



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I833685 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：105124167

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07K16/00 (2006.01)

G01N33/531 (2006.01)

C40B40/10 (2006.01)

(30)優先權：2015/07/31 美國

62/199,346

(71)申請人：英商葛蘭素史密斯克藍智慧財產發展有限公司(英國) GLAXOSMITHKLINE
INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：朵爾 奧斯汀 凱特 DOYLE, AUSTIN KEITH (IE)；海羅 蘿拉 瑪莉亞 HALO,
LAURA MARIA (FI)；哈汀 艾瑪 R HARDING, EMMA R. (GB)；利維斯 艾倫
彼得 LEWIS, ALAN PETER (GB)；尤登 馬克 UDEN, MARK (GB)；戴米安
薇樂露 DAMIAN, VALERIU (US)；洪璇 HONG, XUAN (CN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

期刊 ZHENG, Yanan, et al. Minipig as a potential translatable model for monoclonal antibody pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration. MABs. 4:2, 2012. p. 243-255.

期刊 T.Igawa et al: Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. Protein Engineering, Design & Selection vol. 23 no. 5 2010. pp. 385-392.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：7 共 38 頁

(54)名稱

預測抗體之生物利用度之方法

(57)摘要

本發明係關於選擇、篩分、工程設計、製造及修飾抗體之方法，該等抗體當以皮下投藥方式投與人類後具有經改良之生物利用度。本發明亦描述當以皮下投藥方式投與人類後具有經改良之生物利用度之抗體及變異體抗體。

The present invention relates to methods of selecting, screening, engineering, making and modifying antibodies that have improved bioavailability upon subcutaneous administration to a human. Antibodies and variant antibodies with improved bioavailability upon subcutaneous administration to a human are also described.

指定代表圖：

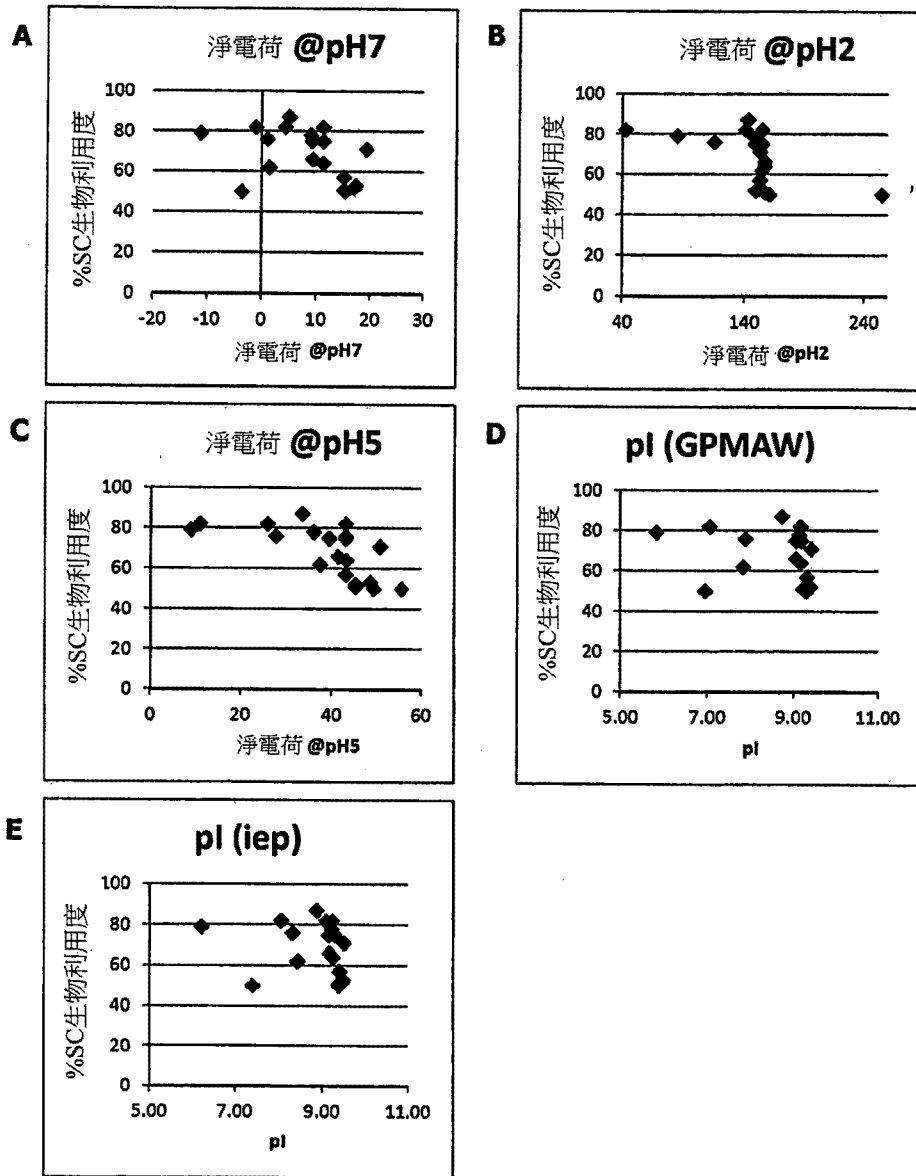


圖 1



I833685

發明摘要

※ 申請案號：105124167

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

預測抗體之生物利用度之方法

METHOD OF PREDICTING THE BIOAVAILABILITY OF AN
ANTIBODY

【中文】

本發明係關於選擇、篩分、工程設計、製造及修飾抗體之方法，該等抗體當以皮下投藥方式投與人類後具有經改良之生物利用度。本發明亦描述當以皮下投藥方式投與人類後具有經改良之生物利用度之抗體及變異體抗體。

【英文】

The present invention relates to methods of selecting, screening, engineering, making and modifying antibodies that have improved bioavailability upon subcutaneous administration to a human. Antibodies and variant antibodies with improved bioavailability upon subcutaneous administration to a human are also described.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1A-1E）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

預測抗體之生物利用度之方法

METHOD OF PREDICTING THE BIOAVAILABILITY OF AN
ANTIBODY

【技術領域】

本發明係關於選擇、篩分、工程設計、製造及修飾抗體之方法，該等抗體當以皮下投藥方式投與人類後具有經改良之生物利用度。本發明亦描述當以皮下投藥方式投與人類後具有經改良之生物利用度之抗體及變異體抗體。

【先前技術】

皮下(Subcutaneous；SC)施用抗體藥物產品涉及投藥至皮下組織(下皮)之細胞外間隙中。SC投藥具有許多優點，諸如自我投藥、經改良之病患順從性及降低之醫療保健成本。一旦經投藥，抗體藥物產品便使用各種作用機制。雖然SC投藥途徑盛行，但當投藥時抗體之生物利用度仍然理解不足。生物利用度(Bioavailability；BA)係達到全身循環且受到前全身代謝及全身吸收之相對速率影響之藥物之百分比。用於全身吸收之路徑包含透過淋巴管間接運送至血液及經由擴散直接運送至注射位點周圍之血管中。皮下注射之抗體達到峰值血漿濃度通常花費2至8天。抗體之BA之範圍通常在40%與85%之間。

因此，BA會影響需要施用之抗體藥物產品之總量，其因此影響商品之成本。在可皮下輸送之有限體積(1 ml至1.5 ml)及受限於黏度與凝聚傾向之濃度之情況下，改良BA可增加所投藥之有效劑量。

然而，當前並無在人類臨床試驗之前可精確預測抗體藥物產品之BA之方法。諸如嚙齒動物、馬來猴(Cynomolgus monkey)及哥丁根

(Göttingen)小型豬之臨床前動物模型並非總是可確實地預測人類BA。

因此，此項技術有需要預測當人類受試者以皮下投藥方式投與抗體後之藥物產品的生物利用度。

【發明內容】

根據本發明之第一態樣，提供一種選擇抗體之方法，其包括：

(a)產生對相同抗原之兩個或兩個以上抗體；及(b)選擇具有以下之抗體序列：

(i)在約pH 7下較接近+5之淨電荷或較接近8.8之pI；及/或

(ii)在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI；其中經選擇之該抗體具有較高生物利用度。

根據本發明之進一步態樣，提供一種製造抗體之方法，其包括選擇且組合兩個或兩個以上人類生殖系架構胺基酸序列、區或胺基酸以產生具有以下之抗體：在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI；其中經產生之該抗體具有較高生物利用度。

根據本發明之進一步態樣，提供一種改良抗體之生物利用度之方法，其包括修飾該抗體之胺基酸序列以致使：在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI。

根據本發明之進一步態樣，提供一種使用在約pH 7下之淨電荷或pI預測抗體之生物利用度之方法，其中經改良之生物利用度與在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI係有相關性。

根據本發明之進一步態樣，提供一種製造抗體序列庫之方法，其中該抗體序列庫經工程設計以包括具有在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI之抗體；其中自該抗體序列庫衍生之抗體具有至少60%之生物利用度。

根據本發明之進一步態樣，提供一種以所描述之方法之任何一者產生之抗體。

根據本發明之進一步態樣，提供一種親本抗體序列之變異體，其中該變異體包括組合兩個或兩個以上人類生殖系架構序列、區或胺基酸以產生具有以下之變異體抗體：(i)相較於該親本抗體，在約pH 7下更接近+5之淨電荷或更接近8.8之pI；及/或

(ii)相較於該親本抗體，在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI；其中該變異體抗體具有高於該親本抗體之生物利用度。

根據本發明之進一步態樣，提供一種用於將抗體以皮下投藥方式投與人類之方法，其包括對需要其之病患投與如本文中描述之該抗體或如本文中描述之該變異體。

根據本發明之進一步態樣，提供一種抗體序列庫，其中該抗體序列庫經工程設計以包括具有在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI的抗體。

【圖式簡單說明】

圖1：基於表4之人類皮下生物利用度與在pH 7下(圖1A)、在pH 2下(圖1B)、在pH 5下(圖1C)之淨電荷或使用GMAW平均值(圖1D)或iep (圖1E)針對abtaccept(阿巴西普)、etanercept (恩博)、riloncept (利那西普)、certolizumab (賽妥珠單抗)、denosumab (狄諾塞麥)、tralokinumab(妥樂奇單抗)、omalizumab (奧馬珠單抗)、rituximab (利妥昔單抗)、trastuzumab (曲妥珠單抗)、mAb1、belimumab (貝利木單抗)、mAb2、mAb3、canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、ustekinumab (優特克)、tocilizumab(塔西單抗)、mAb4、golimumab (高利單抗)及efalizumab(依法利珠單抗)計算之pI之間之關係。

圖2：生物利用度與在pH 7下之淨電荷(圖2A)或pI (iep) (圖2B)之間之關係，其強調IgG1與「其他」之間之差，IgG1包含：mAb1、

belimumab (貝利木單抗)、mAb2、mAb3、canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、ustekinumab (優特克)、tocilizumab (塔西單抗)、mAb4、golimumab (高利單抗)及efalizumab (依法利珠單抗)；「其他」包含abtacept(阿巴西普)、etanercept (恩博)、riloncept (利那西普)、certolizumab (賽妥珠單抗)、denosumab (狄諾塞麥)、tralokinumab(妥樂奇單抗)、omalizumab (奧馬珠單抗)、rituximab (利妥昔單抗)及trastuzumab (曲妥珠單抗)。

圖3：Actemra (安挺樂)及「IgG1」(mAb1、belimumab (貝利木單抗)、mAb2、mAb3、canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、ustekinumab (優特克)、tocilizumab、mAb4、golimumab (高利單抗)及efalizumab (依法利珠單抗))之BA值相較於pH 7下之淨電荷之關係。

圖4：針對四個IgG (canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、golimumab (高利單抗)、ustekinumab (優特克)及「其他」(etanercept (恩博)、Rilanocept (雷那西普)及omalizumab (奧馬珠單抗))之馬來猴生物利用度數據與在pH 7下之淨電荷之關係。

圖5：使用GMAW、pepstats及iep計算之certolizumab (賽妥珠單抗)、trastuzumab (曲妥珠單抗)、tralokinumab(妥樂奇單抗)、abtacept(阿巴西普)、denosumab (狄諾塞麥)、belimumab (貝利木單抗)、etanercept (恩博)、rituximab (利妥昔單抗)、canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、omalizumab (奧馬珠單抗)、ustekinumab (優特克)、tocilizumab、golimumab (高利單抗)、efalizumab (依法利珠單抗)及riloncept (利那西普)之pI值之比較。

圖6：基於表6之針對內部mAb 2、5至23之實驗pI值與由GMAW計算之計算pI值之比較。

圖7：pI及在pH 7下之電荷之比較，兩者係使用GMAW使用內部

及文獻抗體作為測試集計算。

【實施方式】

發明者已確定，治療性抗體當以皮下方式投與人類後之生物利用度(BA)與在約pH 7下之淨電荷或pI之間之意想不到的相關性。此相關性可預測以皮下投藥方式投與人類後抗體之BA。使用此預測相關性，即有可能製造、篩分、選擇、修改及工程設計出以皮下方式投與人類後具有經改良之BA之抗體序列。

以此方式改良BA可減少原料藥(Active Pharmaceutical Ingredient; API)商品成本(Cost of Goods; COG)。此外，以此方式改良BA亦會影響其中劑量係使得(例如)對於病患或如相較於競爭分子，注射之頻率或體積將太高或歸因於黏度問題將難以配製濃度之抗體之商業可行性。

本發明之方法可致使抗體具有經改良之BA。該改良可以是經改良之預測性BA。經改良之BA係以實例中所提供之相關性為基礎。本發明之方法可致使抗體具有60%至100%、或65%至100%、或70%至100%、或75%至100%之生物利用度。

本文中描述之抗體可具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%之BA。BA值可為預測性BA值。BA值係以皮下投藥方式將該抗體投與人類為基礎。

在本文中將「生物利用度」(BA)定義為達到全身循環之藥物之百分比。生物利用度係基於群體PK模型化或基於皮下劑量研究之估計。生物利用度可進一步區分為相較於遵循靜脈內投藥之形式(100%)之給定劑量形式之「絕對生物利用度」(例如，皮下對靜脈內)及相較於由相同或另一非靜脈內途徑投藥之另一形式之「相對生物利用度」(例如，皮下上臂對皮下大腿)。舉例而言，本文中描述之經改良BA係基於實例中所提供之相關性之經改良之預測性BA。

本文中使用的「約」在指可量測值(諸如量、分子量、持續時間及類似者)時意謂涵蓋自指定值變動 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.75\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.25\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 及 $\pm 0.1\%$ ，此係因為此等變動適合於執行所描述之方法。

如本文中使用的「抗體」係指IgG (諸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgM、IgA、IgD或IgE抗體或抗體之片段(諸如Fab、F(ab')₂、Fv、以雙硫鍵連接之Fv、scFv、封閉構形多特異性抗體、以雙硫鍵連接之scFv、雙特異抗體)，其衍生自自然產生抗體之任何物種或藉由重組DNA技術建立，自血清、B細胞、融合瘤、轉染瘤、酵母或細菌分離出抗體。抗體可係單株、重組、多株、嵌合(例如，來自不同源(例如，人類/小鼠嵌合抗體)或不同抗體類型(例如，IgG2/4抗體))、人類、人化、多特異性(包含雙特異性)或雜錯合抗體(heteroconjugate antibody)。

抗體可為IgG1抗體。抗體可為全長IgG抗體。抗體可為人類或人化或類人抗體。抗體可為人類或人化或類人IgG1抗體。抗體可為單株抗體。抗體可為重組或合成。輕鏈可為 κ 輕鏈或 λ 輕鏈。

抗體可能非IgG1 Fc-融合或IgG1 Fab片段。抗體可能不具有跨兩個IgG1鏈之極端電荷分佈異質性。在存在玻尿酸酶(hyaluronidase)之情況下無法配製抗體。

「CDR」定義為抗體上之互補性決定區。存在三個重鏈CDR及三個輕鏈CDR。因此，本文中使用的術語「CDR」係指全部三個重鏈CDR、全部三個輕鏈CDR或全部重鏈及輕鏈CDR。

此說明書全文中，抗體序列中之胺基酸殘基係根據Kabat編號慣例加以編號。

本文中將「淨電荷」定義為從胺基酸序列判定之抗體之總(全域)電荷。抗體內之任何特定區(即，Fc區、Fv區、CDR、輕鏈或重鏈)似乎不是主要角色，因此淨電荷係抗體之全序列的組合。可使用抗體之

重鏈及輕鏈兩者計算淨電荷。舉例而言，可使用整個抗體序列(包含C-端離胺酸)計算淨電荷。另外，可使用抗體之重鏈及輕鏈兩者計算pI。舉例而言，可使用整個抗體序列(包含C-端離胺酸)計算pI。通常在投藥之前或在投藥時，於製造或儲存抗體藥物產品期間截斷/移除C-端離胺酸。若自抗體序列排除C-端離胺酸(例如若藥物產品故意不含有C-端離胺酸)，則淨電荷將為「x」減2。

可使用以下方程式手動計算淨電荷：

在pH 7.0下之電荷=(1 x Asp數量) + (1 x Glu數量) - (1 x Lys數量) - (1 x Arg數量) - (0.05 x His數量)。

可使用GPMAW (General Protein/Mass Analysis for Windows)計算淨電荷。或者，可使用EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) pepstats (K、R = +1.0；H = +0.5；D、E = -1.0)計算淨電荷。EMBOSS pepstats使用與GPMAW相同之方程式但設定His = 0.5(預設參數)。排除His的部份(即，His = 0)後提供之數值更接近由GPMAW產生之數值。

可藉由在不同pH下調整在His上及在Asp/Glu殘基上之電荷而決定不同pH下之淨電荷。舉例而言，可由熟習此項技術者計算在pH 2、pH 5、pH 6及/或pH 7下之淨電荷。

可計算在約pH 7下之抗體序列之淨電荷。應瞭解，如本文中使用的「約pH 7」係指近似值，因此「約pH 7」可指6.6至7.4、6.7至7.3、6.8至7.2、6.9至7.1之pH範圍。發明者已發現，此pH範圍下之淨電荷與BA最佳相關。pH 7亦在SC環境中最具生理相關性，其約7.1至7.4。舉例而言，使用計算程式計算在pH 7下之抗體序列之淨電荷。用於計算淨電荷之運算方法可為GPMAW。利用約pH 7下之淨電荷可能比利用pI為更可靠的BA預測器。

本文中定義帶電荷胺基酸如下表1中。其他所有的天然胺基酸則

分類為中性。

表1：帶電荷胺基酸之概述

電荷	胺基酸	3-字母碼	1-字母碼
正	精胺酸	Arg	R
	組胺酸	His	H
	離胺酸	Lys	L
負	天門冬胺酸	Asp	D
	麩胺酸	Glu	E

「pI」係指蛋白質上淨電荷為零之pH。此可由各種方法(例如，實驗地或運算地)計算。舉例而言，可使用帶電荷殘基之pKa值自蛋白質序列計算pI。例如藉由使用等電聚焦而實驗地判定「實驗pI」。可以各種方式執行等電聚焦，諸如使用基於凝膠之方法或使用毛細管IEF。當使用運算方法時，可藉由考量Asp、Glu、Lys、Arg及His殘基但亦考量Cys及Tyr以及N-及C-端殘基之pKa值而計算pI。存在可用於計算pI之若干程式，例如GPMaw、EMBOSS pepstats及EMBOSS iep。GPMaw使用三種不同方法且引用來自全部三種方法之pI值。可使用三個GPMaw pI值之平均值。所使用之確切方程式以及pKa值跨三個程式變動。

用於計算pI之運算方法可係GPMaw、EMBOSS pepstats或EMBOSS iep。可使用GPMaw (平均值)或iep計算pI。舉例而言，使用GPMaw (平均值)以計算pI。可使用與實驗pI相關之任何運算方法計算pI值。

「pKa」係酸的解離常數(亦稱為酸度常數或酸電離常數)或酸之解離反應之平衡常數之 $-\log_{10}$ ，其係溶液中之分子之酸強度之量化量測。

本文中描述之方法容許調諧總抗體電荷或抗體之pI以改良生物利用度。本發明者已驚訝地發現，在本文中描述之值內調諧全域電荷或

抗體之pI可導致經改良之生物利用度。本文中描述一種調諧IgG1之電荷之方法，其包括選擇，篩分、工程設計、製造且修飾IgG以致使在約pH 7下較接近+5之淨電荷及/或在約pH 7下計算之0與+12之間之淨電荷。

使用本文中描述之淨電荷及pI值，可選擇、製造或修飾抗體、變異體抗體或抗體序列庫以致使抗體具有經改良之BA。可選擇、組合、工程設計、製造或修飾抗體之胺基酸序列以改良生物利用度。

抗體之淨電荷係介於約pH 7下可在0與+12之間，以確保藉由皮下投藥方式投與人類之足夠生物利用度。淨電荷可介於0至+10、或0至+8、或0至+5之間。舉例而言，淨電荷介於+1至+12、或+1至+10、或+1至+8、或+1至+5之間。或者，抗體之淨電荷介於+4至+12、或+4至+10、或+4至+8、或+4至+6之間。發明者已發現，高生物利用度與具有約+5之淨電荷之抗體是有相關性。

抗體之pI係介於8.4與9.3之間，以確保藉由皮下投藥方式投與人類之足夠生物利用度。舉例而言，pI係介於8.5至9.3、或8.5至9.25、或8.5至9.2之間。或者，抗體之pI係介於8.6至9.3、或8.6至9.25、或8.6至9.2、或8.6至9.1、或8.6至9.0之間。pI係介於8.7與9.1、或8.7與9.0、或8.7與8.9之間。發明者已發現，高生物利用度與具有約8.8之pI之抗體具有相關性。

本文中描述一種選擇抗體之方法，其包括：(a)產生對相同抗原之兩個或兩個以上抗體；及(b)選擇具有以下之抗體序列：

(i)在約pH 7下較接近+5之淨電荷或較接近8.8之pI；及/或

(ii)在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI。所選擇之抗體與其他抗體區分，此係因為抗體之淨電荷或pI係在本文中描述之值內，且所選擇之抗體具有大於其他抗體之生物利用度。舉例而言，該方法係涉及選擇具有當以皮下投藥方式投與人類之

經改良之生物利用度之抗體。

本文中描述一種製造抗體之方法，其包括選擇且組合兩個或兩個以上人類生殖系架構序列、區或胺基酸以產生具有以下之抗體：在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI。

亦描述一種重新抗體設計之方法，其包括組合兩個或兩個以上人類生殖系架構序列、區或胺基酸以產生具有以下之嵌合抗體：(i)在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或(ii)介於8.4與9.3之間之pI。

本文所描述之方法及變異體抗體中兩個或兩個以上人類生殖系架構序列之組合可涉及整個架構可變或恆定序列、架構區或架構胺基酸。組合涉及來自不同人類抗體生殖系序列之(若干)胺基酸。

抗體之胺基酸序列可經組合、經工程設計或經修飾，以改良生物利用度。胺基酸可來自另一人類抗體序列(例如，另一人類生殖系序列)之天然產生之胺基酸。因此，當投與給人類後可減少免疫反應之風險。

特定言之，係描述組合、工程設計或修飾架構區或恆定區。舉例而言，未改變互補性決定區(CDR)。因此，任何抗體序列改變將對抗原結合沒有影響或極低影響。舉例而言，抗體仍保持其抗原-結合活性。

本文中描述一種改良以皮下投藥方式投與人類之抗體之生物利用度之方法，其包括修飾抗體之胺基酸序列以致使：在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI。

該修飾包括進行一或多個胺基酸取代；或至少一個胺基酸取代。取代可在選自Fc或Fv區之區域進行。取代可在Fv區進行。舉例而言，取代在架構1、架構2、架構3及/或架構4中。特定言之，取代不在CDR中。

舉例而言，取代係在重鏈上。另一種是，取代在輕鏈上。或

者，存在至少兩個胺基酸取代，其等可在相同鏈(重或輕)上或在不同鏈(重及輕)上。

每個抗體可存在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸取代。

取代可為變成不同的胺基酸且係選自另一人類抗體生殖系序列。

本文中描述係親本抗體序列之變異體之變異體抗體，其中變異體包括組合兩個或兩個以上人類生殖系架構序列、區或胺基酸。變異體與親本抗體可區分，此係因為抗體之淨電荷或pI在本文中描述之值內。變異體具有大於親本抗體之生物利用度。

當相較於其他抗體序列時，藉由本文中描述之方法選擇之抗體或本文中描述之變異體抗體具有介於1與20之間之淨電荷差，諸如1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2。或者，當相較於其他抗體序列時，抗體具有1與4之間之淨電荷差，諸如1至2。當相較於其他抗體序列時，抗體具有1之淨電荷差(例如，正變成中性、或負變成中性、或反之亦然)。熟習此項技術者應理解，淨電荷差可具有總正或負電荷差(即，+1或-1、+2或-2、+3或-3、+4或-4等)，端視所進行之胺基酸取代而定。

根據殘基，來自不同人類生殖系序列之胺基酸經選擇、經工程設計、經組合、經修飾或經取代，其中：

- (a)正胺基酸改變成中性胺基酸或負胺基酸；
- (b)負胺基酸改變成中性胺基酸或正胺基酸；或
- (c)中性胺基酸改變成正胺基酸或負胺基酸。

經選擇、經工程設計、經組合、經修飾或經取代之胺基酸係選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H1、H6、H12、H13、

H16、H19、H23、H43、H75、H81、H83、H85、L17、L18、L42、L74、L77或L79。胺基酸取代係選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H6、H12、H13、H16、H19、H23、H43、H75、H81、H83、H85、L17、L18、L42、L74、L77或L79。胺基酸取代可選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H6、H12、H13、H16、H19、H23、H43、H75、H85、L17、L18、L42、L74、L77或L79。胺基酸取代可選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H12、H16、H19、H43、H75、L17、L18、L74或L79。胺基酸取代可選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H12、H16、H43、H75、L17、L18或L74。

經選擇、經組合、經修飾或經取代之胺基酸可選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H1、H6、H12、H19、H75、L17、L42、L74、L77或L79。胺基酸取代可選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H6、H12、H75、L42、L74、L77或L79。胺基酸取代可選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H12、H75、L74或L79。

經選擇、經組合、經修飾或經取代之胺基酸可為：

(a)在H1、H6、H85或L17下之中性胺基酸或負胺基酸；

(b)在H12、H19、H23、H75、H83、L18、L42、L74或L77下之中性胺基酸或正胺基酸；或

(c)在H13、H16、H43、H81或L79下之中性胺基酸或負胺基酸或正胺基酸。

胺基酸取代可為：

(a)在H1、H6或L17下之中性胺基酸或負胺基酸；

(b)在H12、H19、H75、L42、L74或L77下之中性胺基酸或正胺基酸；或

(c)在L79下之中性胺基酸或負胺基酸或正胺基酸。

在下文中之表2中概述在特定Kabat殘基處之可能胺基酸改變之實例。熟習此項技術者將瞭解，可對抗體、變異體、庫或在本發明涵蓋之方法中進行在上文中且在表2中論述之胺基酸改變之任何一者或一組合。

表2：：在抗體重鏈或輕鏈內之特定Kabat殘基處之胺基酸改變之實例。

Kabat 重鏈		取代-1電荷	取代-2電荷	取代+1電荷	取代+2電荷
1	E/Q	Q變成E (中性變成-)		E變成Q (-變成中性)	
6	E/Q	Q變成E (中性變成-)		E變成Q (-變成中性)	
12	V/K	K變成V (+變成中性)		V變成K (中性變成+)	
13	K/Q/E	K變成Q (+變成中性)	K變成E (+變成-)	Q變成K (中性變成+)	E變成K (-變成+)
16	R/Q/A/G/S/E	Q/A/G/S變成E (中性變成-) 或 R變成 Q/A/G/S (+變成中性)	R變成E (+變成-)	E變成 Q/A/G/S (-變成中性) 或 Q/A/G/S變成R (中性變成+)	E變成R (-變成+)
19	R/S/K/T	R/K變成S (+變成中性) K/R變成T (+變成中性)		S變成R/K (中性變成+) T變成K/R (中性變成+)	
23	A/K/T	K變成A/T (+變成中性)		A/T變成K (中性變成+)	
43	K/Q/R/E	K變成Q (+變成中性) Q變成E (中性變成-)	R變成E (+變成-)	Q變成K (中性變成+) E變成Q (-變成中性)	E變成R (-變成+)
75	K/T	K變成T (+變成中性)		T變成K (中性變成+)	
81	E/K/Q/R	Q變成E (中性變成-) K/R變成Q (+變成中性)	K變成E (+變成-)	E變成Q (-變成中性) Q變成K/R (中性變成+)	E變成K (-變成+)
83	R/T	R變成T (+變成中性)		T變成R (中性變成+)	
85	A/E	A變成E (中性變成-)		E變成A (-變成中性)	
Kabat 輕鏈					
17	E/D/Q	Q變成E/D		E/D變成Q	

		(中性變成-)		(-變成中性)	
18	R/P/S	R變成P/S (+變成中性)		P/S變成R (中性變成+)	
42	K/Q	K變成Q (+變成中性)		Q變成K (中性變成+)	
74	K/T	K變成T (+變成中性)		T變成K (中性變成+)	
77	R/S	R變成S (+變成中性)		S變成R (中性變成+)	
79	Q/E/K/T	Q變成E (中性變成-) K變成T (+變成中性)		E變成Q (-變成中性) T變成K (中性變成+)	

舉例而言，可在單一抗體中進行以下取代之任何一者或組合：

H12：V變成K (中性胺基酸變成正胺基酸= +1電荷)

H16：A/G/S變成E (中性胺基酸變成負胺基酸= -1電荷)

H19：R變成S (正胺基酸變成中性胺基酸= -1電荷)

H43：K變成Q (正胺基酸變成中性胺基酸= -1電荷)

H75：K變成T (正胺基酸變成中性胺基酸= -1電荷)或T變成K (中性變成正= +1電荷)

L17：E/D變成Q (負胺基酸變成中性胺基酸= +1電荷)

L18：R變成P/S (正胺基酸變成中性胺基酸= -1電荷)

L74：K變成T (正胺基酸變成中性胺基酸= -1電荷)

L79：Q變成E (中性胺基酸變成負胺基酸= -1電荷)

熟習此項技術者將瞭解，若對抗體進行本文中建議之胺基酸改變，則總電荷改變將加倍，此係因為在抗體分子之重鏈或輕鏈兩者上進行胺基酸改變，例如，位置H12處從V改變成K(即，中性胺基酸變成正胺基酸= +1電荷)將導致總抗體電荷+2電荷變化，此係因為將在兩個重鏈上進行此改變。

本文中描述一種製造抗體序列庫之方法，其中該庫經工程設計，以包括具有在約pH 7下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI之抗體。本文亦描述一種製造抗體之方法，其包括自抗體序

列庫分離出抗體。

應理解，製造抗體序列庫之方法可包括胺基酸架構殘基以確保自庫衍生之抗體具有本文中描述之淨電荷及/或pI值。舉例而言，該庫具有如上文論述之固定胺基酸位置(例如，參見上文中之表2中論述之改變)。

以下架構序列可在抗體序列庫中達成在約pH 7.0下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI：

(a)在H1、H6、H85、L3或L17下之中性胺基酸或負胺基酸；

(b)在H12、H19、H23、H75、H83、L18、L42、L74或L77下之中性胺基酸或正胺基酸；或

(c)在H13、H16、H43、H81或L79下之中性胺基酸或負胺基酸或正胺基酸。

術語「庫」係指異質性多肽或核酸之混合物，該庫係由該等成員構成，每一成員各具有單一多肽或核酸序列。針對本文範圍，「庫」與「指令表(repertoire)」同義。庫成員之間的序列差異致使該庫中呈現多元性。該庫可採取多肽或核酸之簡單混合物之形式或可使用核酸之庫轉換之生物或細胞(例如，細菌、病毒、動物或植物細胞)之形式。在一個實例中，各個別生物或細胞僅含有一個或有限數目個庫成員。核酸可併入表達載體中以容許由核酸編碼之多肽之表達。庫可採取一群宿主生物之形式，各生物含有表達載體之一或多個複本，該表達載體含有可經表達以產生其對應多肽成員之呈核酸形式之庫之單一成員。因此，該群宿主生物具有編碼各種多肽之巨大指令表之潛能。該庫可為噬菌體(phage) (例如，噬菌體(bacteriophage))、酵母或核糖體庫。

本文中描述人類親本抗體序列之變異體，其中變異體包括組合兩個或兩個以上人類生殖系架構序列、區或胺基酸以產生具有以下之

變異體抗體：(i)相較於親本抗體，在約pH 7.0下更接近+5之淨電荷或更接近8.8之pI；及/或(ii)相較於親本抗體序列，在約pH 7.0下介於0與+12之間之淨電荷或介於8.4與9.3之間之pI。可以如上文論述之相同方式修飾親本抗體以產生親本抗體序列之變異體。舉例而言，在Fv區中進行胺基酸取代。胺基酸取代不在互補性決定區(CDR)中。當相較於親本抗體序列時，變異體可具有1與4之間之淨電荷差。胺基酸取代可：(a)將正胺基酸改變成中性胺基酸或負胺基酸；(b)將負胺基酸改變成中性胺基酸或正胺基酸；或(c)將中性胺基酸改變成正胺基酸或負胺基酸。在一項實施例中，胺基酸取代係在選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H1、H6、H12、H13、H16、H19、H23、H43、H75、H81、H83、H85、L17、L18、L42、L74、L77或L79。胺基酸取代係在選自以下之Kabat殘基之任何一者或組合下：H12、H16、H19、H43、H75、L17、L18、L74或L79。

變異體抗體之淨電荷在約pH 7下係介於0與+12之間以確保藉由以皮下投藥方式投與人類之足夠生物利用度。淨電荷係介於0至+10、或0至+8、或0至+5之間。舉例而言，淨電荷係介於+1至+12、或+1至+10、或+1至+8、或+1至+5之間。或者，抗體之淨電荷係介於+4至+12、或+4至+10、或+4至+8、或+4至+6之間。發明者已發現，高生物利用度與具有約+5之淨電荷之抗體具有相關性。

變異體抗體之pI係介於8.4與9.3之間以確保藉由以皮下投藥方式投與人類之足夠生物利用度。舉例而言，pI係介於8.5至9.3、或8.5至9.25、或8.5至9.2之間。或者，抗體之pI係介於8.6至9.3、或8.6至9.25、或8.6至9.2、或8.6至9.1、或8.6至9.0之間。pI係介於8.7與9.1、或8.7與9.0、或8.7與8.9之間。發明者已發現，高生物利用度與具有約8.8之pI之抗體具有相關性。

可使用整個抗體序列(包含C-端離胺酸)計算淨電荷。舉例而言，

變異體仍保持其抗原-結合活性。變異體可為IgG1抗體。

本文中描述(製造、選擇、修飾、變異體、得自方法)之抗體具有經改良之BA，例如基於實例中所提供之相關性之預測BA。抗體具有60%至100%、或65%至100%、或70%至100%、或75%至100%之生物利用度。抗體具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%之BA。

現在將參考以下實例更詳細解釋本發明。

實例

包括以下實例用以證實電荷或pI與當以皮下投藥方式輸送給人類後之生物利用度之間的相關性，並提供可增加抗體之經預測生物利用度之方法的支持。

實例1 - 人類生物利用度數值

自文獻或內部檔案識別藉由皮下注射而被投藥之二十個抗體。此等抗體列舉在表3中。此等抗體之生物利用度之範圍自43%至87%。

表3：關於商業抗體序列及內部抗體之生物利用度數據。

產品	非專利名稱	Ab格式	目標/MoA	參考	人類SC BA (%)
mAb1		人類IgG1		內部	87
Cimzia™	Certolizumab pegol (培化賽妥 珠單抗)	聚乙二醇化人化Fab片段	TNF- α	McDonald	82
Herceptin™	trastuzumab (曲妥 珠單抗)	人化IgG1	HER2	EMA	82
	tralokinumab(妥樂 奇單抗)	人類IgG4	IL13	Baverel	82
Orencia™	Abtacept(阿巴西 普)	CTLA-4 Fc (IgG1)融合	CD80/86	EMA	79
Prolia™	denosumab (狄諾 塞麥)	人類IgG2	RANKL	EMA	78
Benlysta™	belimumab (貝利)	人類IgG1	BLyS	Cai	76

	木單抗)				
Enbrel™	etanercept (恩博)	TNFR-Fc (IgG1)融合	TNF- α	EMA	76
mAb2		人化IgG1		內部	75
mAb3		人化IgG1		內部	75
Mabthera™	rituximab (利妥昔 單抗)	小鼠/人類嵌合IgG1	CD20	EMA	71
Ilaris™	canakinumab (康 納單抗)	人類IgG1	IL-1 β	EMA	66
Humira™	adalimumab (阿達 木單抗)	人類IgG1	TNF- α	EMA	64
Xolair™	omalizumab (奧馬 珠單抗)	人化IgG1	IgE	EMA	62
Stelara™	ustekinumab (優 特克)	人類IgG1	p40 (IL- 12/23)	EMA	57
Actemra™	tocilizumab (塔西 單抗)	人化IgG1	IL-6R	EMA	53 (80)
mAb4		人類IgG1		內部	52
Simponi™	golimumab (高利 單抗)	人類IgG1	TNF- α	EMA	51
Raptiva™	efalizumab (依法 利珠單抗)	人化IgG1	CD11a	EMA	50
Arcalyst™	rilonacept (利那西 普)	ILRAP-ILR1-Fc (IgG1)	IL-1- β	EMA	50

EMA: 歐洲藥品管理局

以tocilizumab (塔西單抗)而言，53%之BA係用以取代EMA之80%預測值。此在實例2中論述。

參考：McDonald等人之(2010年) Curr. Opin. Mol. Ther.2(4)，第461-70頁；Cai等人之(2013年) Clin. Pharmacol. Drug Dev.2(4)，第349-357頁；Baverel等人之(2012年) Eur. Resp. J. 40 (Suppl 56)：第2340頁

實例2：人類生物利用度相關性

分子量及劑量之初步分析未顯示可解釋廣泛範圍之BA值之明顯相關性。藉由使用GeneDoc軟體，使V區與C區序列對準，檢查十四個

全長抗體。無法辨識出致使生物利用度變動之明顯序列特徵。

接著，評估進一步序列性質。使用GPMAW (在pH 2.0、5.0及7.0下，即在不同pH下調整His上及Asp/Glu上之電荷)計算淨電荷。EMBOSS iep及GPMAW計算pI。iep及GPMAW兩者可在一還原(-SH)及非還原(-SS)狀態中計算蛋白質之pI。GPMAW亦使用三種不同方法計算pI，且因此跨該等方法產生一平均值。

接著使此等性質值與生物利用度值相關，如表4及圖1中展示。

表4：針對個別抗體序列之淨電荷及pI與生物利用度值之相關性

Ab	格式	SC BA (%)	淨電荷@	淨電荷@	淨電荷@	平均pI (GPMA W-SS)	pI (iep)
			pH 2.0 (GPMAW)	pH 5.0 (GPMAW)	pH 7.0 (GPMAW)		
mAb1	IgG1	87	142.3	33.5	5.1	8.73	8.88
Cimzia™ (Certolizumab pegol(培化賽妥珠單 抗))	Fab	82	42.3	11	4.3	9.16	9.09
Herceptin™ (trastuzumab (曲妥珠 單抗))	IgG1	82	154.3	43.1	11.3	9.15	9.24
Tralokinumab	IgG4	82	140.7	26	-1	7.05	8.06
Orencia™ (abatacept (阿巴西 普))	Fc融合	79	84.7	9	-11.2	5.83	6.22
Prolia™ (denosumab (狄諾塞 麥))	IgG2	78	148.3	36	9	9.12	9.22
Benlysta™ (belimumab (貝利木 單抗))	IgG1	76	150.7	43.1	9.4	9.10	9.21
Enbrel™ (etanercept (恩博))	Fc融合	76	114.7	27.8	1.1	7.87	8.32
mAb2	IgG1	75	148.3	39.4	9.2	9.04	9.15

mAb3	IgG1	75	154.3	43.1	11.3	9.18	9.29
Mabthera™ (rituximab (利妥昔單 抗))	IgG1	71	152.3	50.7	19.3	9.41	9.51
Ilaris™ (canakinumab (康納單抗))	IgG1	66	156.3	41.4	9.3	9.05	9.17
Humira™ (adalimumab (阿達木 單抗))	IgG1	64	156.3	43.2	11.3	9.16	9.25
Xolair™ (omalizumab (奧馬珠 單抗))	IgG1	62	154.3	37.4	1.5	7.82	8.43
Stelara™ (ustekinumab (優特 克))	IgG1	57	152.3	43.1	15.1	9.31	9.40
Actemra™ (tocilizumab (塔西單 抗))	IgG1	53 (80)	152.3	48.5	17.3	9.33	9.48
mAb4	IgG1	52	148.7	45.3	17.1	9.39	9.48
Simponi™ (golimumab (高利單 抗))	IgG1	51	156.3	45.2	15.2	9.22	9.39
Raptiva™ (efalizumab (依法利 珠單抗))	IgG1	50	160.3	49.3	15.4	9.30	9.38
Arcalyst™ (rilonacept (利那西 普))	Fc融合	50	254.8	55.5	-3.6	6.95	7.41
皮爾遜(Pearson) (全 部)			-0.54	-0.64	-0.40	-0.19	-0.20
皮爾遜(排除其他)			-0.61	-0.85	-0.93	-0.87	-0.89

*星號標記係指「皮爾遜(排除其他)」以外的「其他」。「其他」包含 abtacept(阿巴西普)、etanercept (恩博)、rilonacept (利那西普)、certolizumab (賽妥珠單抗)、denosumab (狄諾塞麥)、tralokinumab(妥

樂奇單抗)、omalizumab (奧馬珠單抗)、rituximab (利妥昔單抗)及trastuzumab (曲妥珠單抗)，並且在下文中解釋排除之原因。

若在分析中包含全部抗體，則在pH 2.0及5.0下觀察到與GPMW淨電荷計算值之相關性(參見「皮爾遜(全部)」)。自圖表可見，所觀察到與其他參數之低相關性主要歸因於具有低淨電荷值之數據點(參見圖1)。在檢測時，其等似乎主要由非IgG1抗體組成。

藉由分子格式區分數據以聚焦於IgG1抗體，且排除具有跨分子之極端電荷分佈異質性之該等IgG1及在存在玻尿酸酶(其獨立改良BA)之情況下配製之該等IgG1，即顯然出現與皮下生物利用度之強相關性(參見圖2)及表4之「皮爾遜(排除其他)」中之-0.93之皮爾遜相關性。

圖2之「IgG1」包含：mAb1、belimumab (貝利木單抗)、mAb2、mAb3、canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、ustekinumab (優特克)、tocilizumab (塔西單抗)、mAb4、golimumab (高利單抗)及efalizumab (依法利珠單抗)。「其他」由以下組成：非全長IgG1：Fc-融合(abtacept(阿巴西普)、etanercept (恩博)、riloncept (利那西普))、Fab片段(certolizumab (賽妥珠單抗))；IgG2 (denosumab (狄諾塞麥))；IgG4 (tralokinumab(妥樂奇單抗))；omalizumab (奧馬珠單抗)，其係IgG1，但不尋常在於其具有跨分子之極端電荷分佈異質性(亦用於樂無喘(Xolair)之抗原係IgE且因此標靶結合性可能影響生物利用度)；及rituximab (利妥昔單抗)及trastuzumab (曲妥珠單抗)，其等係在存在玻尿酸酶之情況下配製(參見在EMA網站上及Shpilberg及Jackisch之(2013年) Br. J. Cancer, 109(6), 第1556-1561頁中描述之關於Rituximab™及Herceptin™之資訊)。

應注意，「皮爾遜相關性」係在此項技術中熟知之術語，其係指

在給予+1與-1之間(包含+1及-1)之值(其中+1係完全正相關性，0係無相關性且-1係完全負相關性)之情況下兩個變量X與Y之間之線性相依性之量測。

應注意，歐洲藥品管理局(EMA)報告Actemra™/tocilizumab (塔西單抗)提供80%之BA，其係基於群體PK模型化之估計(參見針對Actemra™/RoActemra™之EMA評估)且實質上高於在先前報告之單一劑量研究(參見Zhang等人之(2013年) *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 51(6)，第443-55頁)中觀察到的48.8%及56.5%。較低值(53%)之平均值在相關線上比估計值更緊密擬合(參見圖3)。平均值提供於表3、表4中及圖1及圖2中。

數據指示pH 7係用於計算電荷之最佳pH。低於此pH，皮爾遜相關性降低。針對最大生物利用度之在pH 7下之最佳電荷似乎為約+5或在0與+12之間。由於圖2a中之「其他」而難以預測在7下低於+5之電荷之效應。最佳電荷可實際上在0至+5之間或自+1至+5。

數據亦指示針對最大生物利用度之最佳pI似乎為約8.8或在8.4與9.3之間。由於圖2b中之「其他」而難以預測低於8.8之pI之效應。最佳pI可實際上在8.4與8.8之間。

比較電荷與pI數據建議：雖然兩者展示相關性，但相關性針對在pH 7數據下之電荷更佳。此在使用針對相同數據集之 R^2 值時經強化，其展示針對pH 7下之電荷之0.89之相關性及針對pI之0.73之相關性(由GPMaw計算)。「 R^2 」係指係兩個變量之間之相關性程度之量測之相關性係數之平方。

在人類生物利用度數據與淨電荷或pI劑量之間觀察到的強相關性不解譯為非人類模型。針對表3中列舉之四個IgG (canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、golimumab (高利單抗)、ustekinumab (優特克)及包含非IgG etanercept (恩博)及Rilanocept (雷那

西普)及IgG1 omalizumab (奧馬珠單抗)(具有極端電荷異質性)之「其他」關於在pH 7下其等之淨電荷繪製馬來猴數據(自Richter等人之(2012年) AAPS J. 14(3), 第559-570頁獲得)不導致任何明顯相關(參見圖4)。相比之下,存在此四個IgG針對人類BA與淨電荷或pI之明顯相關性。

實例3 - pI與電荷之間之關係的分析

本發明者已驚訝地發現,使用在約pH 7下之淨電荷及/或pI係在皮下輸送之後之人類生物利用度之良好預測器。此在下文中更詳細解釋。

可自蛋白質序列計算淨電荷及pI兩者。「淨電荷」係基於加總在特定pH下來自帶電荷殘基之貢獻之蛋白質之總電荷。因此,電荷將取決於pH而變動。

在約pH 7下(最接近其中注射SC藥物之細胞間隙),由GPMaw使用以下方程式計算淨電荷:

在pH 7.0下之電荷 = (1 x Asp數量) + (1 x Glu數量) - (1 x Lys數量) - (1 x Arg數量) - (0.05 x His數量)。

EMBOSS pepstats使用相同方程式但設定His = 0.5 (預設參數)。排除His貢獻(即, His = 0)提供更接近由GPMaw產生之值之值。

「pI」係蛋白質上淨電荷為零之pH。此可由各種方法使用帶電荷殘基之pKa值自蛋白質序列計算。可藉由考量Asp、Glu、Lys、Arg及His殘基但亦Cys及Tyr以及N-及C-端殘基之pKa值而計算pI。

發明者已使用三個不同程式GPMaw、EMBOSS pepstats及EMBOSS iep以計算pI。EMBOSS iep及GPMaw兩者考量分子之雙硫鍵狀態。所使用之確切方程式以及pKa值跨三個程式變動。GPMaw使用三種不同方法且引用來自全部三種方法之pI值。在表5中概述所使用之pKa值之變動。

表5：在不同程式中用於計算pI之pKa值

殘基	GPMaw 1 ^a	GPMaw 2 ^b	GPMaw 3 ^c	GPMaw Av	EMBOSS iep 及pepstats
Asp	3.9	3.82	3.5	3.7	3.9
Glu	4.3	4.18	4.5	4.3	4.1
Cys	8.3	8.26	10.3	9.0	8.5
Tyr	10.1	10.11	10.3	10.2	10.1
Lys	10.5	10.66	10.3	10.5	10.8
His	6	6.08	6.2	6.1	6.5
Arg	12.5	12.48	12.5	12.5	12.5

^aGPMaw 1 –來自 Skoog & Wichman (1986年) Trends Anal. Chem. , 3 , 第82-83頁 , [C(pos) = 1/(1+a) , 其中 a = 10^(pH_{test}-pKa) ; C(neg) = a/(1+a)]

^bGPMaw 2 –來自自由胺基酸

^cGPMaw 3 –來自Rickardet等人之(1991年) Anal. Biochem. , 197 (1) , 第197-207頁

殘基pKa值之差導致使用三個程式計算之pI值之某個變動，如由圖5針對來自文獻之16個抗體(certolizumab (賽妥珠單抗)、trastuzumab (曲妥珠單抗)、tralokinumab(妥樂奇單抗)、abtacept(阿巴西普)、denosumab (狄諾塞麥)、belimumab (貝利木單抗)、etanercept (恩博)、rituximab (利妥昔單抗)、canakinumab (康納單抗)、adalimumab (阿達木單抗)、omalizumab (奧馬珠單抗)、ustekinumab (優特克)、tocilizumab (塔西單抗)、golimumab (高利單抗)、efalizumab (依法利珠單抗)及rilonacept (利那西普))所繪示。

一些運算方法比其他運算方法與實驗數據更緊密相關。發明者已觀察到針對內部mAB2、5至23，來自GPMaw及EMBOSS iep之pI計算與內部實驗數據緊密相關(參見圖6及表6)。然而，應理解，可使用可計算對應於實驗pI之pI之任何適合運算方法。

表6：內部mAb之實驗及預測pI數據

mAb	實驗pI	GPMAW 1	GPMAW 2	GPMAW 3	pI Av GPMAW	iep pI
mAb5	7.52	8.37	8.42	8.25	8.35	8.65
mAb6	7.7	8.73	8.80	8.64	8.72	8.91
mAb7	7.86					8.97
mAb8	8.06	8.42	8.48	8.29	8.40	8.70
mAb9	8.22	8.93	8.98	8.88	8.93	9.04
mAb10	8.3	8.87	8.93	8.83	8.88	9.00
mAb11	8.54	9.04	9.09	9.00	9.04	9.14
mAb12	8.67	8.93	9.00	8.87	8.93	9.06
mAb13	8.71	9.11	9.17	9.09	9.12	9.22
mAb14	9.05	9.31	9.37	9.30	9.33	9.42
mAb15	9.16					9.47
mAb16	9.18	9.38	9.46	9.35	9.40	9.51
mAb17	9.23	9.29	9.36	9.26	9.30	9.41
mAb2		9.03	9.09	9.01	9.04	9.15
mAb18		8.39	8.45	8.25	8.36	8.67
mAb19		7.77	7.83	7.72	7.77	8.42
mAb20	8.23	8.86	8.92	8.82	8.87	9.00
mAb21	8.31	8.75	8.8	8.68	8.74	8.89
mAb22		6.7	6.76	6.87	6.78	7.61
mAb23	8.96	9.26	9.33	9.24	9.28	9.37
皮爾遜相關性		0.92	0.92	0.91	0.92	0.93

使用GPMAW，已觀察到pI與電荷之間之關係非線性(參見圖7)。使用內部或商業Ab作為測試集，在高於+5之電荷之情況下，pI不很大變動(在+5與+17之間之電荷下<1 pI單元)。然而，在此區中發現電荷與SC生物利用度之間之最佳相關性。在低於+5之電荷之情況下，pI隨著電荷降低而迅速降低。

因此，使用在約pH 7下之淨電荷可係BA之更可靠預測器。

實例4：識別取代位點

抗體之序列可加以修飾，以便當以皮下投藥方式投與人類時能改良BA。藉由使用GeneDoc軟體將V區與C區序列對準而檢查十五個抗體。

淨電荷非可歸因於特定區(CDR、架構或鏈)，但淨電荷經發現係由於跨兩個鏈之組合序列所導致。

除了V區之外，亦發現C區會影響所觀察之SC生物利用度，如由tralokinumab(妥樂奇單抗)及mAb1證實。此兩個抗體具有跨V區之類似淨電荷。然而，tralokinumab(妥樂奇單抗)係人類IgG4 λ2抗體而mAb1係人類IgG1 κ，且C區之淨電荷不同，不同於IgG4之中性，IgG1係帶正電荷(數據未列)。

Fc及Fv區兩者似乎在此相關性中未扮演主要角色，而總電荷係重要的。

執行經由電腦模擬(in silico)之序列分析，以識別其中可使用生殖系間突變修飾電荷之保守架構區內之潛在位置。

選擇可用於調整抗體電荷之特定殘基，如表7中展示。

表7：調整抗體電荷之潛在殘基

Kabat位置	正突變	負突變	中性突變
H1	-	Glu	Gln
H6	-	Glu	Gln
H12	Lys	-	Val
H13	Lys	-	Gln
H16	Arg	Glu	Gly
H19	Arg	-	Ser
H23	Lys	-	Ala
H43	Lys	-	Gln
H75	Lys	-	Thr
H81	Lys	Glu	Gln
H83	Arg	-	Thr
H85	-	Glu	Ala
L17	-	Glu	Gln

L18	Arg	-	Pro
L42	Lys	-	Gln
L74	Lys	-	Thr
L77	Arg	-	Ser
L79	-	Glu	Gln

跨一組人類生殖系序列個別進行表7中展示之突變，且藉由使用TE預測對MHC類別II之T細胞抗原決定部位進行預測而經由電腦模擬計算潛在免疫原性風險。

實例5 - 產生經修飾淨電荷之突變體

吾人可實驗性地評估突變是否為「良性」(即，對分子(例如，對結合、效價、產品品質、免疫原性等)沒有負面影響)。

將內部抗體序列對準以識別出適當的架構來評估突變。每一突變係在兩個不同抗體中進行。

表8：在選定抗體中之突變之概述

mAb12	mAb17	mAb19	mAb11
WT	WT	WT	WT
V12K (HC)	T75K (HC)	T75K (HC)	V12K (HC)
K75T (HC)	A16E (HC)	S16E (HC)	K75T (HC)
G16E (HC)	K74T (LC)	E17Q (LC)	R19S (HC)
R19S (HC)		K74T (LC)	K43Q (HC)
K43Q (HC)			D17Q (LC)
D17Q (LC)			R18P (LC)
R18P (LC)			Q79E (LC)
Q79E (LC)			

咸應注意，以每一胺基酸突變而言，總電荷改變會加倍，此係因為在抗體分子之兩個重鏈及/或兩個輕鏈上進行胺基酸改變，例如，位置H12處從V變成K (即，中性胺基酸變成正胺基酸= +1電荷)會導致總抗體電荷+2電荷變化，此係因為在兩個重鏈上進行此改變。

在藥物發明期間，此等可用的取代位點係為鑲飾或修飾抗體之

工具箱的部分，以便改良人類以皮下投藥方式投與的BA。替代性地，此等不同殘基可為抗體序列庫之部分，以確保衍生自該庫之抗體之靜電荷能夠最大化。

參考文獻

McDonald等人(2010年) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2(4)，第461-70頁

Cai等人(2013年) *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 2(4)，第349-357頁

Baverel等人(2012年) *Eur. Resp. J.* 40 (Suppl 56)：第2340頁

Shpilberg及Jackisch (2013年) *Br. J. Cancer*, 109(6)，第1556-1561

頁

Zhang等人(2013年) *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 51(6)，第443-55

頁

Richter等人(2012年) *AAPS J.* 14(3)，第559-570頁

Skoog及Wichman (1986年) *Trends Anal. Chem.*, 3，第82-83頁

Rickard等人(1991年) *Anal. Biochem.* 197(1)，第197-207頁

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種預測抗體之生物利用度之方法，其係利用抗體在pH 6.6至7.4下之淨電荷來預測其生物利用度，其中經改良之生物利用度與在pH 6.6至7.4下介於+4與+12之間之淨電荷有相關性，且其中該抗體係在玻尿酸酶不存在下配製之IgG1抗體。
2. 如請求項1之方法，其中該淨電荷係使用包含C-端離胺酸之整個抗體序列計算求得。
3. 如請求項1或2之方法，其中在pH 6.6至7.4下之該淨電荷係介於+4至+10之間。
4. 如請求項1或2之方法，其中在以下任何一個Kabat殘基或其組合處具有正胺基酸或負胺基酸或中性胺基酸：H1、H6、H12、H13、H16、H19、H23、H43、H75、H81、H83、H85、L17、L18、L42、L74、L77或L79。
5. 如請求項1或2之方法，其中當該抗體以皮下投與至人類後，具有至少60%、至少65%、至少70%或至少75%之生物利用度。

圖式

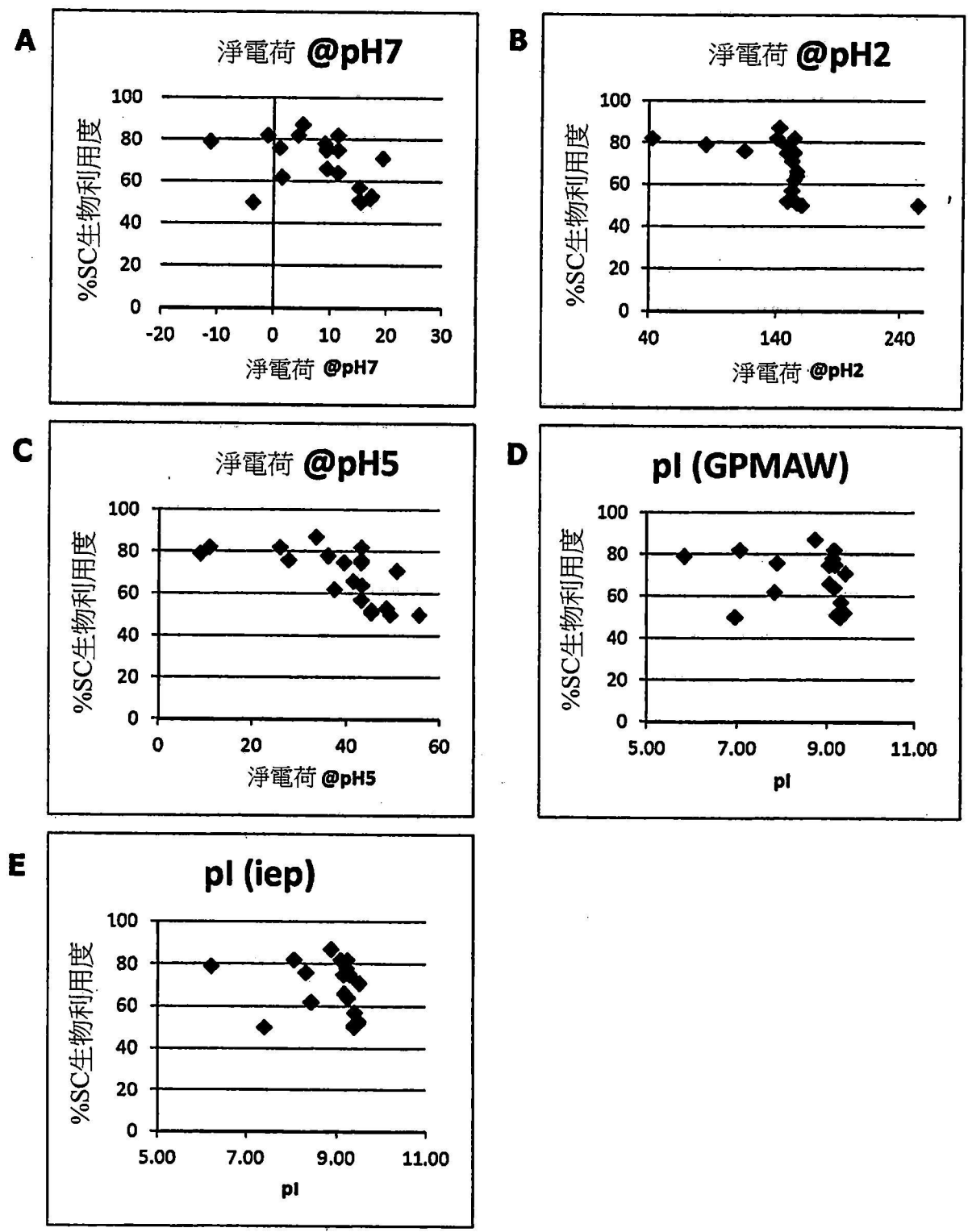
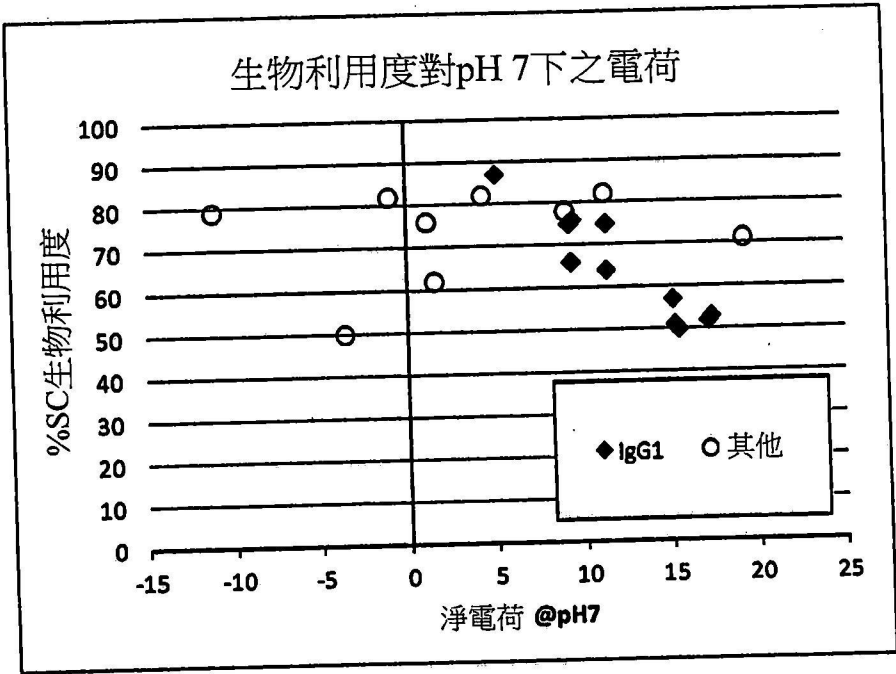


圖 1

A



B

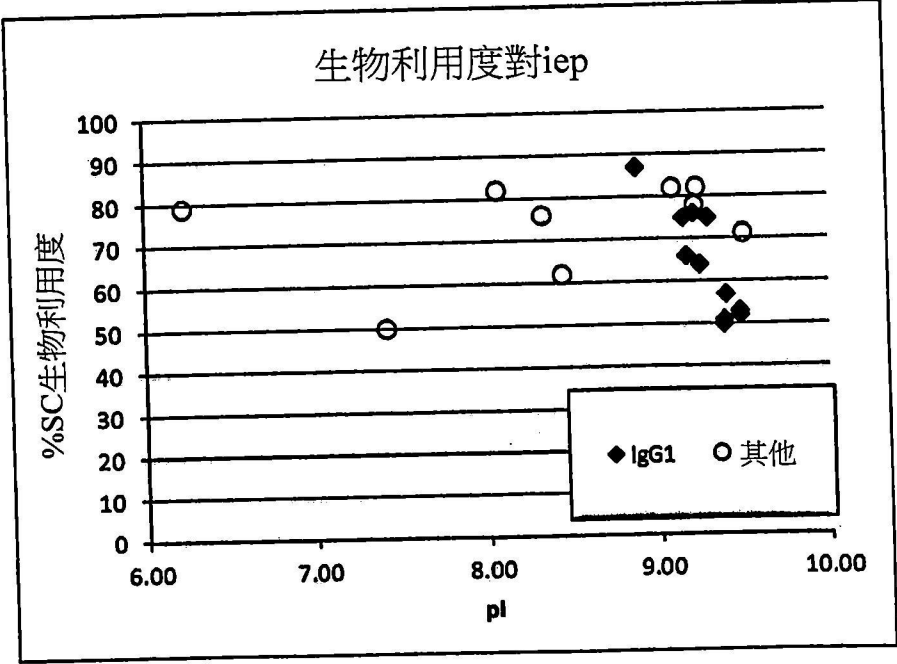


圖 2

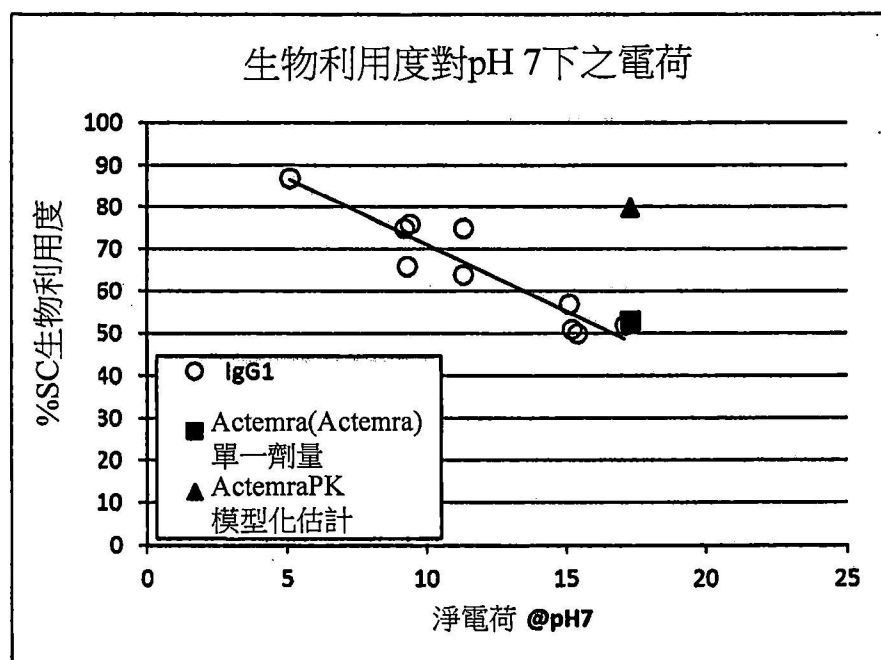


圖 3

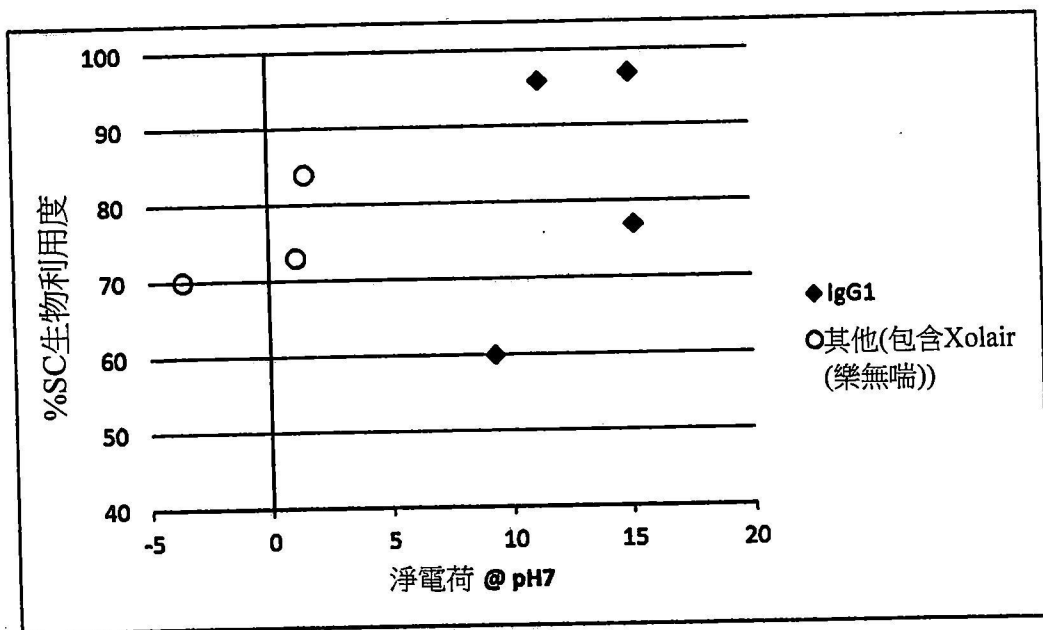


圖 4

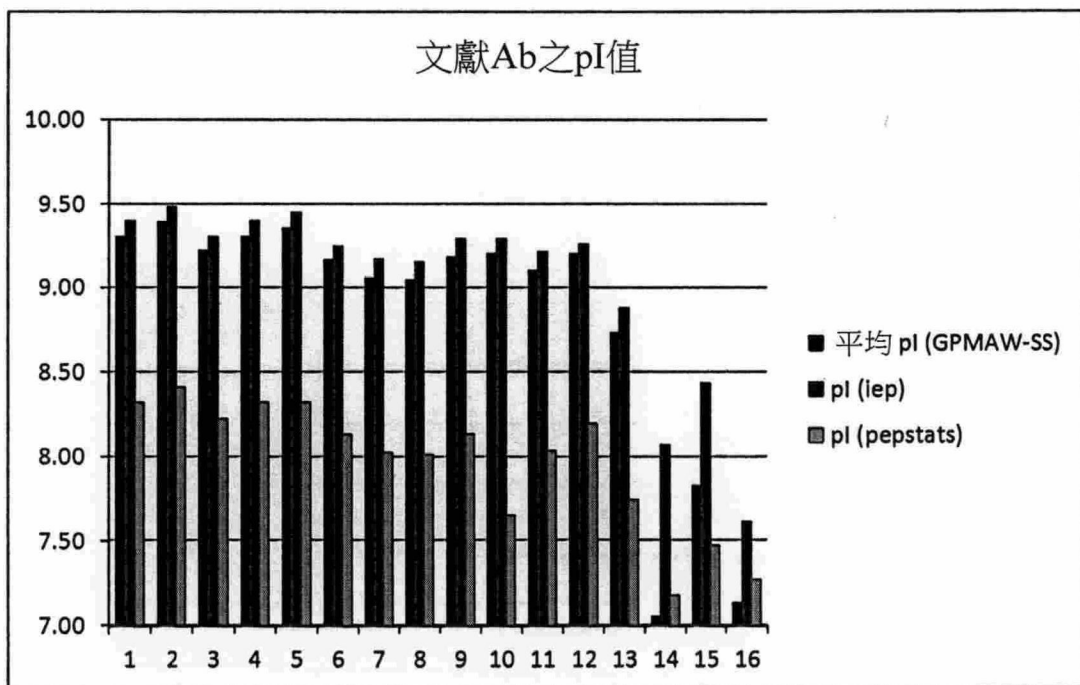


圖 5

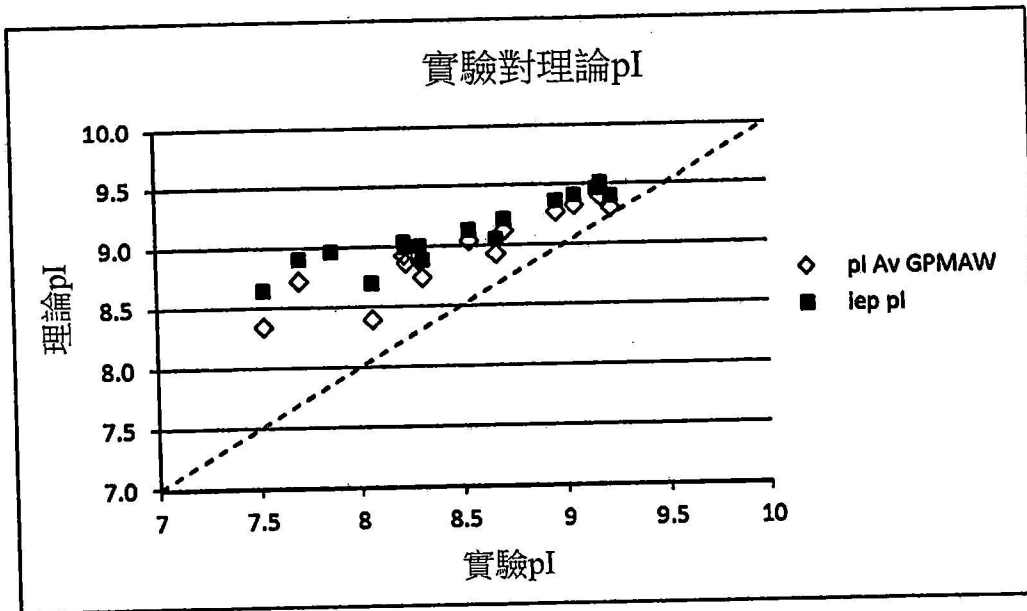


圖 6

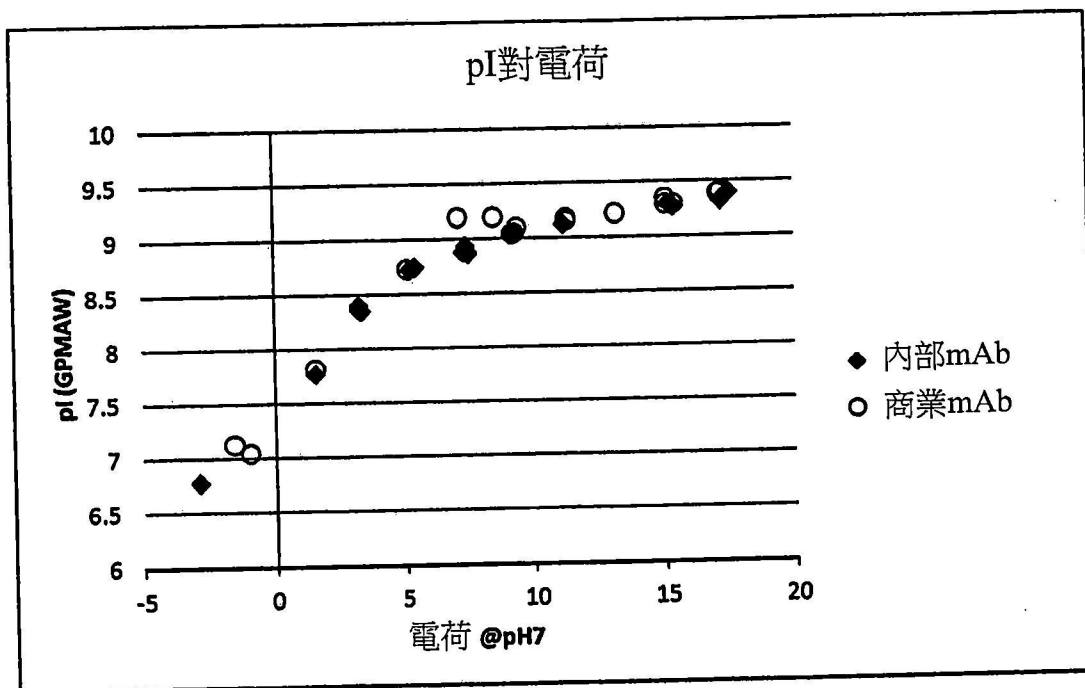


圖 7