30

Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp Met Pro Val  
 35 40 45

Thr Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Ile Asp Ser Leu  
 50 55 60

Lys Thr Phe Leu Thr Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln  
 65 70 75 80

Lys

<210> 59  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR2

<400> 59

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

Gly

<210> 60  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR3

<400> 60

Asp Arg Trp Leu Asp Ala Phe Glu Ile  
 1 5

<210> 61  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 61

Met Ala Trp Ala Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly  
 1 5 10 15

Ser Trp Ala Asn Phe Met Leu Ala Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser  
 20 25 30

Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Ile Arg Thr Ser Gly Ser Ile  
 35 40 45

Ala Ser Asn Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro  
 50 55 60

Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80

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

Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser  
 100 105 110

Cys Asp Ile Ser Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
 115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
 145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
 165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
 180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
 195 200 205

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
 210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230 235

# 200918553

<210> 62  
<211> 705  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 62  
atggcgtggg cgccgctgct gctgaccctg ctggcgatt gcaccggcag ctgggcgaat 60  
tttatgctgg ctacagccca ctctgtgtcg gactctccgg ggaagacggt aaccatctcc 120  
tgtattcgca ccagtggcag cattgccagc aactatgtac agtggatca gcagcggccg 180  
ggcagttccc ccaccactgt gatctatgag gatgacaaa gaccctctgg ggtccctgat 240  
cgattctctg gctccatcga cagctcctcc aattctgcct cctcaccat ctctggactg 300  
aagactgagg acgaggctga ctactactgt cagtcttctg atatcagcaa tgtggatttc 360  
ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggc caaccgaaag cggcgcctc ggtcactctg 420  
ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactgggtgtg tctcataagt 480  
gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540  
ggagtggaga ccaccacacc ctccaaaca agcaacaaca agtacgggc cagcagctat 600  
ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 660  
gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca 705

<210> 63  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 可變功能部位

<400> 63

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

200918553

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Cys Asp Ile  
85 90 95

Ser Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 64  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 64

Ile Arg Thr Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
1 5 10

<210> 65  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 65

Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 66  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 66

Gln Ser Cys Asp Ile Ser Asn Val Val  
1 5

<210> 67  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>



200918553

<223> 重鏈

<400> 67

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala  
65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser  
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys



# 200918553

<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 68  
atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcggcgc cgaccggcgc gcatagccag 60  
gttcagctgg tgcagtctgg agctgagggtg aagcagcctg ggcctcagt gaaggtctcc 120  
tgcgaggctt ctggttacac cttcaccagc tatggtatca gctgggtgcg acagggccct 180  
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgcttaca atggtaacac agactatgca 240  
cagaagctcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcgc agcctacatg 300  
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag acaacgggat 360  
tactacagta tggacgtctg gggccaaggg accacgggtca ccgtctctc agctagcacc 420  
aagggcccat cggctctccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480  
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660  
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780  
ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840  
gacgtgagcc acgaagacc cagaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900  
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
aacaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260  
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380  
ccgggtaaa 1389

<210> 69  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人造

200918553

<220>

<223> 可變功能部位

<400> 69

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Leu  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Ala Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> CDR1

<400> 70

Ser Tyr Gly Ile Ser  
1 5

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> CDR2

<400> 71

200918553

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Leu Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 72

Gln Arg Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val  
1 5

<210> 73  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 73

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val  
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr  
100 105 110

Asp Arg Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115	120	125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 130	135	140
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 145	150	155
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 165	170	175
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 180	185	190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 195	200	205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 210	215	220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225	230	235

<210> 74  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 74  
 atggaaacct cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
 cctggccagg ttcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatcca 240  
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccgtcag cagactggag 300  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtctc cagtatgata ggacacctcg gacgttcggc 360  
 caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgogaagt cacccatcag 660

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt

705

<210> 75  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 75

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 Val Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

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

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

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

<210> 76  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Rattus rattus

<400> 76

Ala Pro Thr Arg Ser Pro Asn Pro Val Thr Arg Pro Trp Lys His Val  
 1 5 10 15

Asp Ala Ile Lys Glu Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asp Met Arg Ala Leu  
 20 25 30

Glu Asn Glu Lys Asn Glu Asp Val Asp Ile Ile Ser Asn Glu Phe Ser  
 35 40 45

200918553

Ile Gln Arg Pro Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Leu Tyr Lys Gln  
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Asn Leu Thr Lys Leu Asn Gly Ala Leu Thr Met Ile  
65 70 75 80

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

Glu Ile Glu Val Thr Thr Phe Glu Asp Phe Ile Lys Asn Leu Lys Gly  
100 105 110

Phe Leu Phe Asp Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Gln Lys  
115 120 125

<210> 77  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 77

Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 78

Leu Gln Tyr Asp Arg Ser Pro Arg Thr  
1 5

<210> 79  
<211> 462  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 79

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



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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val  
225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe  
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
260 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
275 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val  
305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp  
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 80  
<211> 1386  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

# 200918553

<400> 80  
 atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcggcgc cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240  
 cagaagtffc agggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gagctgagct ggctgagatc tgacgacacg gccgtatatt actgtgcgag agaccgggtg 360  
 ctggatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatgggtca cgttctctgc tagcaccaag 420  
 ggcccatcgg tcttccccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480  
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 540  
 gctctgacca gcggcgtgca caccttccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
 ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 660  
 gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgtttgtgtc 720  
 gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780  
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 840  
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat 900  
 aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960  
 ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020  
 aaaggcctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaaggga gccccgagaa 1080  
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140  
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200  
 cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260  
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320  
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380  
 ggtaaa 1386

<210> 81  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 81

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



Met Ala Ser His Tyr Lys Gln Asn Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser  
 100 105 110

Cys Glu Thr Glu Phe Ile Thr Phe Lys Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys  
 115 120 125

Cys Phe Leu Phe Val Ile Pro Phe Asn Cys Trp Glu Pro Val Gln Lys  
 130 135 140

<210> 83  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa 是 Glu 或無胺基酸殘基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa 是 Gly 或無胺基酸殘基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa 是 Pro, Asp 或 Gly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa 是 Tyr, Trp, Arg 或 Lys

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa 是 Ser, Trp, Phe 或 Thr

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

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)

<223> Xaa 是 Tyr 或無胺基酸殘基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa iis Met, Thr 或 Val

<400> 83

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa  
1 5 10

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 共有序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是 Gln 或 Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 是 Gln 或 Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 是 Thr 或 Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 是 Asp, Gly 或 Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa 是 Arg, Thr 或 Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa 是 Ser 或 Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa 是 Phe 或 Pro

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 是 Arg 或 Trp

<400> 84

Xaa	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr
1				5				

<210> 85

<211> 235

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 輕鏈

<400> 85

Met	Glu	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5					10					15	

Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
			20					25					30		

Leu	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
		35					40					45			

Leu	Ser	Ser	Ile	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
	50					55					60				

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

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

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

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

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
	130					135					140				

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
145					150					155					160

Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
				165					170						175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 86  
 <211> 704  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 86  
 atggaaaccc cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctctagggga aagagccatc 120  
 ctctcctgca gggccagtca gagtcttagc agcatctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
 cctggccagg ctcccgttct cctcatctat ggtgcttcca gcagggccac tggcatccca 240  
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagtctggag 300  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgcta cctcaccgtg gacgttcggc 360  
 caagggacca aggtggaagt caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc 540  
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660  
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtg 704

<210> 87  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位



200918553

<400> 87

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

Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ser Ile  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly 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 Ser Leu Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> CDR1

<400> 88

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

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 共有序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是 Ser 或 Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

200918553

<222> (2)..(2)  
<223> Xaa 是 Ser 或 Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa 是 Trp 或 Phe

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa 是 Gly, Trp 或無胺氨基酸殘基

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa 是 Val, Leu 或 Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11)..(11)  
<223> Xaa 是 Val 或無胺氨基酸殘基

<400> 89

Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Ser Asn Xaa Xaa Xaa  
1 5 10

<210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 90

Gln Gln Tyr Ala Thr Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 91  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Pro Trp Glu Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly  
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
225 230 235 240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
340 345 350

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

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 92  
<211> 1389  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

# 200918553

<400> 92  
 atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcggcgc cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcagctgg tgcagctctg ggctgagggt aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggattcac cttcagcggc tactatatgt actgggtgcg acaggeccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240  
 cggaagtttc agggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtatatt actgtgcbag gagaccgtgg 360  
 gagcttccct ttgactactg gggccagga accctgggtca cgtctcctc agctagcacc 420  
 aagggcccat cggctctccc cctggcgcgc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480  
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540  
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660  
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
 gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780  
 ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840  
 gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900  
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
 gtcctcaccc ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260  
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
 tgctccgtga tgcagtaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380  
 ccgggtaaa 1389

<210> 93  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 93

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



<210> 96  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR3

<400> 96

Arg Pro Trp Glu Leu Pro Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 97  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 97

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

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

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60

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

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

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

Ser Phe Pro Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 98  
 <211> 701  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 98  
 atggaaaccc cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 180  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240  
 aggttcagtg gcagaggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag tctgcaacct 300  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtttcagtt tccaatcac tttcggcct 360  
 gggaccaaag tggatatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 420  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 540  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 660  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt g 701

<210> 99



200918553

<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 可變功能部位

<400> 99

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 100  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 100

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

<210> 101  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 101

Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 102  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 102

Gln Gln Ser Phe Ser Phe Pro Ile Thr  
1 5

<210> 103  
<211> 465  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重键

<400> 103

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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

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

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Arg Asn Gly Asp Tyr Val Phe Thr Tyr Phe Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys  
 225 230 235 240

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val  
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 355 360 365

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

370

375

380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu  
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
450 455 460

Lys  
465

<210> 104  
<211> 1395  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 104  
atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcggcgc cgaccggcgc gcatagccag 60  
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccct 180  
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240  
cagaagttta agggcagggc caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcccacatg 300  
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgtgag aaacggtgac 360  
tatgttttta cctactttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctccctcagct 420  
agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480  
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtctcagga 600  
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 660  
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720  
tgttgtgtcg agtgcaccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780

ttcccccaaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt cacgtgcgtg 840  
 gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900  
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960  
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 1020  
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080  
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140  
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200  
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260  
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320  
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380  
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 105  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 105

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala His  
 65 70 75 80

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

Val Arg Asn Gly Asp Tyr Val Phe Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 106  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa 是 Trp 或無胺基酸殘基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa 是 Ile 或 Tyr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa 是 Asn, Ser 或 Ile

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa 是 Pro, Ala, Tyr

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

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa 是 Gly 或 Asn

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa 是 Asn 或 Asp

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa 是 Tyr 或 Ser

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa 是 Ala 或 Asn

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa 是 Gln 或 Arg

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa 是 Lys 或 Arg

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Xaa 是 Phe 或 Lys

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa 是 Gln, Lys 或 Arg

<400> 106

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Gly

<210> 107  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa 是 Val 或 Ile

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa 是 Ser 或 Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa 是 Glu 或 Lys

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Xaa 是 Try 或 Phe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa 是 Thr 或 Ala

<400> 107

Lys Ser Ser Gln Ser Xaa Leu Tyr Ser Ser Xaa Asn Xaa Asn Xaa Leu  
 1 5 10 15

Xaa

<210> 108  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR3

<400> 108

Asn Gly Asp Tyr Val Phe Thr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 109  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鍵

<400> 109

Met Ala Trp Ala Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly  
 1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser  
 20 25 30

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val  
 35 40 45



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

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Val Ser Gly Arg Pro Ser Gly Val Ser  
65 70 75 80

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

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe  
100 105 110

Thr Gly Ser Ser Thr Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
195 200 205

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
225 230 235

- <210> 110
- <211> 705
- <212> DNA
- <213> 人造

- <220>
- <223> 輕鏈

<400> 110

atggcgtggg cgccgctgct gctgaccctg ctggcgcatt gcaccggcag ctgggcgcag 60

tctgcctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctctctg gacagtcgat caccatctcc 120

tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccagcagcac 180  
 ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagtg gtcggccctc aggggtttct 240  
 aatcgcttct ctggtccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccatctc tggactccag 300  
 gctgaggacg aggctgatta ttactgcagc tcttttacag gcagcagcac ttggttattc 360  
 ggcggagggga ccaaactgac cgtcctaggc caaccgaaag cggcgccctc ggtcactctg 420  
 ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480  
 gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540  
 ggagtggaga ccaccacacc ctccaaaca agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 600  
 ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 660  
 gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca 705

<210> 111  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 111

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
 20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Gly Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

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

Ser Thr Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 112  
 <211> 14

200918553

<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 112

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 113  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 113

Glu Val Ser Gly Arg Pro Ser  
1 5

<210> 114  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 114

Ser Ser Phe Thr Gly Ser Ser Thr Trp Leu  
1 5 10

<210> 115  
<211> 464  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 115

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Gly Tyr Phe Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
115 120 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195 200 205

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys  
225 230 235 240

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser  
245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
275 280 285

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 290 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val  
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 340 345 350

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp  
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 116  
 <211> 1392  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 重鏈

<400> 116  
 atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcggcgc cgaccggcgc gcatagccag 60  
 gtgcaactgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aatcctaaca gtggtggcac aaactatgca 240

cagaagtttc ggggcagggg caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300  
 gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag atttgatat 360  
 tttggctact actttgacta ctggggccag ggaacctggt tcaccgtctc ctgagctagc 420  
 accaagggcc catcggtctt ccccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480  
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540  
 tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctgaggactc 600  
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 660  
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaagt 720  
 tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctctc 780  
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac gtgctggtg 840  
 gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900  
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacggt ccgtgtggtc 960  
 agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020  
 tccaacaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct caaaaccaa agggcagccc 1080  
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140  
 agcctgacct gcctggtcaa aggettctac cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200  
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggactc cgacggctcc 1260  
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320  
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380  
 tctccgggta aa 1392

<210> 117  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 可變功能部位

<400> 117

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Gly Tyr Phe Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 118  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 共有序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa 是 Gln 或 Pro

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa 是 Val, Leu 或 Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa 是 Ser 或 Cys

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9)..(9)

<223> Xaa 是 Ser, Ile, Thr 或無胺基酸殘基

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa 是 Phe 或 Leu

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa 是 Ala 或 Asn

<400> 118

Arg Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa  
1 5 10

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> CDR2

<400> 119

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Arg  
1 5 10 15

Gly

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> CDR3

<400> 120

Phe Gly Tyr Phe Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 121

<211> 235

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 輕鏈

<400> 121



Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 122

# 200918553

<211> 704  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 122  
atggaaaccc cggcgcagct gctgtttctg ctgctgctgt ggctgccgga taccaccggc 60  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
ctctcctgca gggccagtcc gagtgttagc agcagctact ttgcctggta ccagcaaaaa 180  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatocca 240  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300  
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggtt ggtcacctcg gacgttcggc 360  
caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgctgct gaataacttc 480  
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540  
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 600  
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660  
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtg 704

<210> 123  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 可變功能部位

<400> 123

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 Pro Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Phe 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



<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa 是 Ser, His 或 Asp

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa 是 Ala 或 Gly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa 是 Gly 或無氨基酸殘基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa 是 Ser 或 Tyr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa 是 Tyr 或 Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Xaa 是 Gln, Asn 或 Ser

<400> 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Val Xaa  
 1 5 10 15

<210> 126  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> CDR3

<400> 126

Gln Gln Tyr Gly Trp Ser Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 127  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>

200918553

<223> 重鏈

<400> 127

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Tyr Thr Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly  
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys



# 200918553

<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 128  
atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcgggcg cgaccggcgc gcatagccag 60  
gtacaactgg tgcagtctgg ggctgagggt aagaagcctg gggcctcagt gaaggctctcc 120  
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccct 180  
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaattatgca 240  
cagaagtttc ggggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacgtg 300  
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtatatt actgtgagag agaccctgat 360  
accagtggct ttgactactg gggccagga accctggtea cegtctctc agctagcacc 420  
aagggcccat cggctctccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480  
gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660  
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
gtcgagtgc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780  
ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggg 840  
gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactgg acgtggacgg cgtggaggtg 900  
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
gtcctcaccg ttgtgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020  
aacaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
gaaccacag tgtacacct gcccccattc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat 1200  
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctccatgc tggactccga cggctccttc 1260  
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380  
ccgggtaaa 1389

<210> 129  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人造

200918553

<220>

<223> 可變

<400> 129

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Pro Tyr Thr Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 共有序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是 Gly, Thr 或 Trp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 是 Thr 或 Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 是 Ser 或 Ala



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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa 是 Arg 或 Leu

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa 是 Thr 或 Ser

<400> 130

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 131  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa 是 Glu 或 Ser

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa 是 Asp, Val 或 Asn

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa 是 Asp, Ser 或 Asn

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa 是 Gln, Gly 或 His

<400> 131

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Ser  
 1 5

200918553

<210> 132  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 132

Asp Pro Tyr Thr Ser Gly Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 133  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 輕鏈

<400> 133

Met Ala Trp Ala Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly  
1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr  
20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser His Ile  
35 40 45

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
85 90 95

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
100 105 110

Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
 145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
 165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
 180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
 195 200 205

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
 210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230 235

<210> 134  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 134  
 atggcggtggg cgccgctgct gctgaccctg ctggcgcat gcaccggcag ctgggcgcag 60  
 tctgtgctga ctcagccacc ctcagcgtct gggacccccg ggcagagggt caccatctct 120  
 tgttctggaa gccgctccca catcggaagt aatactgtaa actggtacca gcacctccca 180  
 ggaacggccc ccaaactcct catctatagt aataatcatc ggccctcagg ggtccctgac 240  
 cgatttctctg gctccaagtc tggcacctca gcctccctgg ccatcagtgg gctccagtct 300  
 gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca gcctgaatgg tccggtattc 360  
 ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggc caaccgaaag cggcgccctc ggtcactctg 420  
 ttcccgccct cctctgagga gttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480  
 gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540  
 ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 600  
 ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggteacgcat 660  
 gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca 705

<210> 135  
 <211> 110

200918553

<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 共有序列

<400> 135

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser His Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 136  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 136

Ser Gly Ser Arg Ser His Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn  
1 5 10

<210> 137  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 137

200918553

Ser Asn Asn His Arg Pro Ser  
1 5

<210> 138  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 138

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val  
1 5 10

<210> 139  
<211> 465  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 139

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

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile  
35 40 45

Arg Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Thr Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly



Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu  
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
450 455 460

Lys  
465

<210> 140  
<211> 1395  
<212> DNA  
<213> 人造

<220>  
<223> 重鏈

<400> 140  
atggattgga cctggagcat tctgtttctg gtggcggcgc cgaccggcgc gcatagccag 60  
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtcacctcacc 120  
tgcactgtct ctggtggctc catcagaagt ggtggttact actggagctg gatccgccag 180  
caccagggga agggcctgga gtggattggg tatatctatt acagtgggag cacctactac 240  
aaccctgcc tcaagagtcg agttaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300  
ctgaagctga actctgtgac tgccgcggac acggcctgtg attactgtgc gagagaggat 360  
acagctatgg actactttga ctactggggc caggggaacct tggtcaccgt ctctcagct 420  
agcaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcgcctgtct ccaggagcac ctccgagagc 480  
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600  
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 660  
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720  
tgtttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780

ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacgtgcgtg 840  
 gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg 900  
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960  
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 1020  
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080  
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140  
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200  
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260  
 tcctttctcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320  
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380  
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 141  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<400> 141

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



200918553

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 142  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR1

<400> 142

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser  
1 5

<210> 143  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR2

<400> 143

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 144  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> CDR3

<400> 144

Glu Asp Thr Ala Met Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 145  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人造

<220>  
<223> GM-CSF-Ile

<400> 145

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val  
1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Leu Arg Leu Leu Asp Leu Ser Arg Asp Thr  
 20 25 30

Ala Ala Glu Met Asn Glu Glu Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp  
 35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln  
 50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met  
 65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp  
 100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Gln Glu  
 115 120 125

<210> 146  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 146

Ala Pro Ser Arg Ser Pro Ser Pro Ser Arg Gln Pro Trp Glu His Val  
 1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr  
 20 25 30

Ala Ala Glu Ile Asn Glu Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp  
 35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln  
 50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met  
 65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp  
 100 105 110

Phe Leu Leu Val Thr Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Gly  
 115 120 125

<210> 147  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人造

<220>  
 <223> 共有序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa 是 Gly 或無胺基酸殘基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa 是 Gly 或無胺基酸殘基

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa 是 Tyr 或 Phe

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa 是 Thr, Ser 或 Gly

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa 是 Tyr 或 Gly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa 是 Ile 或 Met

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa 是 His 或 Ser

200918553

<400> 147

Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa  
1 5 10

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

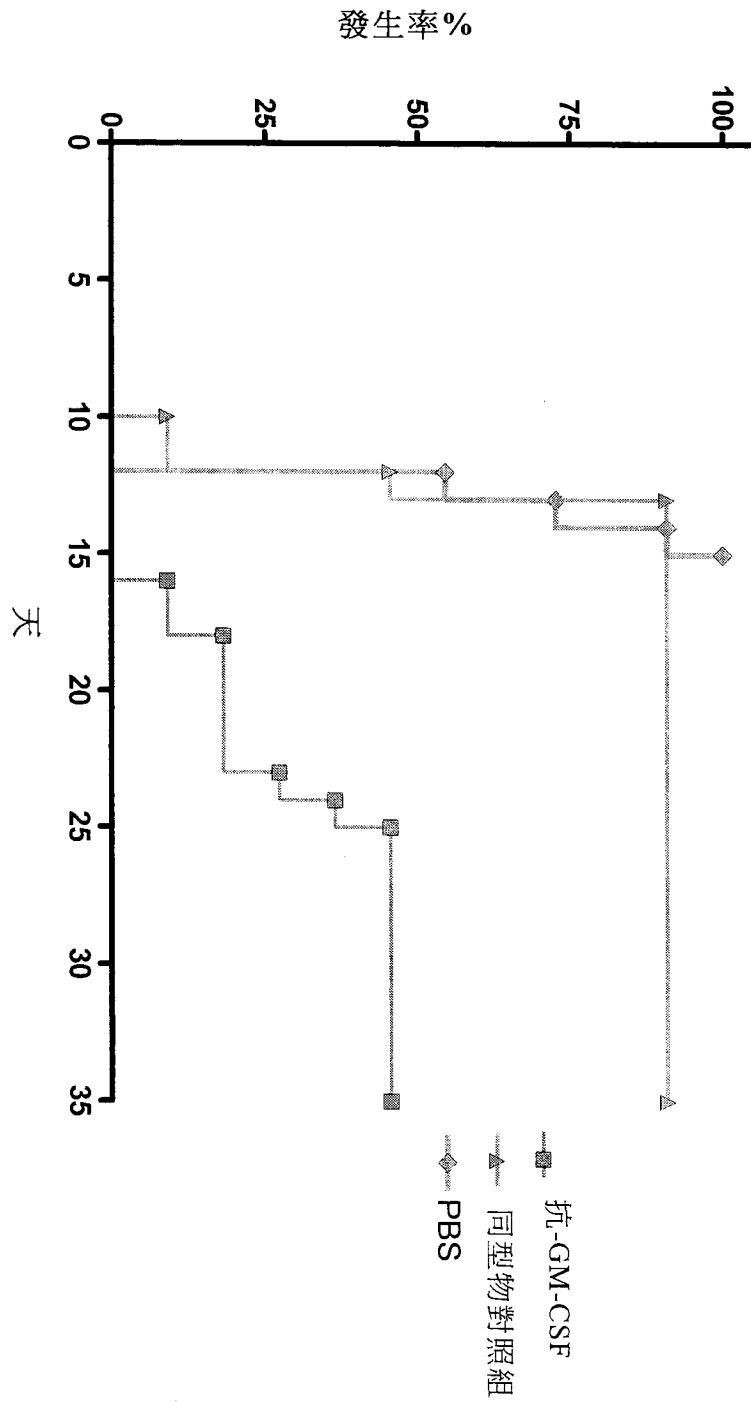
無。

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無。

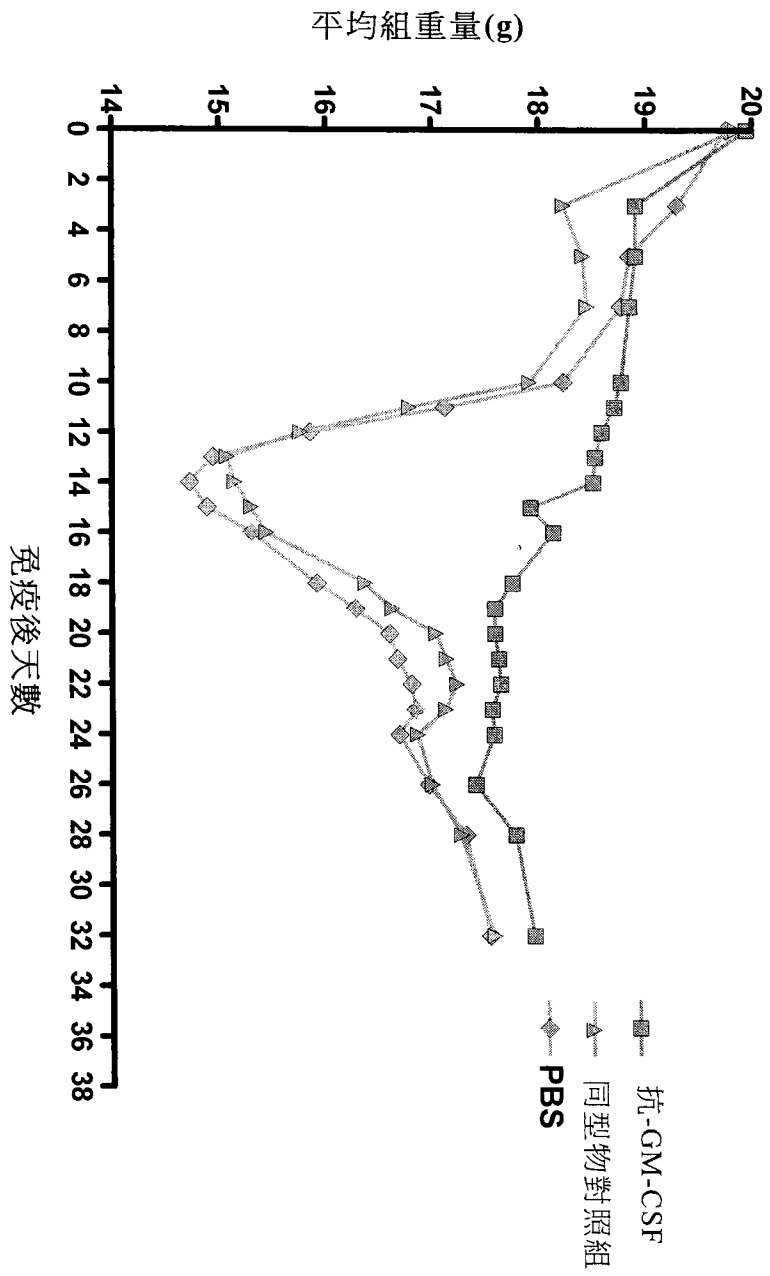
97134377

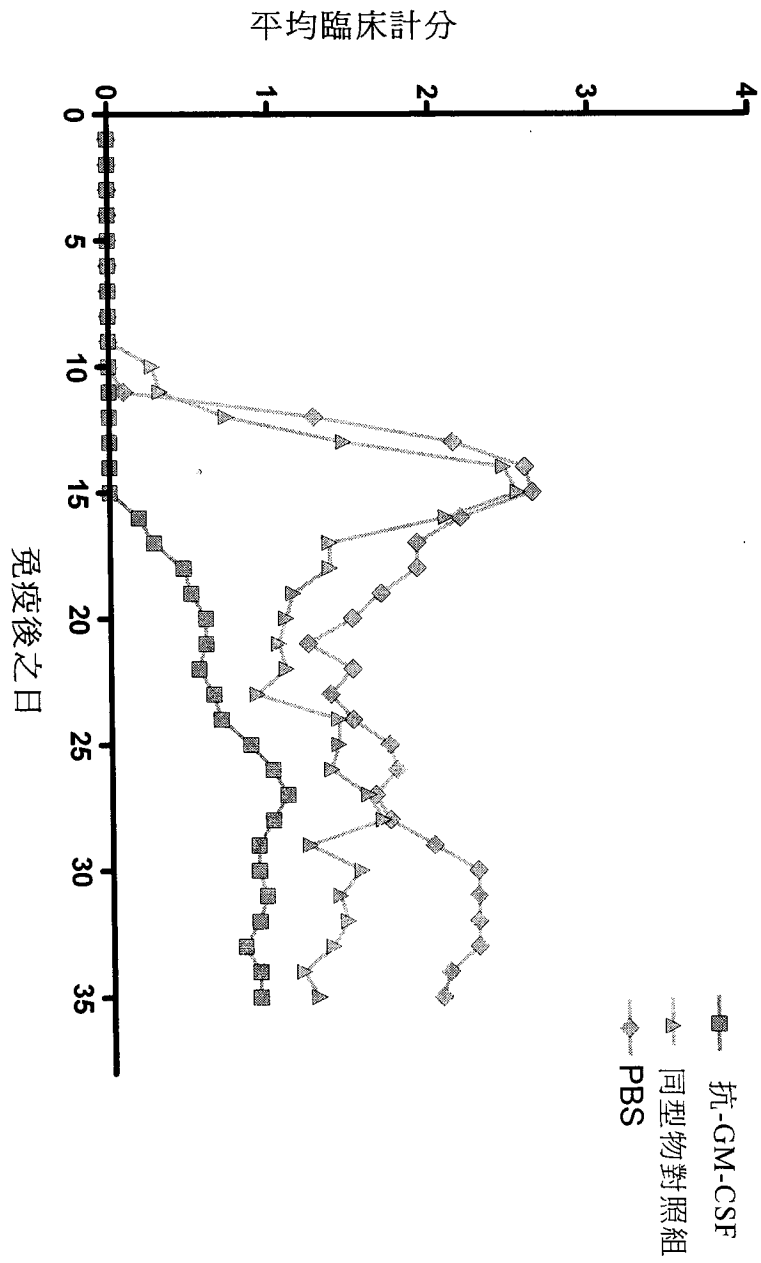
修正  
補充  
本8+月2日



第 1a 圖

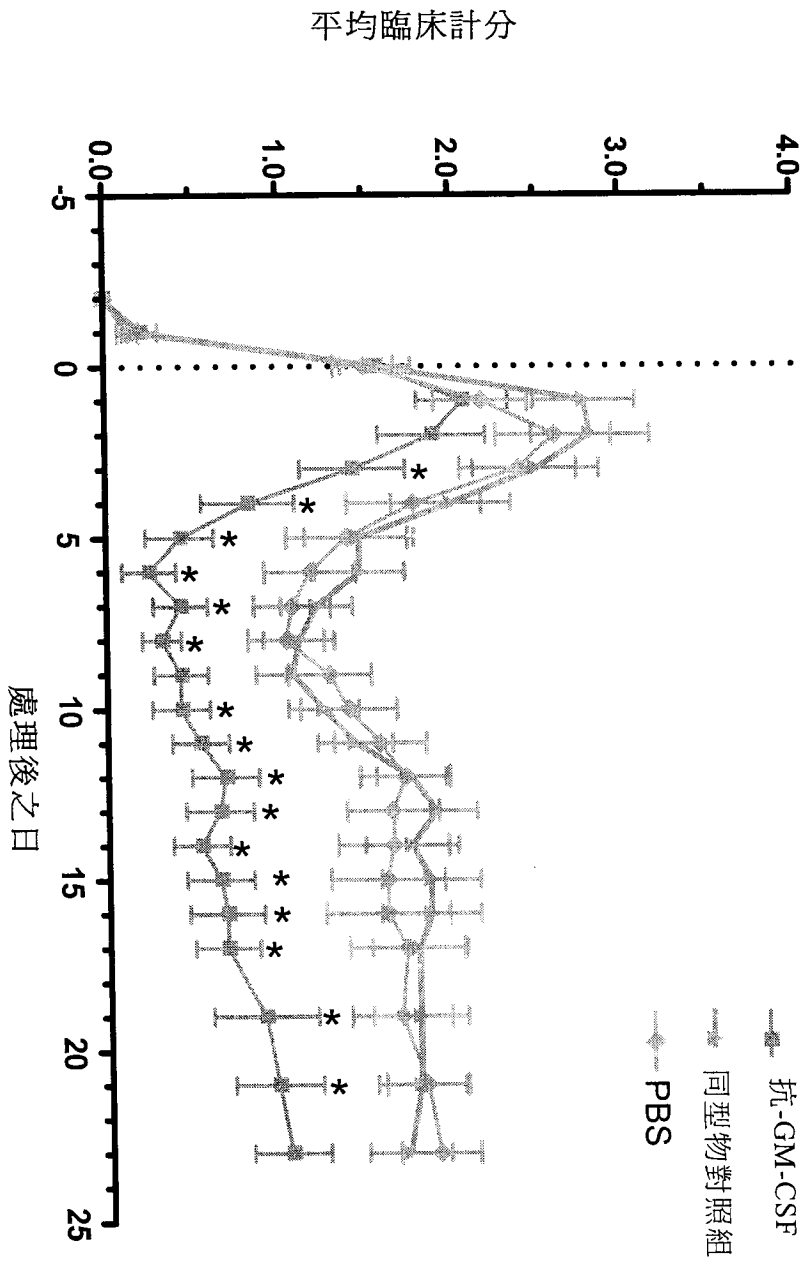
第 1b 圖



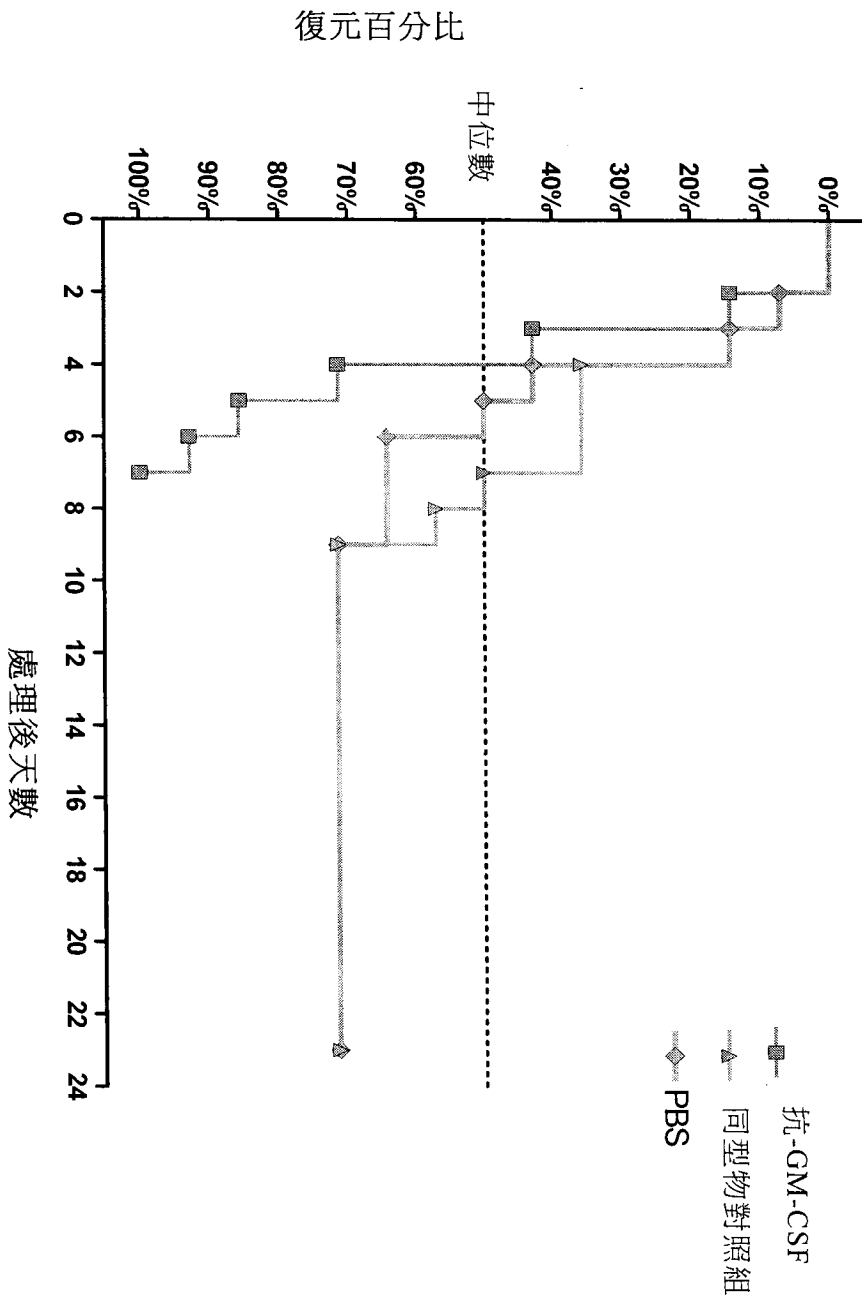


第 1c 圖



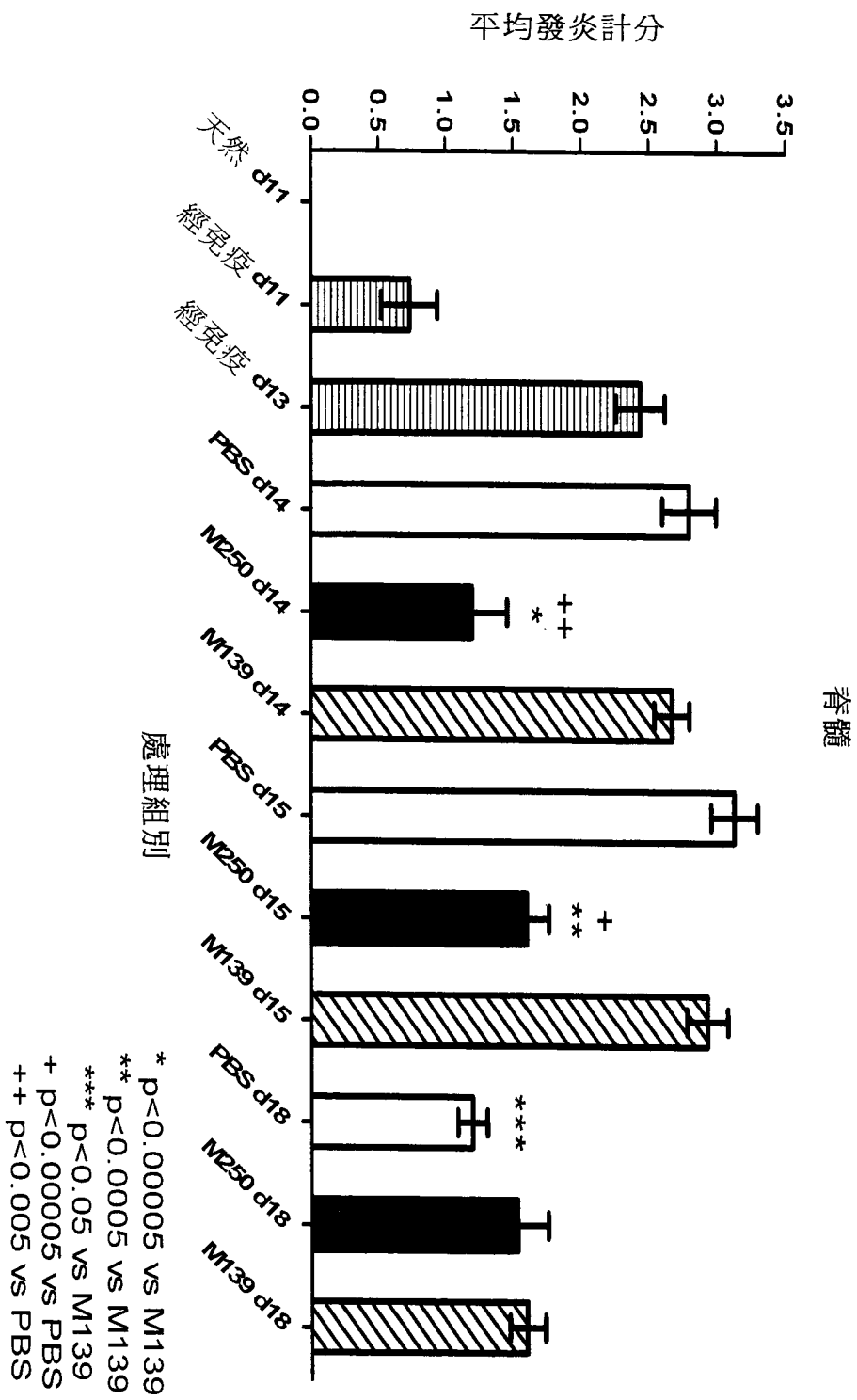


第 1d 圖

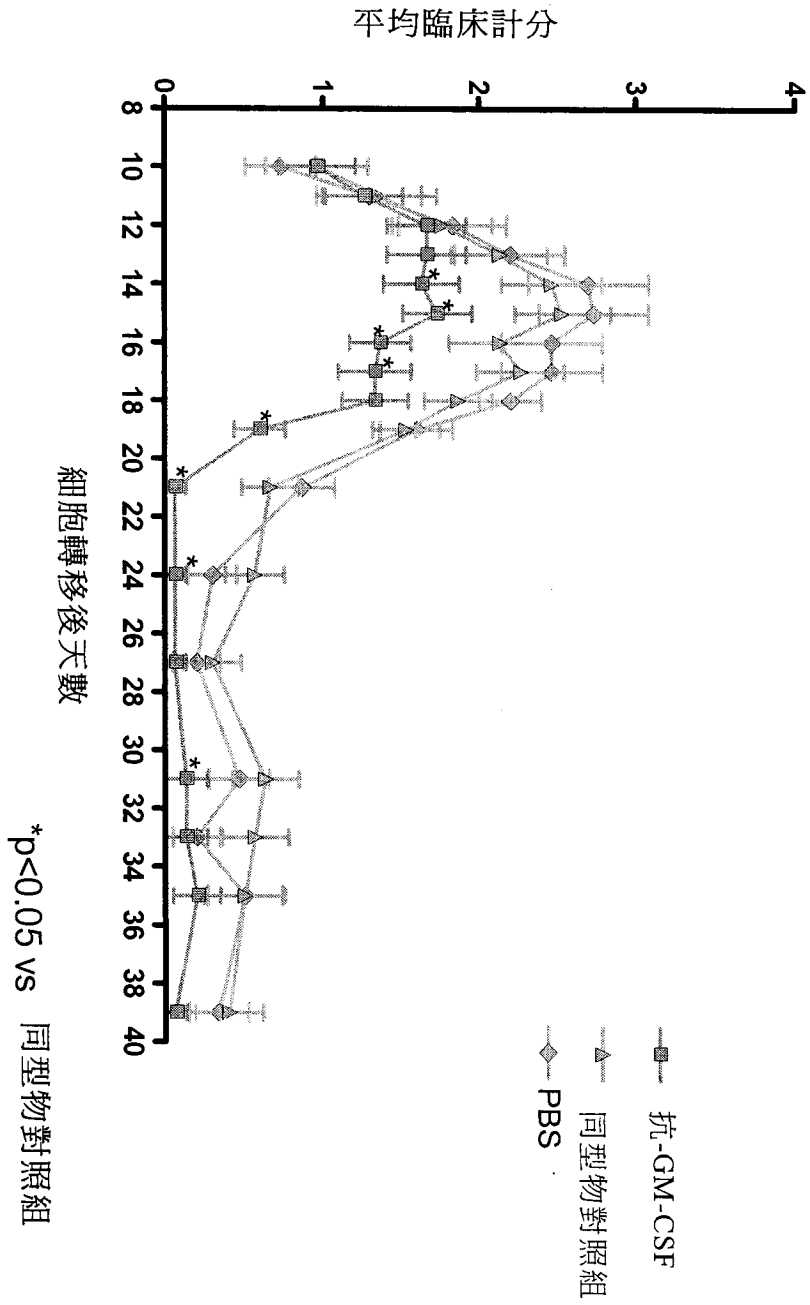


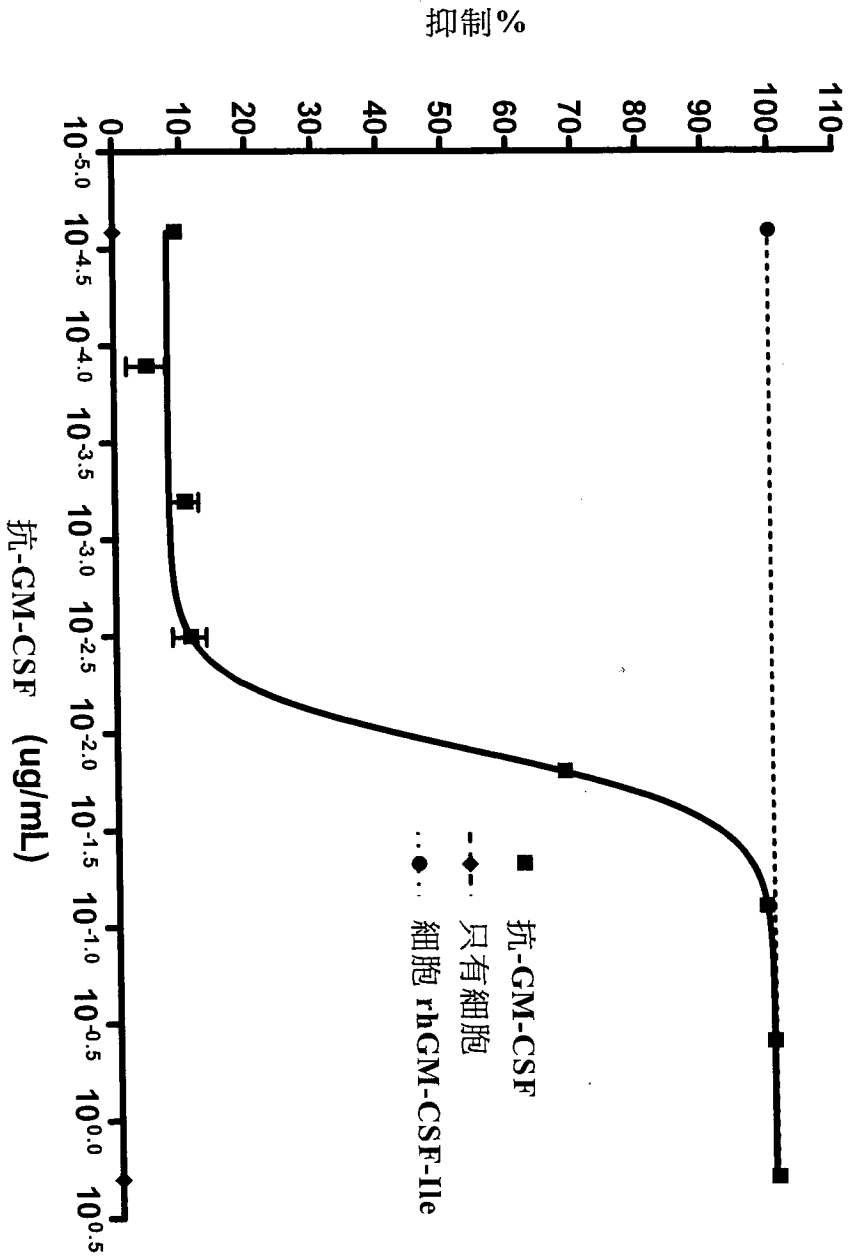
第 2a 圖

第 2b 圖

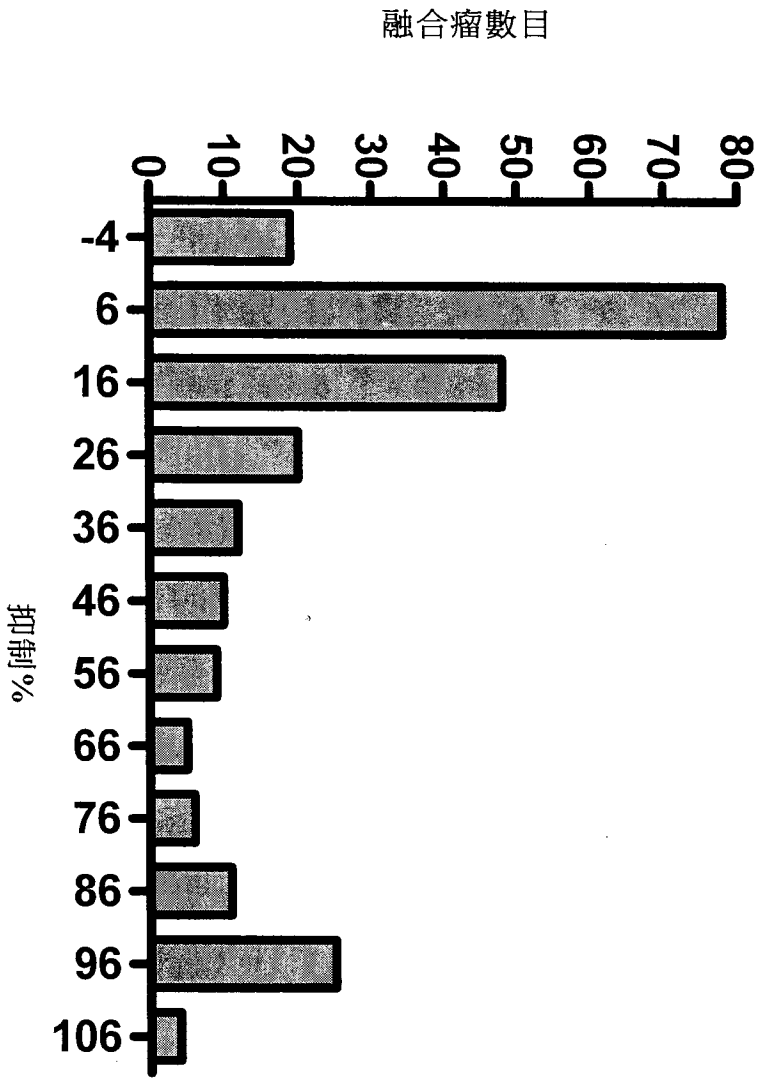


第 2c 圖

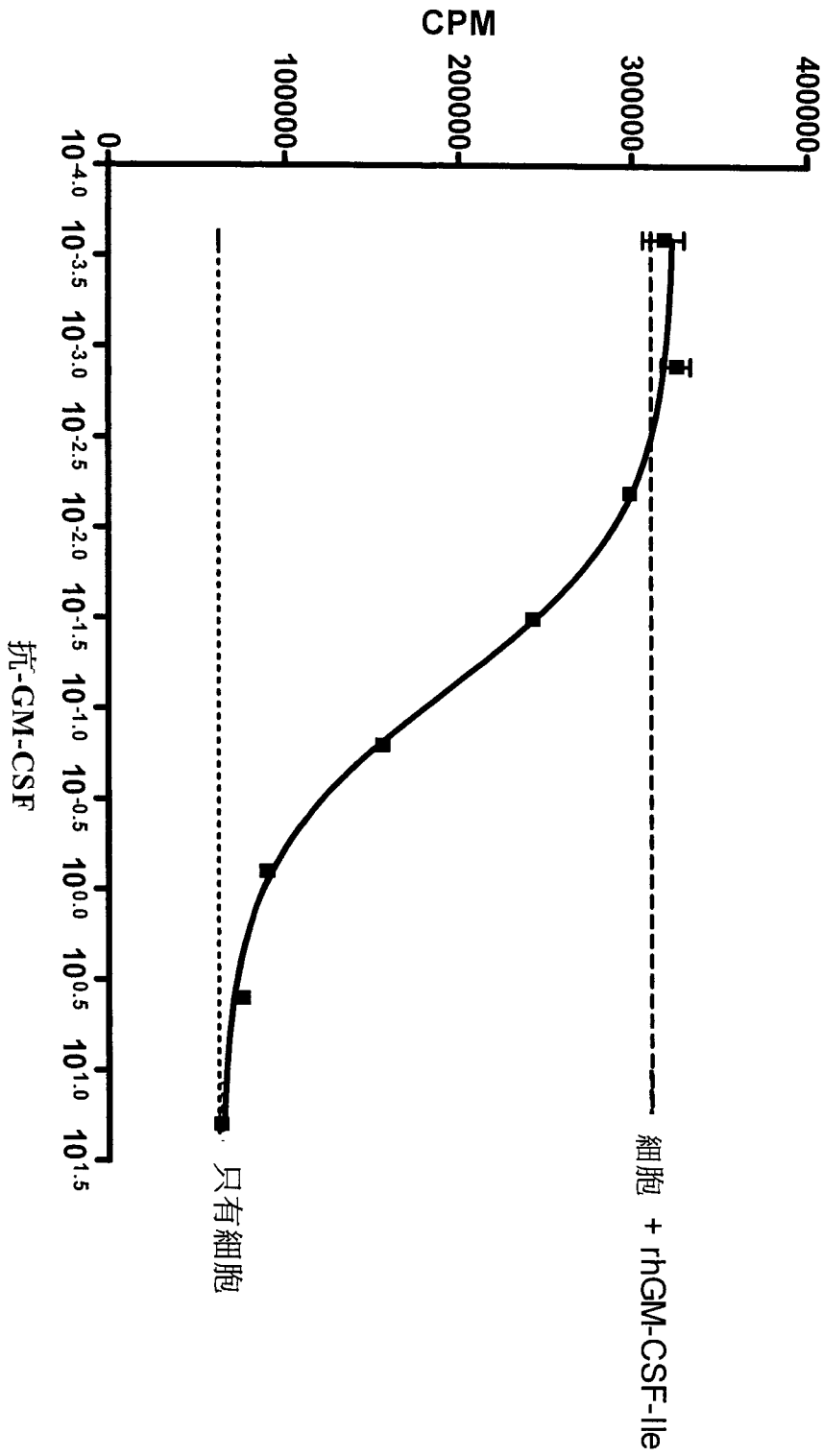




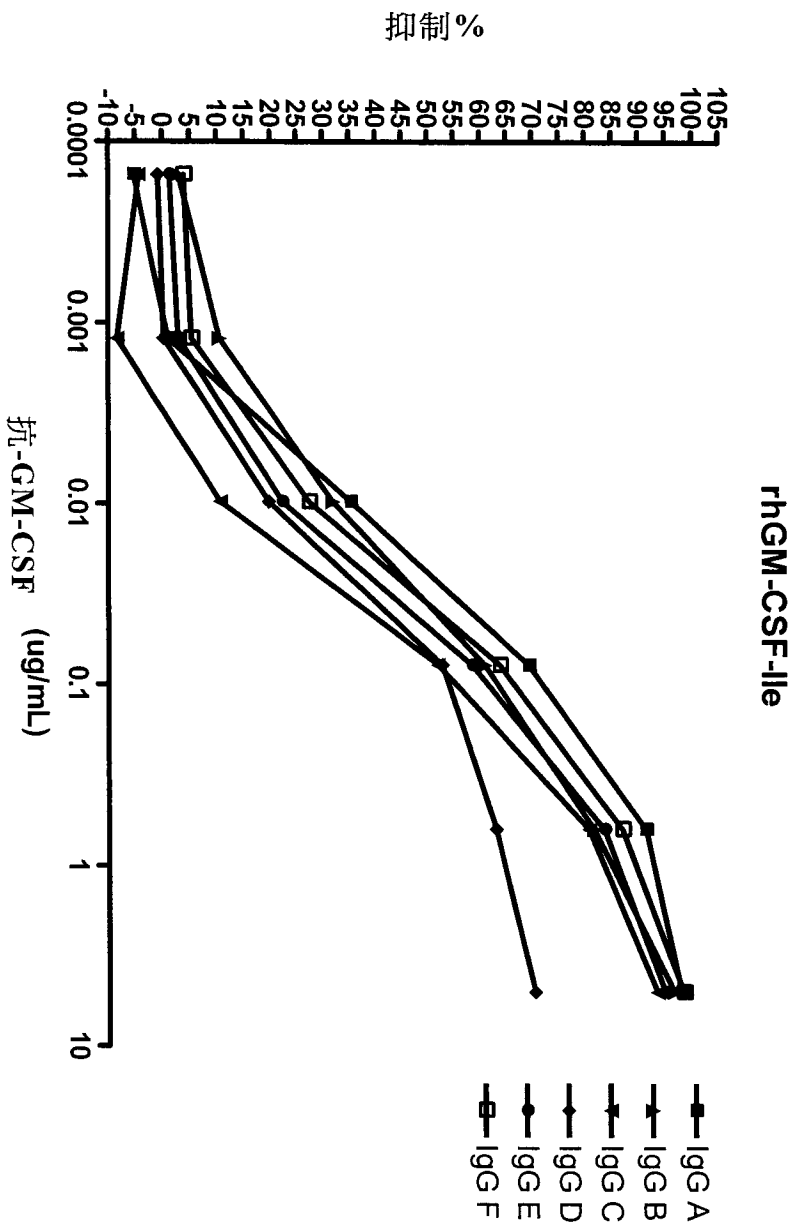
第 3 圖



第 4 圖



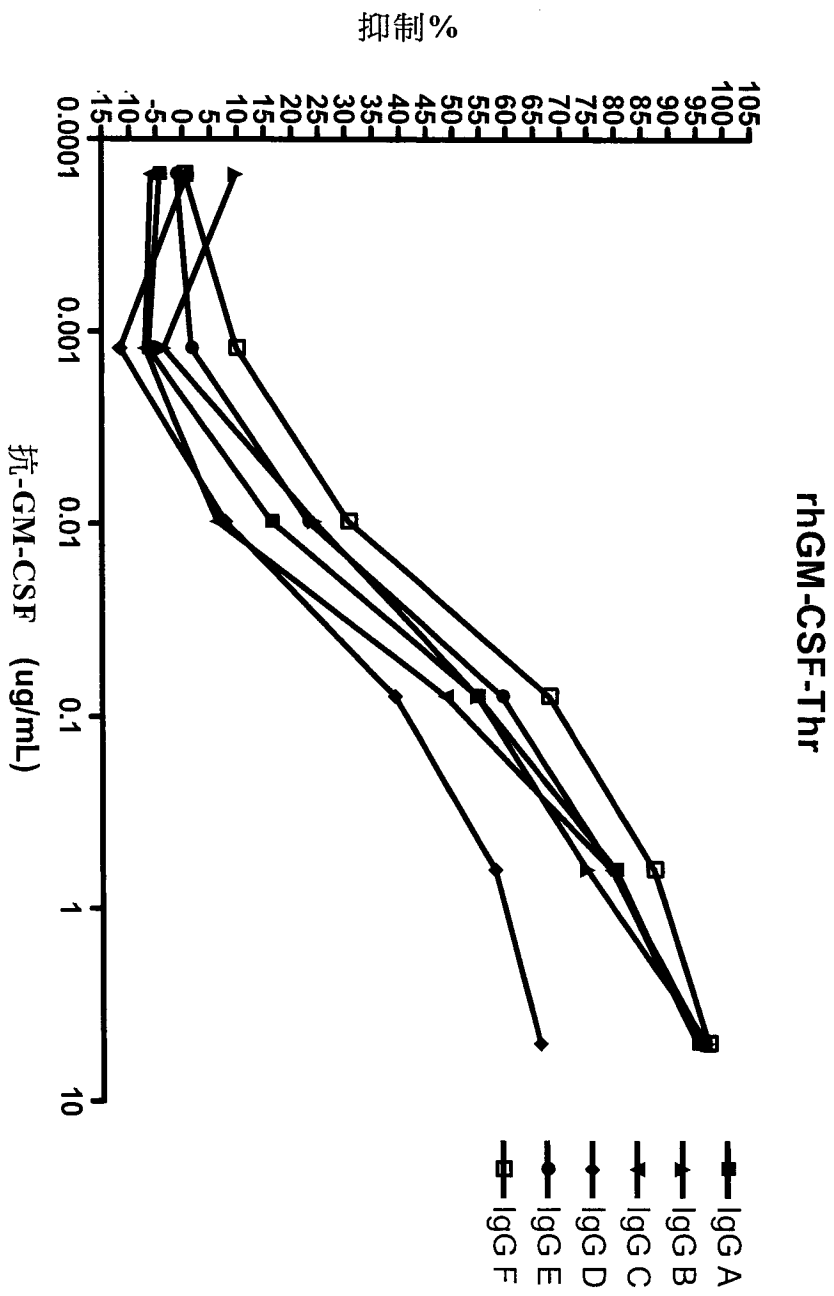
第 5 圖



第 6a 圖

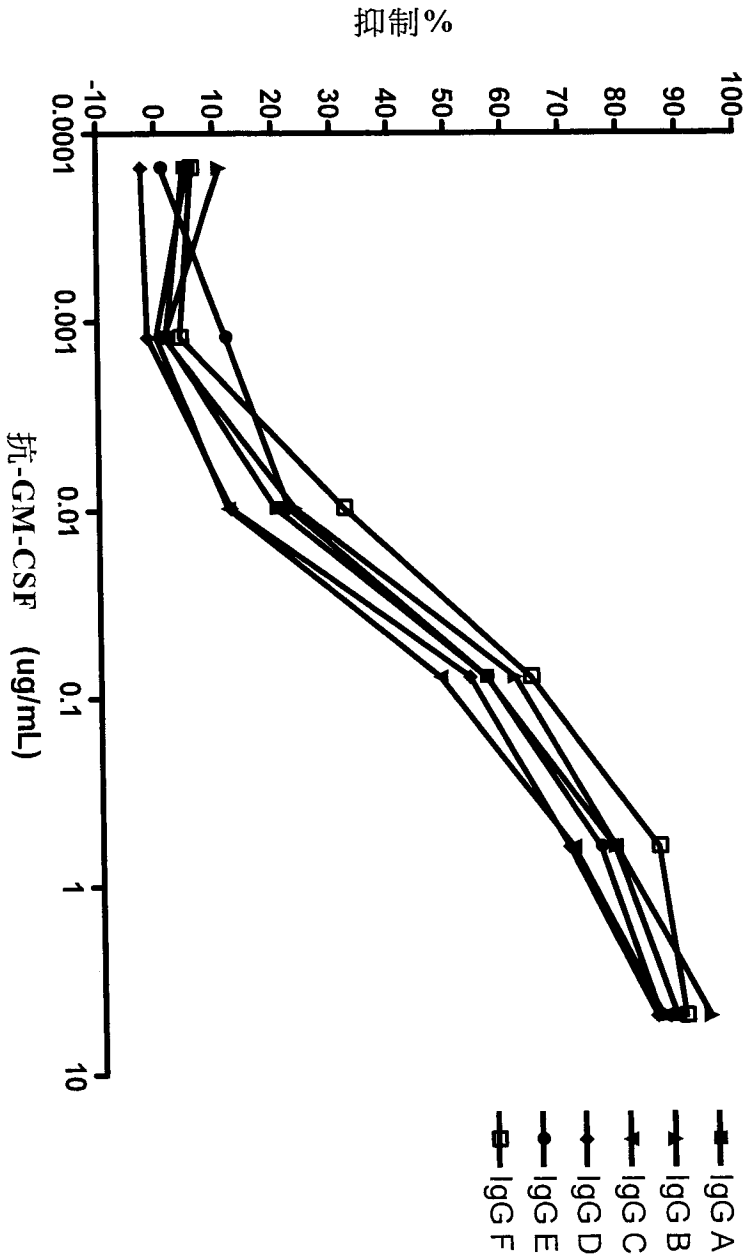


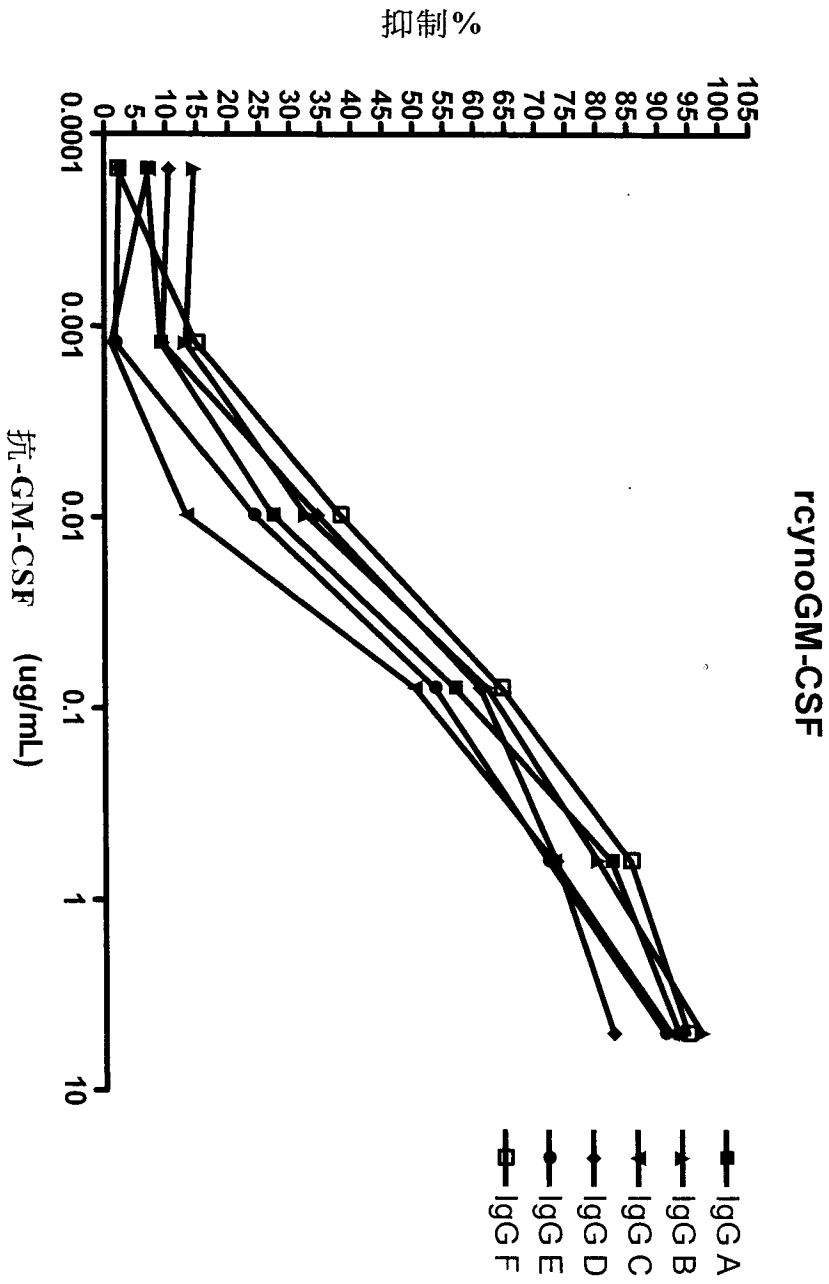
第 6b 圖



第 6c 圖

A431 細胞衍生之 nhGM-CSF

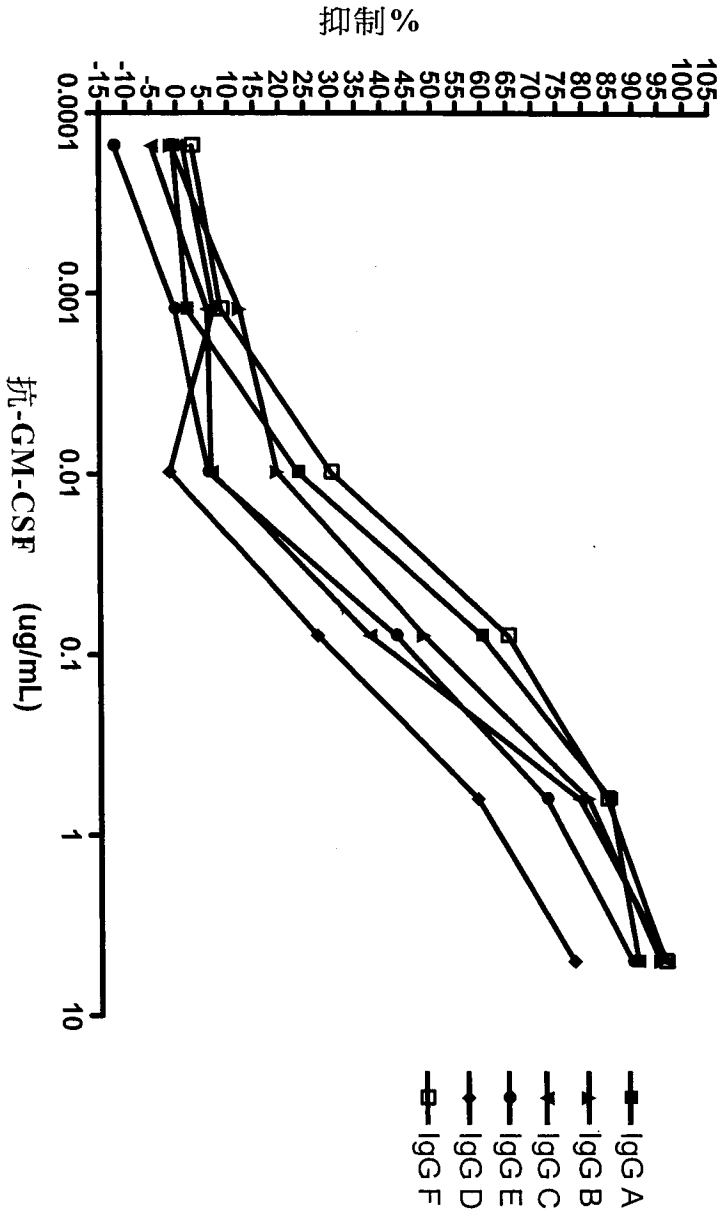




第 6d 圖

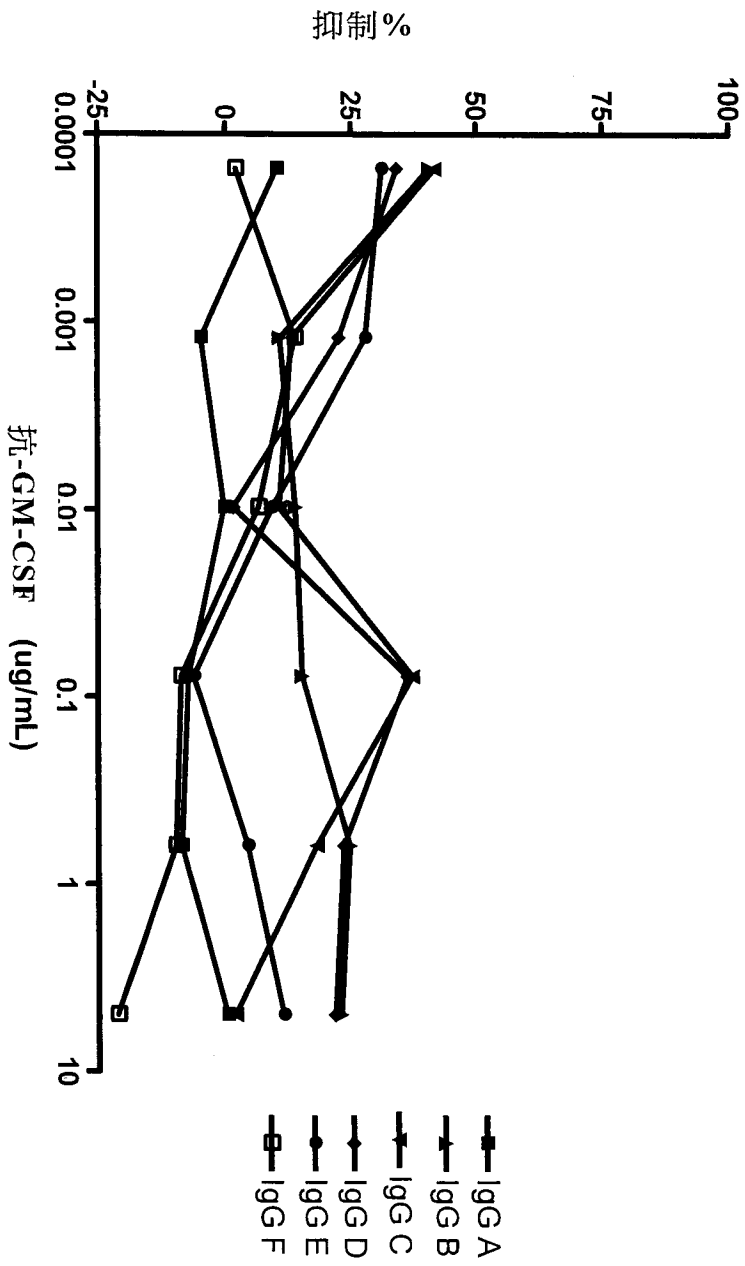
第 6e 圖

PBMC 衍生之 rhGM-CSF

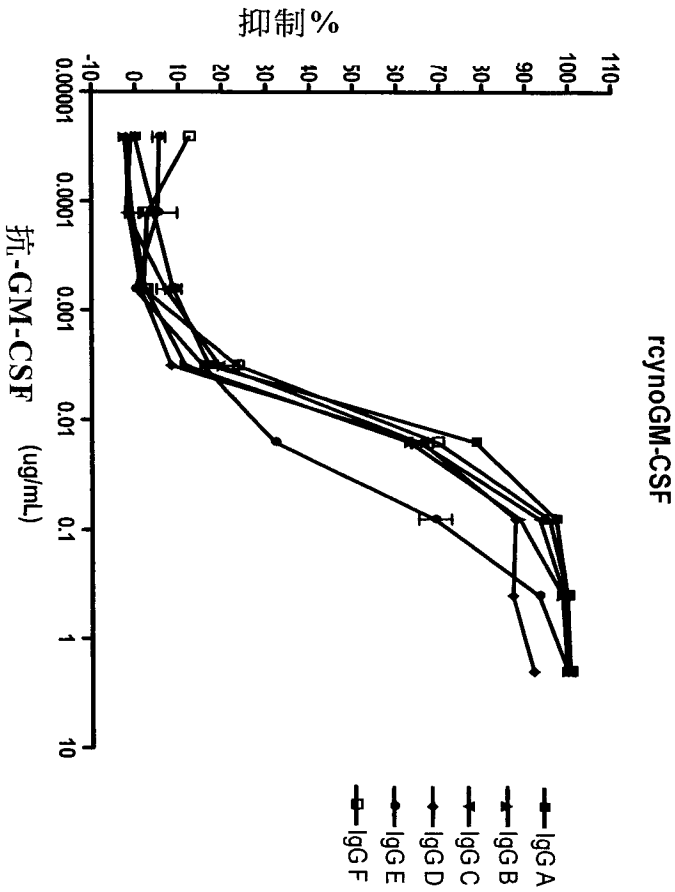
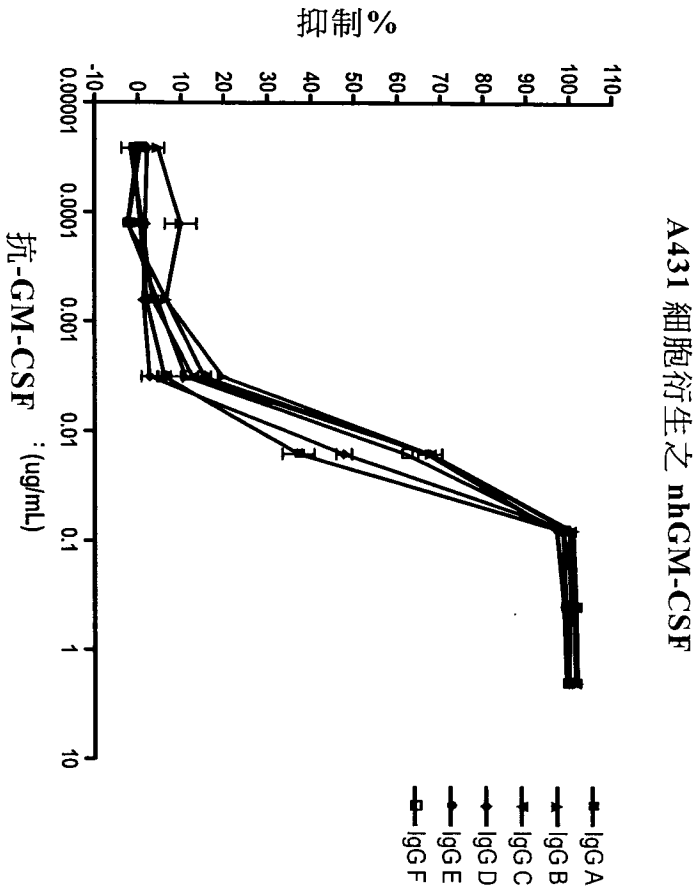


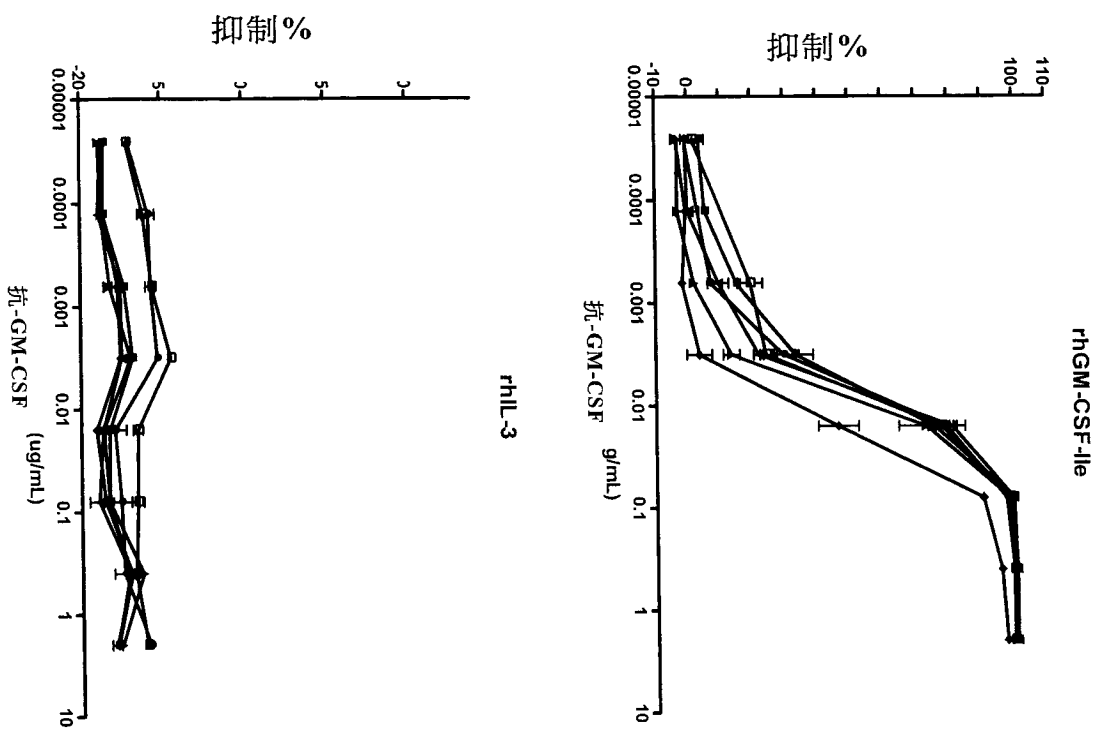
第 6f 圖

rhCSF-1



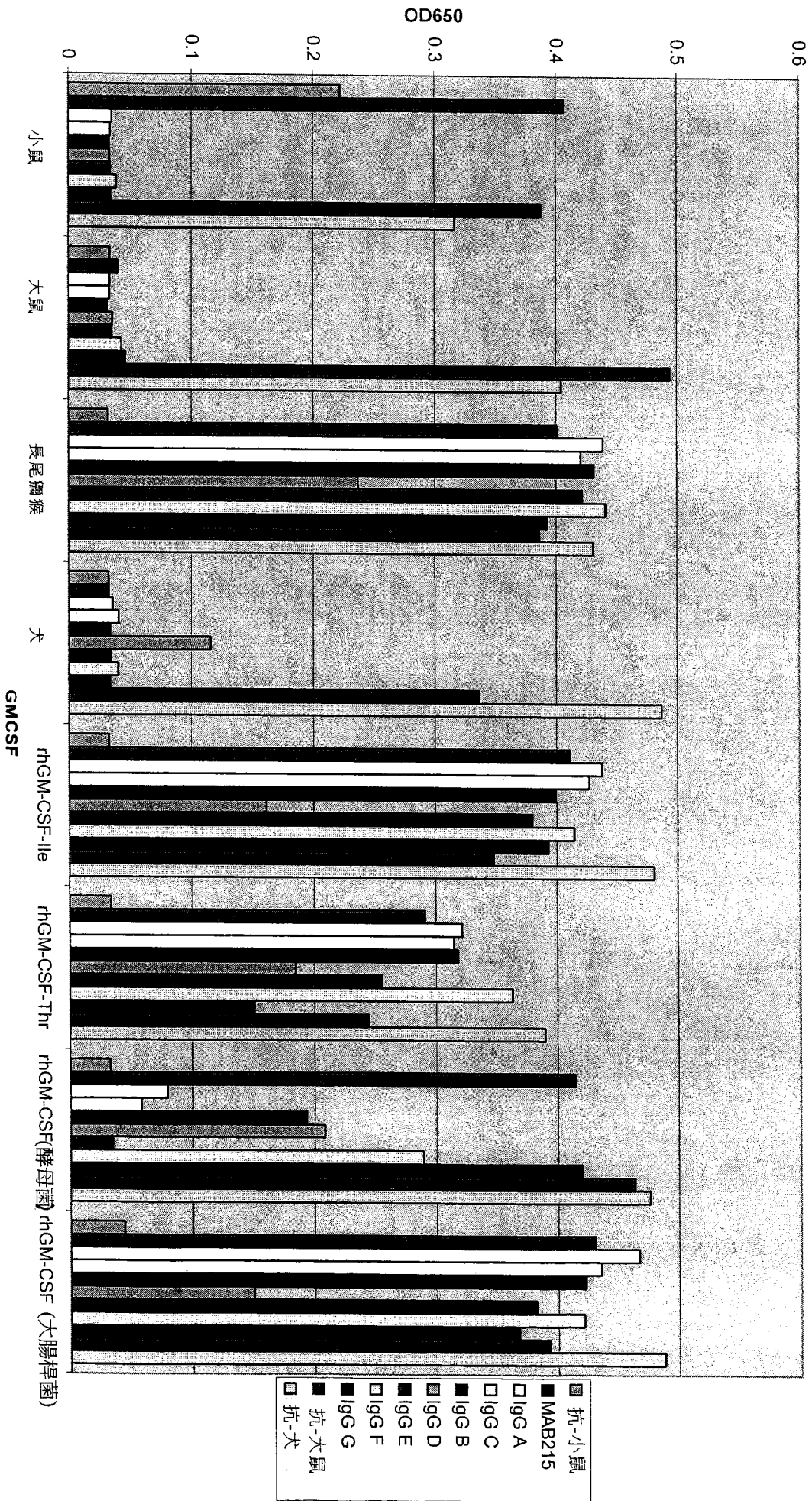
第 7a 圖





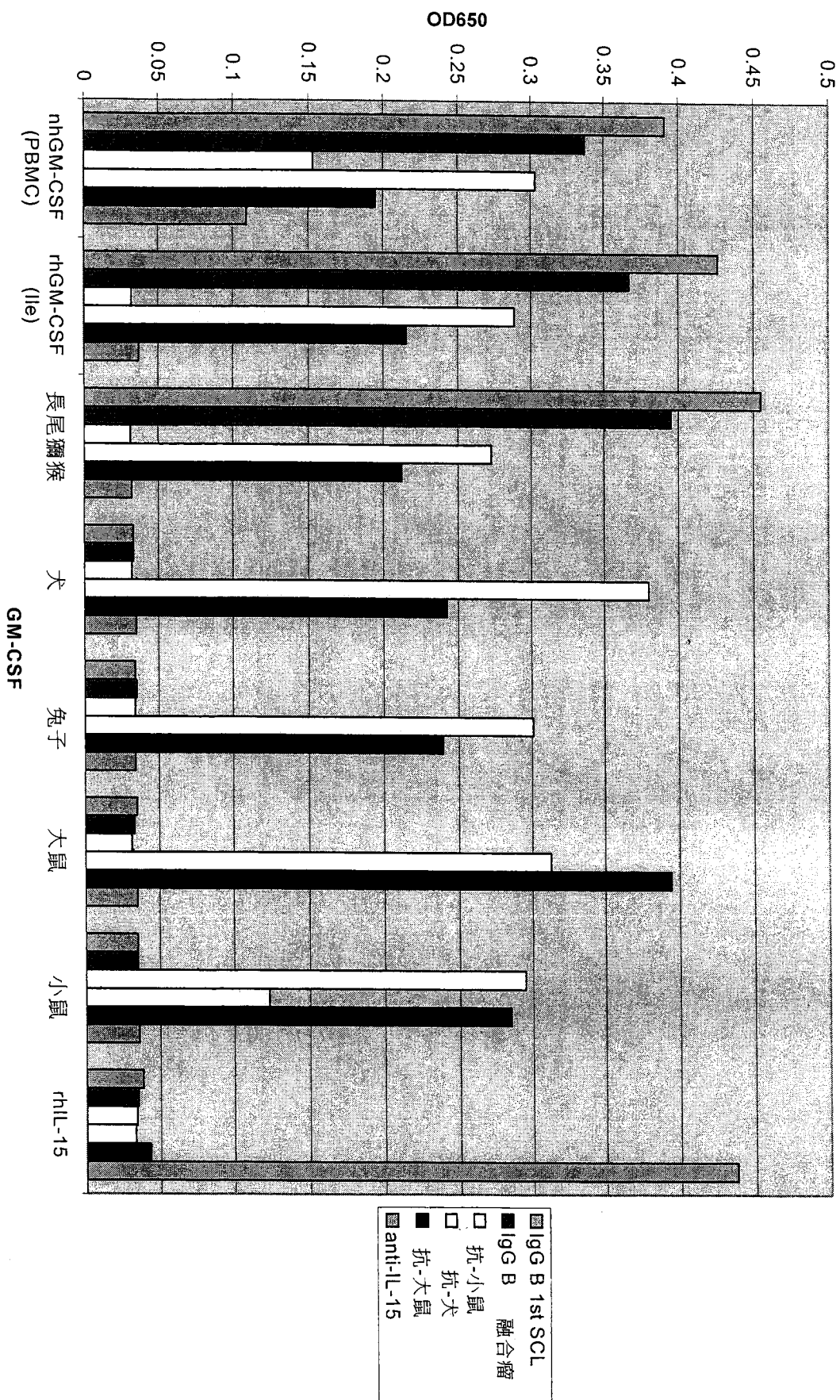
第 7b 圖

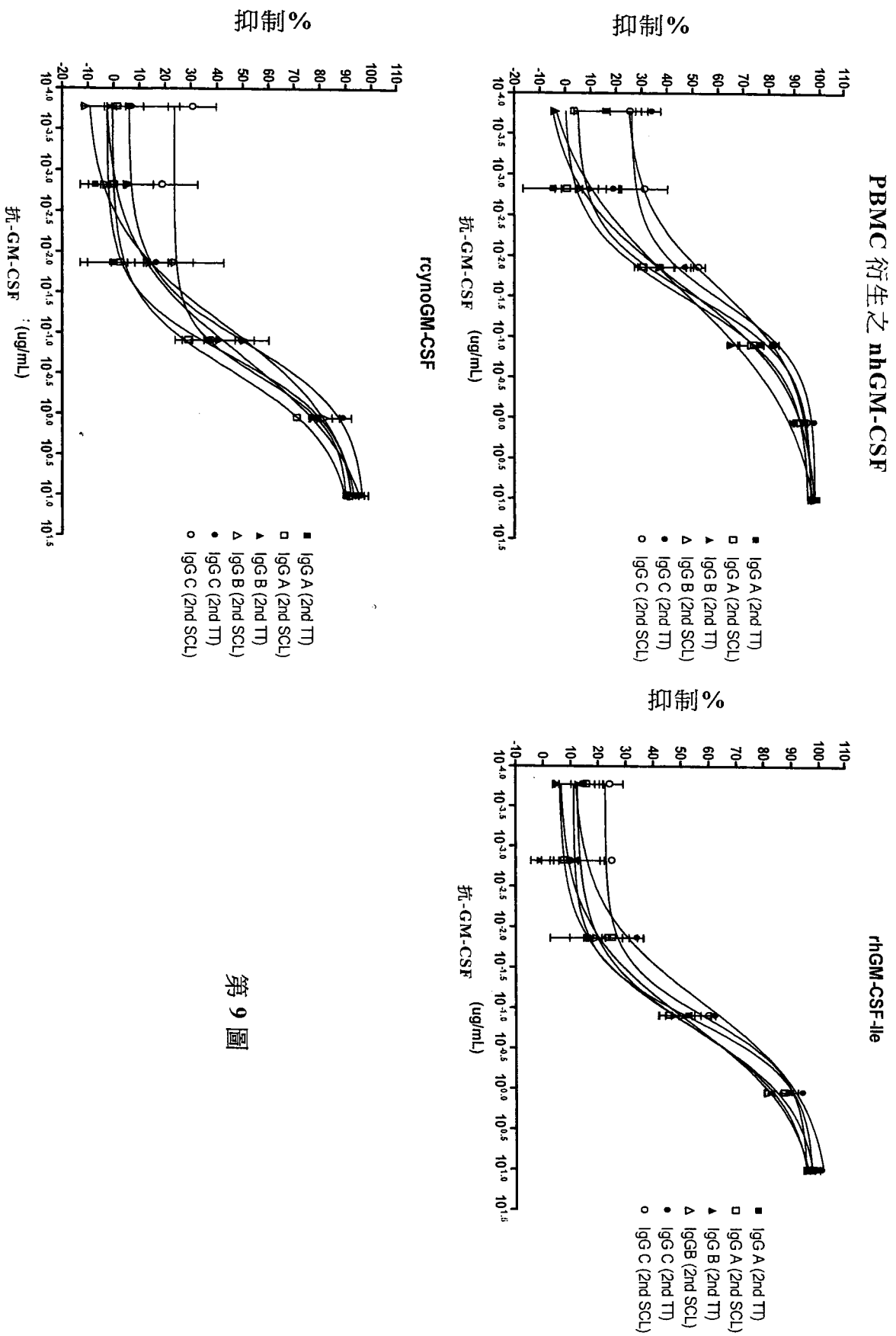
第 8a 圖



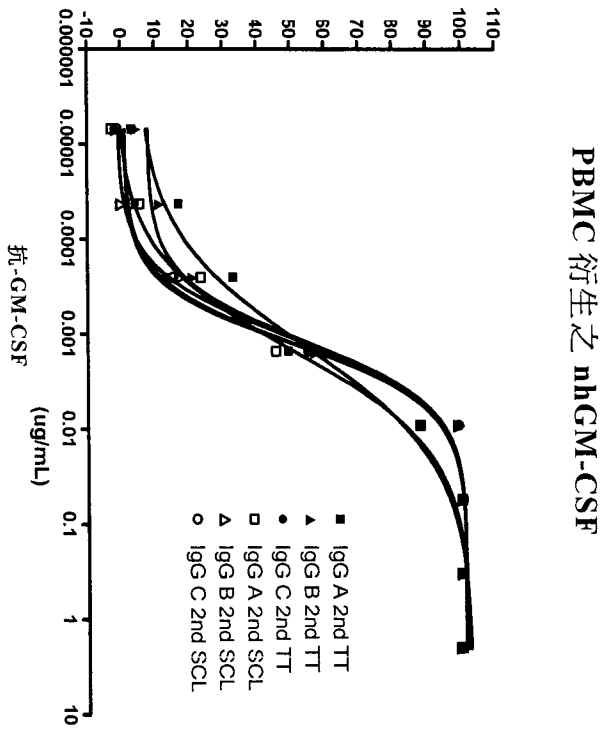
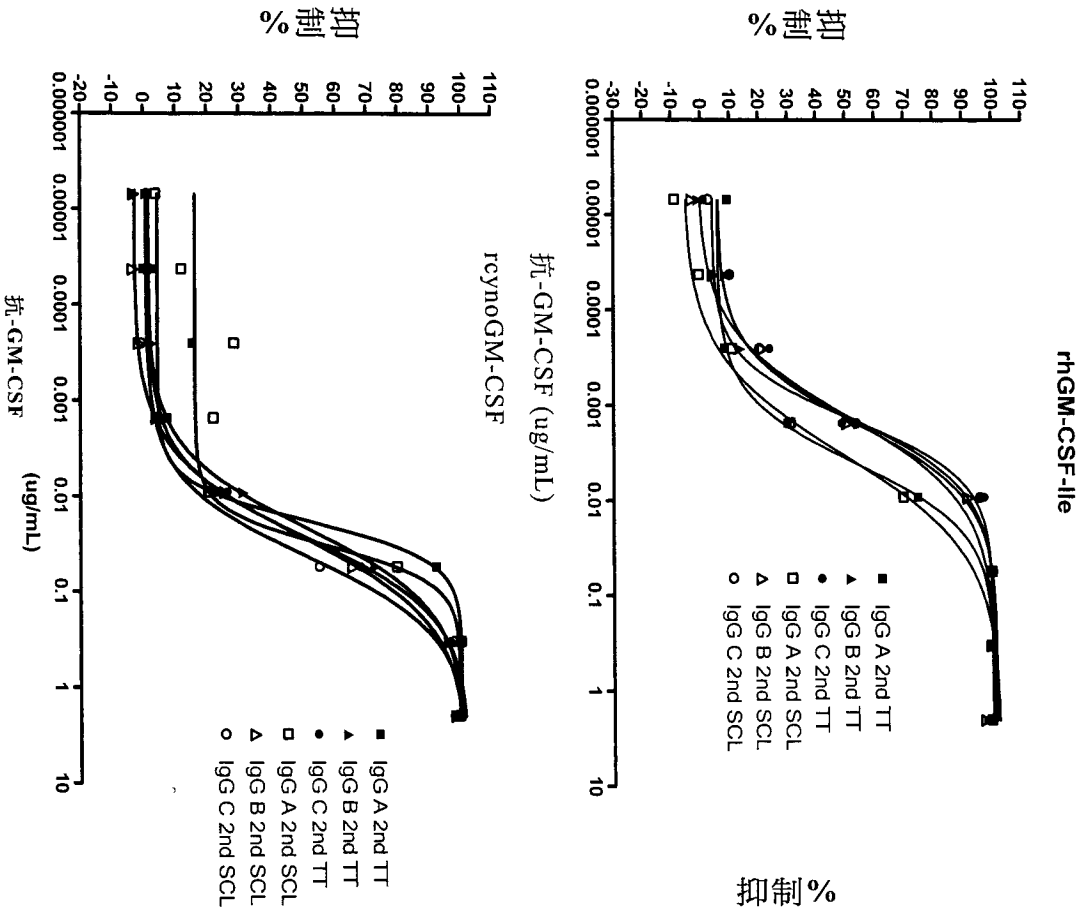


第 8b 圖





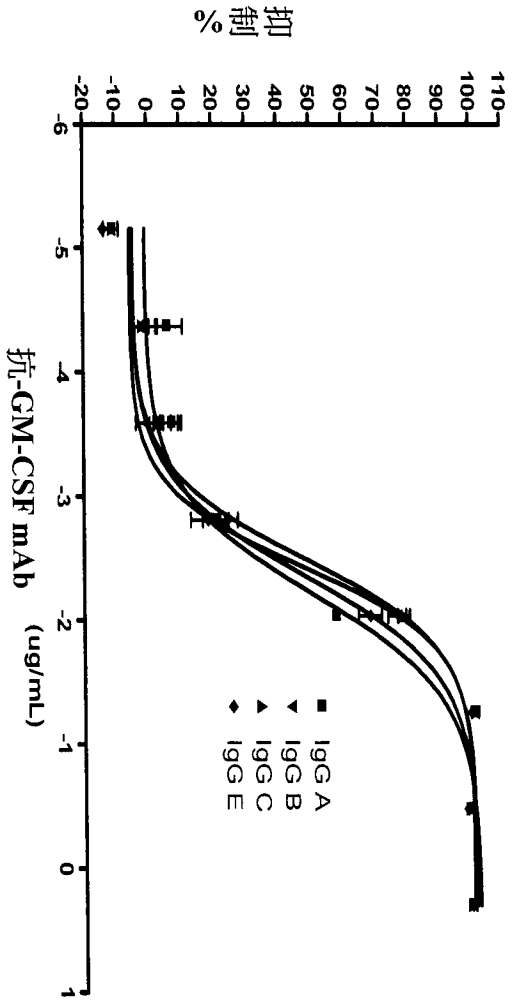
第 9 圖



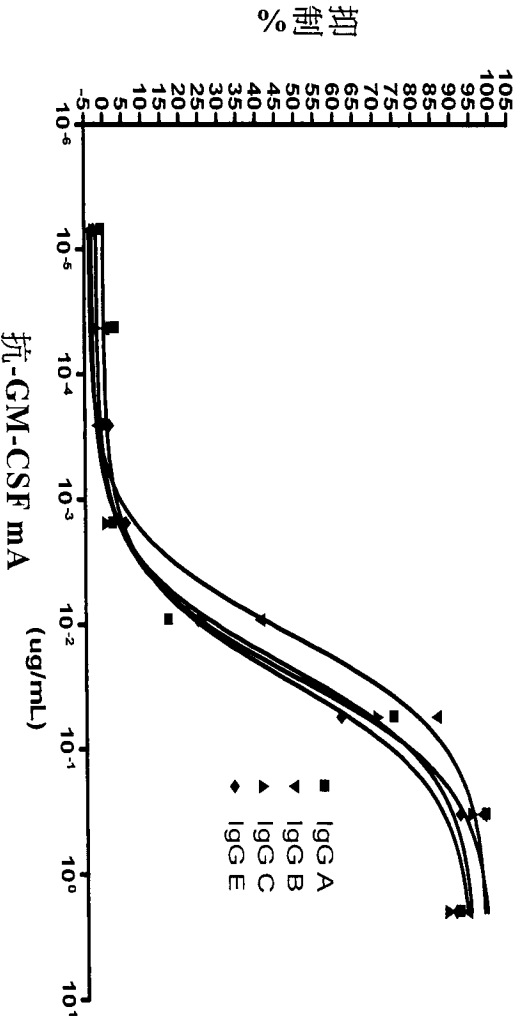
第 10 圖

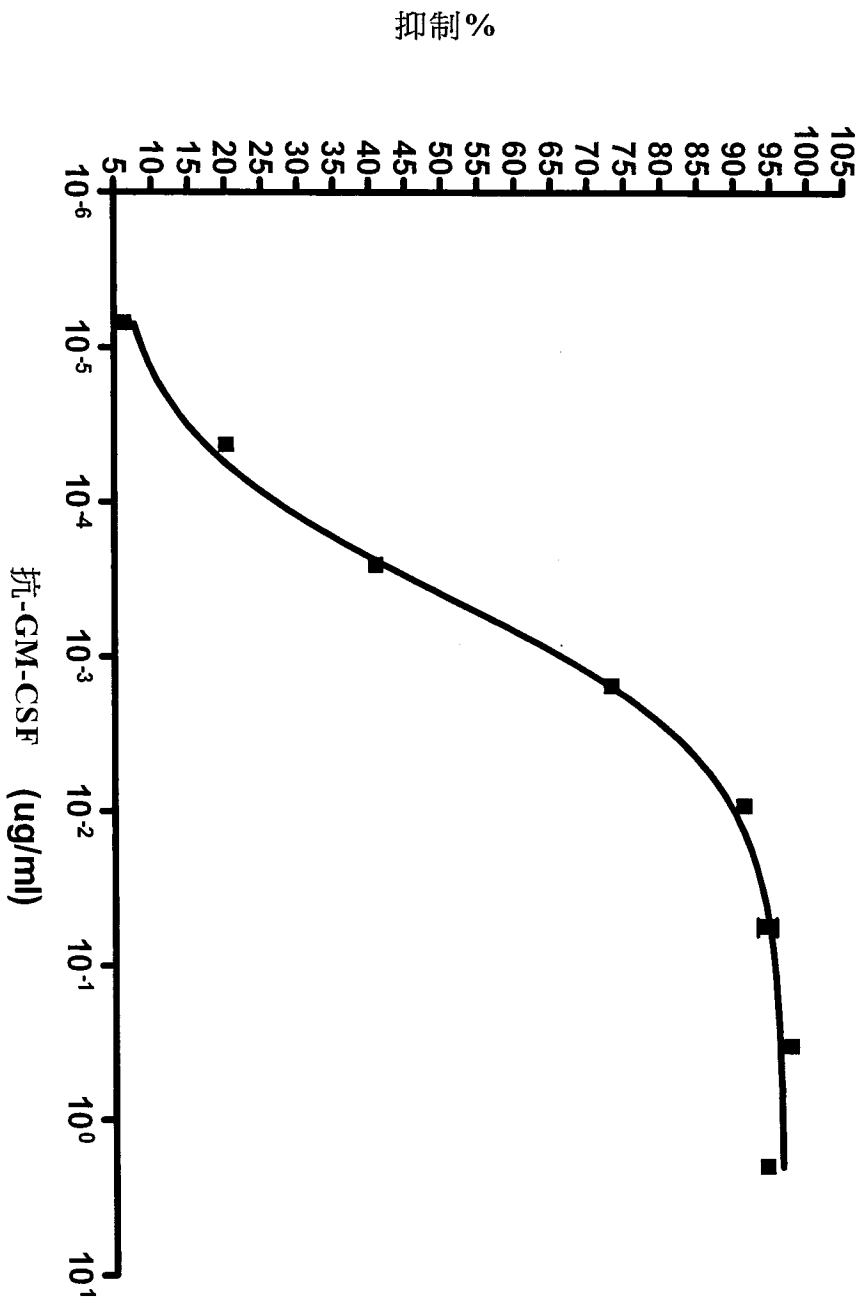
第 11 圖

SAEC 衍生之 nhGM-CSF (上清液)

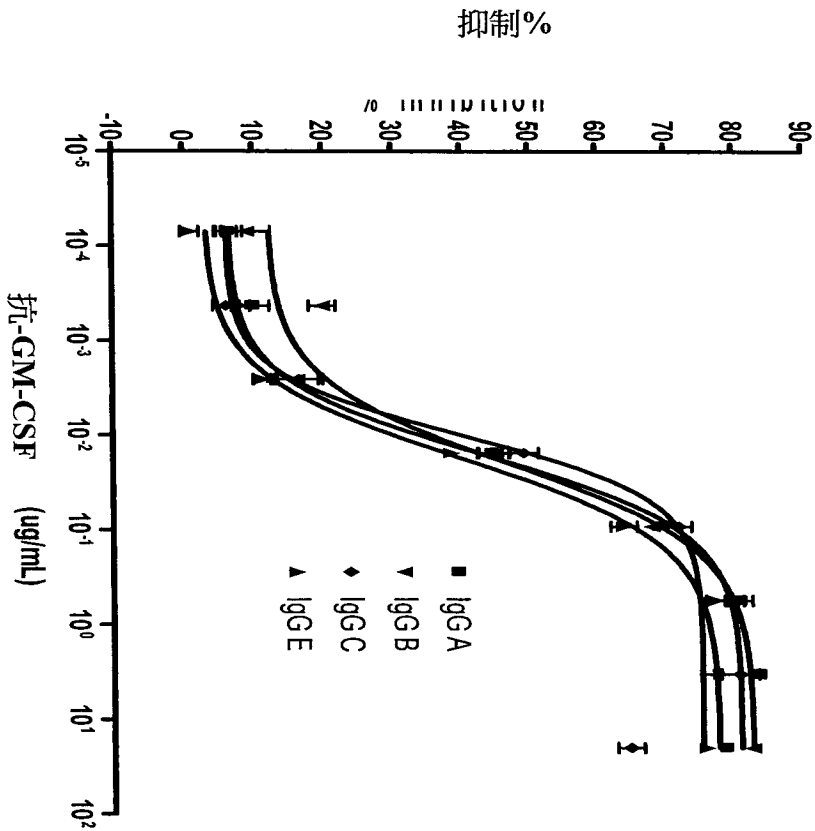
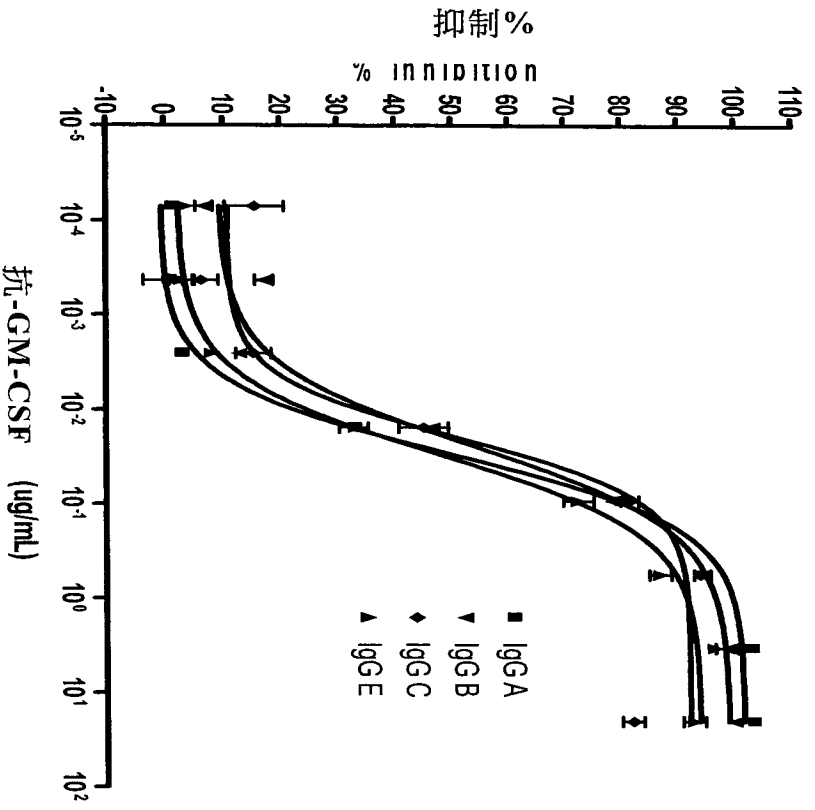


肺組織衍生之 ncynoGM-CSF (上清液)

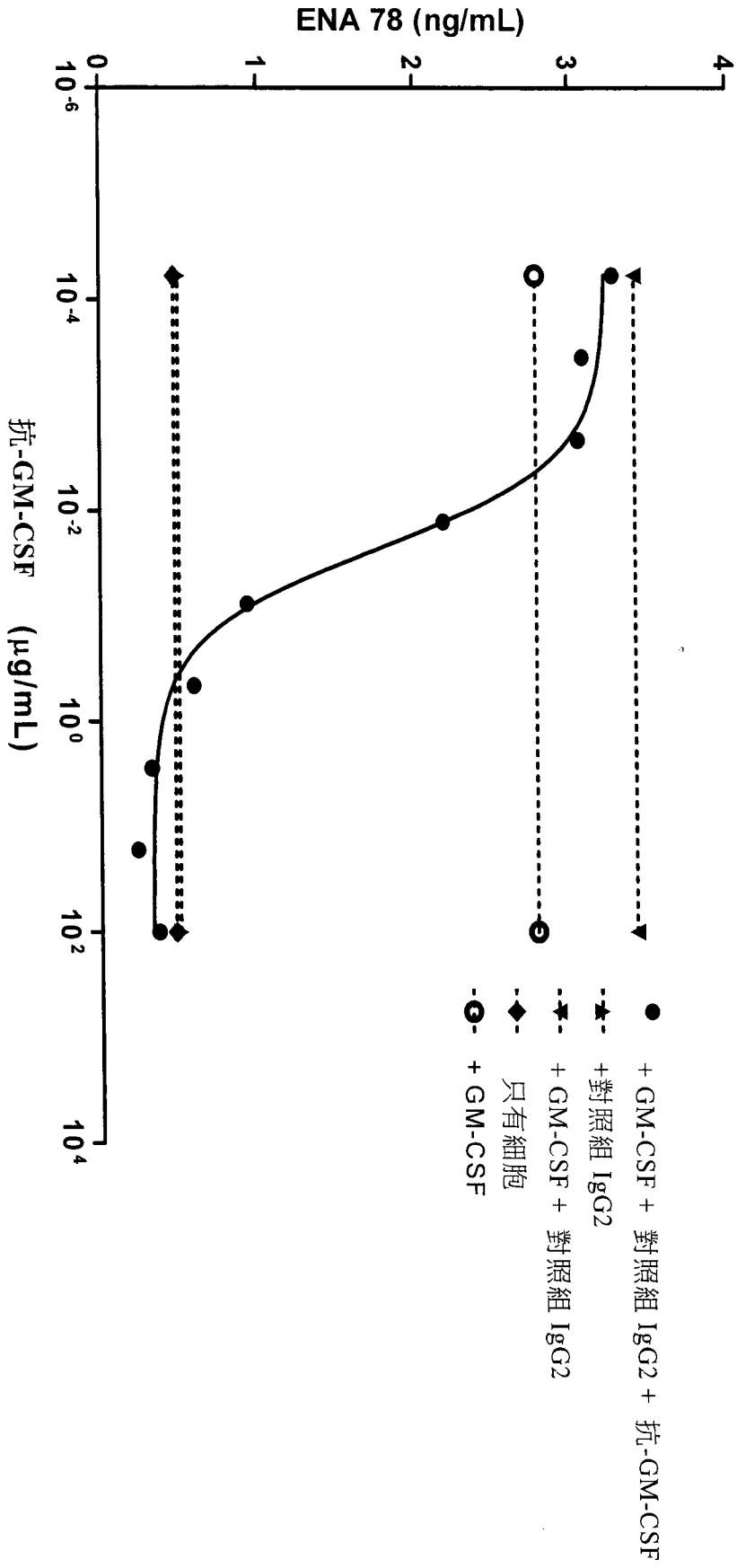




第 12 圖



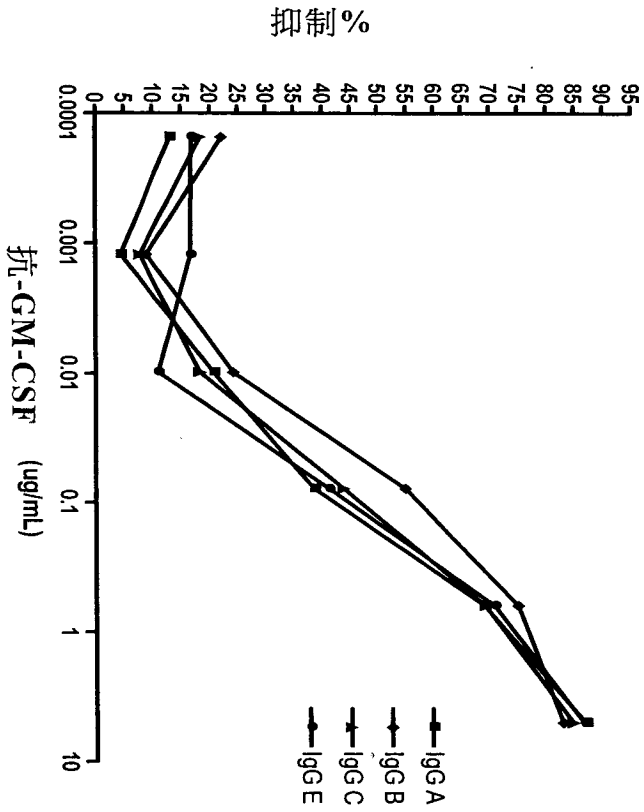
第 13 圖



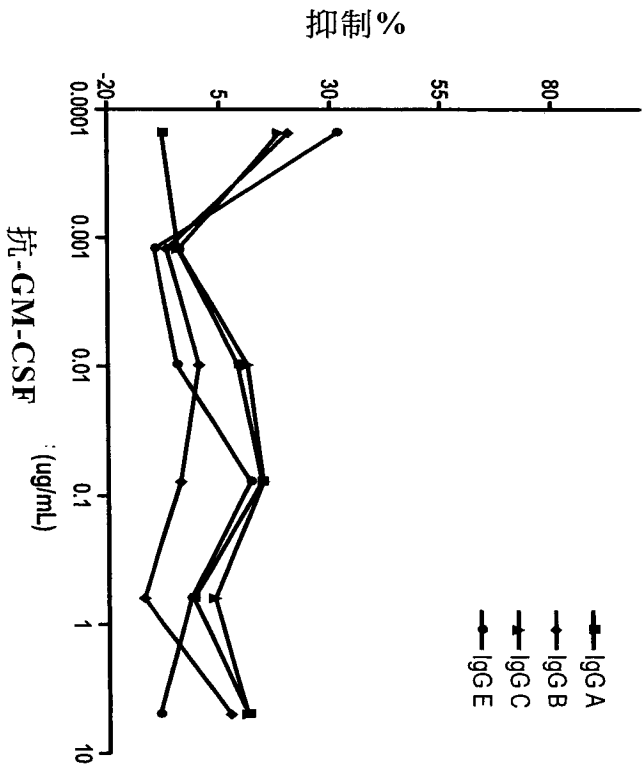
第 14 圖

第 15a 圖

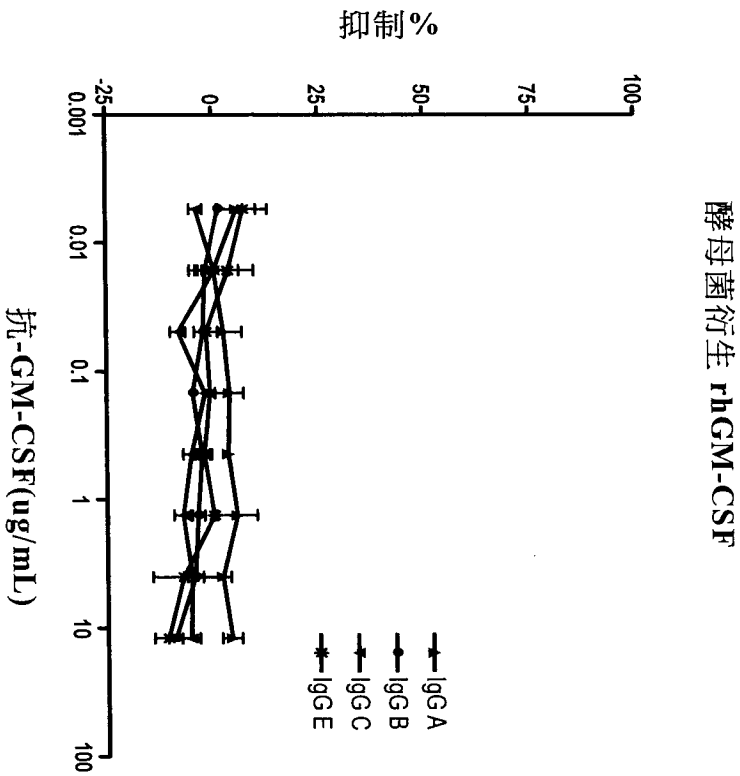
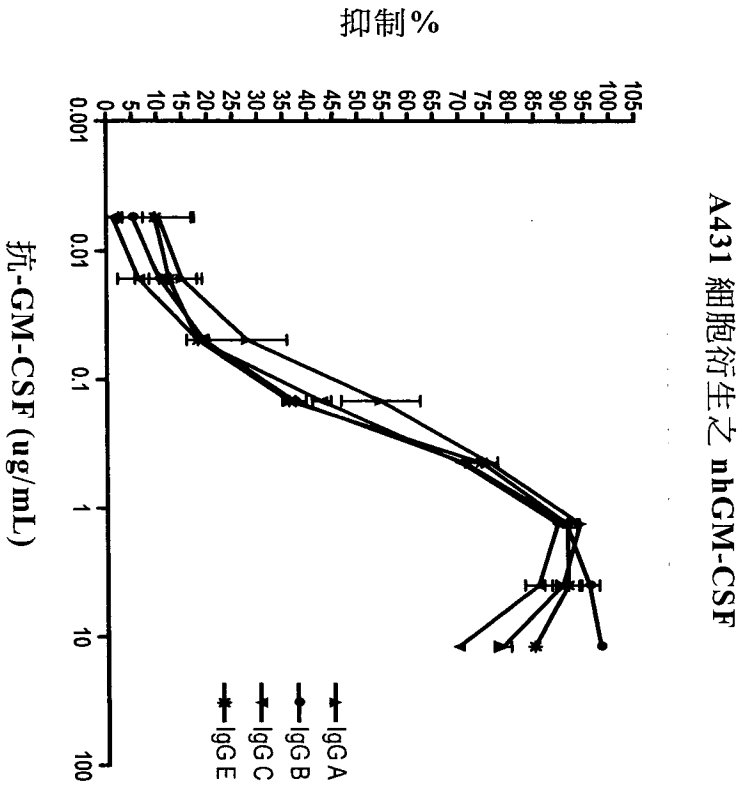
大腸桿菌衍生 rhGM-CSF



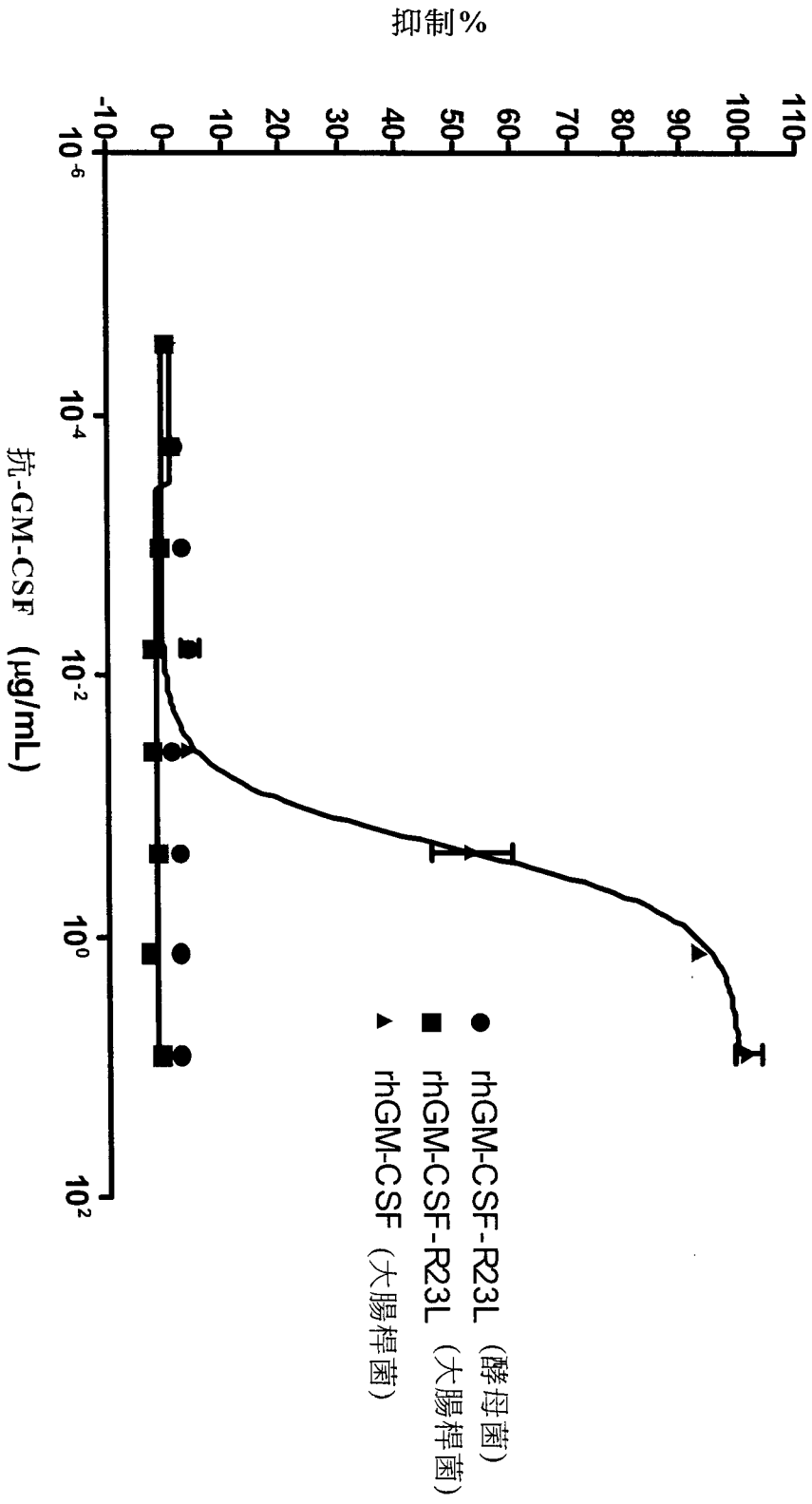
酵母菌衍生 rhGM-CSF







第 15b 圖



第 16 圖