



(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 I542597 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：100126848

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 28 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2010/07/28 美國 61/368,465

(71)申請人：吉林尼克公司(美國) GLIKNIK INC. (US)

美國

(72)發明人：布洛克 大衛 S BLOCK, DAVID S. (US)；歐爾森 亨利克 OLSEN, HENRIK (DK)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2008151088A2

BAZIN, LEMIEUX, TREMBLAY, and ST-AMOUR. Tetramolecular immune complexes are more efficient than IVIg to prevent antibody-dependent in vitro and in vivo phagocytosis of blood cells. British Journal of Haematology, 2004. Vol. 127, pages 90-96.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：13 共 137 頁

(54)名稱

產生依序多聚體化免疫球蛋白 F C 組合物之天然人類蛋白質片段之融合蛋白

FUSION PROTEINS OF NATURAL HUMAN PROTEIN FRAGMENTS TO CREATE ORDERLY MULTIMERIZED IMMUNOGLOBULIN FC COMPOSITIONS

(57)摘要

本發明涉及免疫球蛋白 Fc 之一系列完全重組多聚體化形式，藉此將多價免疫球蛋白 Fc 呈遞至免疫細胞受體。該等融合蛋白以同源二聚體(homodimeric)部分及稱為斯塔都聚體(stradomers)之高序多聚體部分二者存在。與該同源二聚體部分相比，經純化多聚體斯塔都聚體對 FcγRs 具有較高親和力及結合性(avidity)且解離較慢並可用於治療及預防疾病。本發明顯示，將 IgG1 Fc 區直接連接至多聚體化結構域會增強多聚體化及生物活性。

The current invention involves a series of fully recombinant multimerized forms of immunoglobulin Fc which thereby present polyvalent immunoglobulin Fc to immune cell receptors. The fusion proteins exist as both homodimeric and highly ordered multimeric fractions, termed stradomers. In comparison to the homodimeric fraction, purified multimeric stradomers have higher affinity and avidity for FcγRs with slower dissociation and are useful in the treatment and prevention of disease. The current invention demonstrates that directly linking IgG1 Fc regions to multimerization domains leads to enhanced multimerization and biological activity.

指定代表圖：

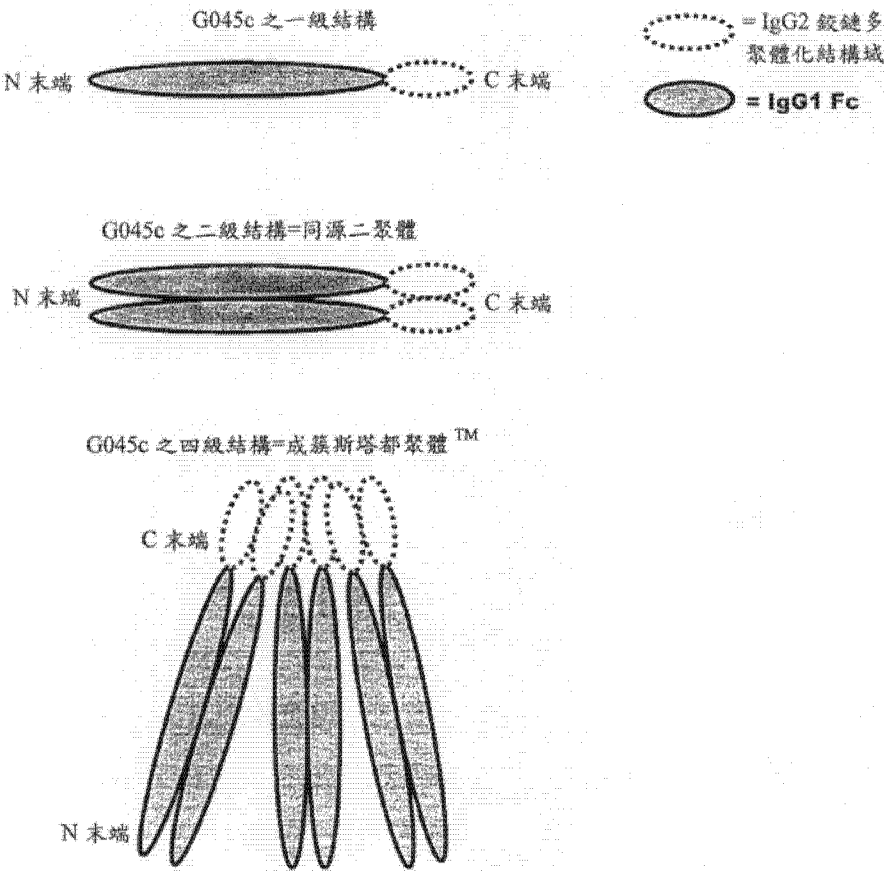


圖 1a

發明專利說明書

中文說明書替換本(102年3月) 15日

(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：100126848

C07K 16/28 (2006.01)

※ 申請日：100.07.28

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

產生依序多聚體化免疫球蛋白Fc組合物之天然人類蛋白質片段之融合蛋白

FUSION PROTEINS OF NATURAL HUMAN PROTEIN FRAGMENTS
TO CREATE ORDERLY MULTIMERIZED IMMUNOGLOBULIN FC
COMPOSITIONS

二、中文發明摘要：

本發明涉及免疫球蛋白Fc之一系列完全重組多聚體化形式，藉此將多價免疫球蛋白Fc呈遞至免疫細胞受體。該等融合蛋白以同源二聚體(homodimeric)部分及稱為斯塔都聚體(stradomers)之高序多聚體部分二者存在。與該同源二聚體部分相比，經純化多聚體斯塔都聚體對FcγRs具有較高親和力及結合性(avidity)且解離較慢並可用於治療及預防疾病。本發明顯示，將IgG1 Fc區直接連接至多聚體化結構域會增強多聚體化及生物活性。

三、英文發明摘要：

The current invention involves a series of fully recombinant multimerized forms of immunoglobulin Fc which thereby present polyvalent immunoglobulin Fc to immune cell receptors. The fusion proteins exist as both homodimeric and highly ordered multimeric fractions, termed stradomers. In comparison to the homodimeric fraction, purified multimeric stradomers have higher affinity and avidity for FcγRs with slower dissociation and are useful in the treatment and prevention of disease. The current invention demonstrates that directly linking IgG1 Fc regions to multimerization domains leads to enhanced multimerization and biological activity.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1a)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明概言之係關於免疫學、自體免疫、發炎及腫瘤免疫學之領域。更具體而言，本發明係關於包含天然連接之免疫球蛋白Fc結構域之生物活性仿生分子、包含此等仿生物之組合物、及此等仿生物之製造及使用方法。

本發明亦係關於對由淋巴細胞、NK細胞、單核細胞衍生細胞及與淋巴細胞衍生細胞相互作用之免疫細胞介導之病理病況的治療及預防，且更特定而言，本發明係關於經連接IgG Fc片段之穩定功能部分用於此治療及預防之用途。

本申請案主張對2011年7月28日提出申請的美國臨時申請案第61/368,465號之優先權，其內容係全文以引用方式併入本文中。

【先前技術】

自1950年代早期以來，人們一直使用來自人類血漿之免疫球蛋白產物來治療免疫缺陷病症，且最近，且更通常地將其用於自體免疫性及發炎性疾病。

最初，藉由肌內注射投與免疫球蛋白產物。最近，已使

用靜脈內免疫球蛋白(IVIG)且其初步顯示可有效治療自體免疫性疾病特發性血小板減少性紫癜(ITP) (Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V 等人: High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. Lancet 1981年6月6日; 1(8232): 1228-31)。人類IVIG(本文稱作「hIVIG」)係自經彙集人類血漿製造之無菌、純化免疫球蛋白G (IgG)產物之調配物，該經彙集人類血漿通常含有95%以上之未經修飾IgG，且僅含有較少且可變量之免疫球蛋白A (IgA)或免疫球蛋白M (IgM)(例如，參見 Rutter A, Luger TA: High-dose intravenous immunoglobulins: an approach to treat severe immune-mediated and autoimmune diseases of the skin. J Am Acad Dermatol 2001年6月; 44(6): 1010-24)。當前，hIVIG之單一最常見臨床用途係治療慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變。

儘管hIVIG為有效臨床治療，但hIVIG治療仍存在若干缺點，包括無菌性可能不足、存在雜質或傳染因子(包括病毒及普里昂蛋白(prion))、缺乏此經彙集人類血液產物之可用性、批間偏差、高費用、影響腎功能之大蛋白質負荷及長投與時間(通常每月經多個小時且有時為連續兩天)。特定而言，hIVIG製劑之免疫球蛋白A (IgA)含量可相差很大，此可能引起關注，此乃因IgA可引起IgA缺陷型接受者之致敏性及過敏性反應。鑒於hIVIG之消極態樣，業內需要治療自體免疫性及發炎性疾病之改良手段且尤其需要至

少具有該等效功效、較大效能、較短投與時間及較高純度之重組生產產物之豐富來源。

另外，衍生自單核細胞、淋巴細胞及NK細胞之細胞介導多種類型之多重病理病況。用於許多(若非全部)此等病況中之新穎治療劑及/或預防劑可滿足未滿足之重要醫學需要且具有商業價值。

hIVIG之許多免疫調節性質存在於IgG分子之Fc結構域中。舉例而言，在ITP之鼠類模型中，單獨的未經修飾hIVIG與Fc片段二者在恢復血小板計數上皆顯示治療功效，而經分離hIVIG Fab片段則不具有治療性(Samuelsson, A., Towers, T. L. 及 Ravetch, J.V. Anti-inflammatory Activity of hIVIG Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor. Science 291, 484-486 (2001))。此外，hIVIG之Fc而非Fab片段亦可在治療上有效地治療兒童與成人特發性血小板減少性紫癜二者(Follea, G. 等人，Intravenous plasmin-treated gamma globulin therapy in idiopathic thrombocytopenic purpura. Nouv Rev Fr Hematol 27, 5-10 (1985)；Solal-Celigny, P., Bernard, J., Herrera, A. 及 Biovin, P. Treatment of adult autoimmune thrombocytopenic purpura with high-dose intravenous plasmin-cleaved gammaglobulins. Scand J Haematol 31, 39-44 (1983)；Debre, M.及Bonnet, M.-C. Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. Lancet 342, 945-49 (1993)；Burdach, S.E., Evers,

K.及Geurson, R. Treatment of acute idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood with intravenous immunoglobulin G: Comparative efficacy of 7S and 5S preparations. *J Pediatr* 109, 770-775 (1986))。

除可分為激活成員與抑制成員之經典Fc γ 受體家族外，新生兒Fc-受體(FcRn)(其屬於主要組織相容性I類(MHC-I)分子家族)及SignR1/DC-SIGN(其屬於C型凝集素家族)亦可結合至IgG Fc片段(Nimmerjahn及Ravetch, *Antibody-mediated modulation of immune responses, Immunological Reviews*, 236: 265-275 (2010))。另外，存在免疫球蛋白Fc分子結合並發揮生理效應之Fc γ 受體樣受體(Davis RS. 「Fc Receptor-like molecules」 *Annu. Rev. Immunol.* 2007. 25:525-60)。hIVIG之治療效應最初經由Fc γ 受體(Fc γ R)介導且依賴於樹突細胞(DC)-巨噬細胞交互作用以達成其長期致耐受效應。在ITP鼠類模型中，Fc γ RIIIa在起始階段起重要作用且Fc γ RIIb係效應階段所必需(Samuelsson, A., Towers, T.L.及Ravetch, J.V. Anti-inflammatory Activity of hIVIG Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor. *Science* 291, 484-486 (2001); Siragam, V.等人Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc γ receptors on dendritic cells. *Nat Med* 12, 688 (2006))。同樣，人類研究顯示，抗Fc γ 受體抗體可有效治療頑固性ITP(Clarkson, S.等人, Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc gamma-receptor antibody. *N Engl J Med* 314, 1236-1239 (1986))。重要的

是，細胞-細胞相互作用介導長期致耐受效應，此乃因經 hIVIG 治療 DC 之繼承轉移可有效治療 ITP 鼠類模型 (Siragam, V. 等人，Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc γ receptors on dendritic cells. *Nat Med* 12, 688 (2006))。

hIVIG 之免疫調節效應需要 Fc γ R 之聚集。存在於 hIVIG 中之 IgG 「二聚體」(總 hIVIG 之 5-15%) 介導 Fc γ R 之聚集 (Bleeker, W.K. 等人，Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. *Blood* 95, 1856-1861 (2000))。舉例而言，IVIG 之已知免疫循環臨床降血壓效應與 IVIG 中存在「二聚體」相關 (Kroez M 等人，Hypotension with Intravenous Immunoglobulin Therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals* 31 (2003) 277-286)。舉例而言，在 ITP 鼠類模型中，用具有高含量之「二聚體」(全同源二聚體免疫球蛋白分子之二聚體) 之 hIVIG 治療可提高血小板計數，而 hIVIG 「單體」(全同源二聚體免疫球蛋白分子) 則不起作用 (Teeling, J.L. 等人，Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood* 98, 1095-1099 (2001))。此外，儘管存在以下事實：在 hIVIG 製造中通常使用離子交換樹脂及聚乙二醇分級來去除 IgG 聚集體，但 hIVIG 之臨床功效與

患者血清中存在二聚體相關(Augener, W., Friedman, B.及 Brittinger, G. Are aggregates of IgG the effective part of high-dose immunoglobulin therapy in adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)? Blut 50, 249-252 (1985))。重要的是，二聚體之百分比亦與血管活性副效應相關，該等血管活性副效應可用乙醯水解酶治療(Bleeker, W.K. 等人，Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. Blood 95, 1856-1861 (2000))。

【發明內容】

業內需要可解決以下問題同時維持並增強IVIG之聚集部分之功效之IVIG的替代物：高蛋白質負荷、不便之患者給藥、感染風險、IgA過敏性及有限之可用性。本發明係關於包含人類免疫球蛋白Fc及單一天然存在之多聚體化結構域之生物活性融合蛋白仿生分子、包含其之組合物及使用其之方法。正如該等仿生物所模仿之hIVIG，該等仿生物可廣泛應用於治療免疫學及發炎性病徵，包括(但不限於)自體免疫性疾病。此外，該等仿生物中之某些亦可用作實驗室試劑，例如用於免疫學分析用以測試免疫細胞功能、診斷疾病及在基於抗體之免疫分析中封阻Fc之非特異性結合。此外，本發明之仿生物及組合物具有克服hIVIG之上文所列示限制以及前體仿生物斯塔都聚體(stradomer)之多聚體化限制的優勢。

WO 2008/151088揭示使用經連接免疫球蛋白Fc結構域來產生hIVIG之依序多聚體化免疫球蛋白Fc仿生物(稱作斯塔都聚體之生物活性依序多聚體)用以治療病理病況,包括自體免疫性疾病及其他發炎性病況。參見WO 2008/151088,其係全文以引用方式併入本文中。所揭示分子經設計以在免疫球蛋白Fc單體中含有包括限制位點及親和力標籤之外來(相對於天然免疫球蛋白Fc)序列。該等外來序列總共佔斯塔都聚體之總體胺基酸組成之一小部分(約16個胺基酸)且位於具有可分離且獨特之功能(即FcR結合功能及多聚體化功能)之結構域之間。一般而言,慣常作法係在具有獨立結構及/或功能之結構域之間包括小連接序列以避免任何空間侷限或減少側接結構域之獨立功能。然而,如本文所揭示,去除該等短片段可顯著增強多聚體形成、受體結合及/或總體生物活性。

在一個實施例中,本發明係關於包含前導序列、IgG1 Fc結構域及多聚體化結構域之斯塔都聚體單元。在本發明又一實施例中,前導序列直接連接至IgG1 Fc結構域且IgG1 Fc結構域直接連接至多聚體化結構域。

在另一實施例中,本發明係關於斯塔都聚體單元,其中IgG1 Fc結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 2至少80%同源。在又一實施例中,IgG1 Fc結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 2至少90%同源。在再一實施例中,IgG1 Fc結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 2至少95%同源。在再一實施例中,IgG1 Fc結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 2至少

99%同源。在又一實施例中，IgG1 Fc結構域之胺基酸序列 SEQ ID NO: 2直接連接至前導序列及/或多聚體化結構域。在一些實施例中，本發明之斯塔都聚體單元在多聚體化時結合FcγRIIIa或DC-SIGN/SIGN-R1。

在另一實施例中，本發明係關於斯塔都聚體單元，其中多聚體化結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 3至少80%同源。在又一實施例中，多聚體化結構域與SEQ ID NO: 3至少90%同源。在再一實施例中，本發明之斯塔都聚體單元，其中多聚體化結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 3至少95%同源。在再一實施例中，本發明之斯塔都聚體單元，其中多聚體化結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 3至少99%同源。在另一實施例中，多聚體化結構域能夠使斯塔都聚體單元多聚體化。在又一實施例中，多聚體化結構域直接連接至IgG1 Fc結構域之羧基末端。在一些實施例中，多聚體化結構域直接連接至IgG1 Fc結構域之胺基末端。

在另一實施例中，本發明係關於斯塔都聚體單元，其中多聚體化結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 5至少80%同源。在又一實施例中，多聚體化結構域與SEQ ID NO: 5至少90%同源。在再一實施例中，本發明之斯塔都聚體單元，其中多聚體化結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 5至少95%同源。在再一實施例中，本發明之斯塔都聚體單元，其中多聚體化結構域之胺基酸序列與SEQ ID NO: 5至少99%同源。在另一實施例中，多聚體化結構域能夠使斯

塔都聚體單元多聚體化。在又一實施例中，多聚體化結構域直接連接至IgG1 Fc結構域之羧基端。在一些實施例中，多聚體化結構域直接連接至IgG1 Fc結構域之胺基端。

在一個實施例中，本發明係關於斯塔都聚體單元，其中斯塔都聚體單元之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 4。在又一實施例中，本發明係關於成簇斯塔都聚體，其包含至少兩個包含SEQ ID NO: 4之斯塔都聚體單元。

在另一實施例中，本發明係關於包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列的斯塔都聚體單元，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域，其中該多聚體化結構域產生斯塔都聚體單元之多聚體。在又一實施例中，多聚體化結構域產生斯塔都聚體單元之高次多聚體。

在一個實施例中，本發明係關於包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列的斯塔都聚體單元，其中該多聚體化結構域直接連接至缺乏IgG1鉸鏈結構域之IgG1 Fc結構域，其中該多聚體化結構域產生斯塔都聚體單元之多聚體。在另一實施例中，本發明係關於包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列的斯塔都聚體單元，其中該多聚體化結構域直接連接至IgG1 Fc中能夠結合FcR之一部分或其中該直接連接至IgG1 Fc之一部分之多聚體化結構域一起能夠結合FcR。

在一個實施例中，本發明係關於包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列的斯塔都聚體單元，該多聚體化結構

域進而直接連接至IgG1 Fc結構域，該IgG1 Fc結構域由IgG1鉸鏈、CH2及CH3結構域組成，其中該多聚體化結構域產生斯塔都聚體單元之多聚體。

在一個實施例中，本發明係關於包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列的斯塔都聚體單元，該多聚體化結構域進而直接連接至IgG1 Fc結構域，該IgG1 Fc結構域由IgG1 CH2及CH3結構域組成，其中該多聚體化結構域產生斯塔都聚體單元之多聚體。

在一個實施例中，本發明係關於包含直接連接至包含IgG2鉸鏈之Fc結構域之前導序列的斯塔都聚體單元，該IgG2鉸鏈直接連接至IgG1 CH2及IgG1 CH3結構域，其中該IgG2鉸鏈產生斯塔都聚體單元之多聚體。在一個實施例中，斯塔都聚體單元之胺基酸序列與SEQ ID NO: 18至少80%同源。在又一實施例中，斯塔都聚體單元之胺基酸序列與SEQ ID NO: 18至少90%同源。在再一實施例中，斯塔都聚體單元之胺基酸序列與SEQ ID NO: 18至少95%同源。在再一實施例中，斯塔都聚體單元之胺基酸序列與SEQ ID NO: 18至少99%同源。在又一實施例中，自成熟蛋白質裂解前導序列(SEQ ID NO: 1)。

在一個實施例中，本發明係關於包含至少兩個斯塔都聚體單體之成簇斯塔都聚體，該兩個斯塔都聚體單體各自包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體結合至FcγRIIIa。在又一實施例中，成簇斯

塔都聚體結合至FcγRIIb。

在另一實施例中，本發明係關於調節對個體之免疫反應的方法，其包含向該個體投與有效量之包含至少兩個斯塔都聚體單體之成簇斯塔都聚體，該兩個斯塔都聚體單體各自包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體結合至FcγRIIIa。在又一實施例中，對免疫反應之調節包含在未成熟樹突細胞上誘導CD86。

在又一實施例中，對免疫反應之調節與某些抗體產生減少之記憶性B細胞之選擇性細胞凋亡相關。在又一實施例中，該調節與抗體產生減少之經激活記憶性B細胞之選擇性細胞凋亡相關。在另一實施例中，免疫調節可係調節NK細胞，從而使抗體依賴性細胞毒性增加。在再一實施例中，免疫反應之調節可使表現CD8β及CD11c之細胞群增加。在再一實施例中，免疫調節可使促炎細胞因子或自體免疫性疾病中通常升高之細胞因子(例如IL-6及IL-8)減少。在另一實施例中，免疫調節可使NKT細胞激活並使TGF-β分泌及裂解。

在又一實施例中，本發明係關於治療有需要之個體之發炎性或自體免疫性疾病的方法，其包含投與有效量之包含至少兩個斯塔都聚體單元之斯塔都聚體，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域，或另一選擇為，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至多

聚體化結構域之前導序列，該多聚體化結構域進而直接連接至IgG1 Fc結構域。在又一實施例中，發炎性疾病係自體免疫性疾病。在再一實施例中，自體免疫性疾病選自由以下組成之群：類風濕性關節炎、多發性硬化、I型糖尿病、自體免疫性甲狀腺炎、特發性血小板減少性紫癜、自體免疫性貧血、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變、硬皮病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、發炎性腸病、自體免疫性葡萄膜炎、ANCA陽極血管炎、乳糜瀉、天皰瘡、皮多肌炎、古德帕斯徹氏病(Goodpasture's Disease)、重症肌無力、格雷夫斯氏病(Grave's Disease)、川崎病(Kawasaki Disease)、鎌狀細胞危象及異位性皮炎。在再一實施例中，自體免疫性疾病與自供者至接受者之器官移植相關。在再一實施例中，自體免疫性疾病係不以經典方式表徵為自體免疫性疾病而是其中免疫系統之細胞起重要作用之疾病，例如阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、亨庭頓氏病(Huntingdon's disease)、骨質減少及骨質疏鬆症。

在又一實施例中，斯塔都聚體係經靜脈內、經皮下、經口、經鼻、經腹膜內、經舌下、經頰、經真皮、藉由皮下或真皮下植入或經肌內投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係經靜脈內投與。由於本發明斯塔都聚體之功效有所增強，因此在一些實施例中，斯塔都聚體與先前分子及/或IVIG相比可以較低劑量經靜脈內投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.01 mg/Kg至約1000 mg/Kg IV

之劑量經靜脈內投與。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.1 mg/Kg至約100 mg/Kg IV投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.5 mg/Kg至約50 mg/Kg IV投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約1 mg/Kg至約25 mg/Kg IV投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約5 mg/Kg至約15 mg/Kg IV投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係經皮下投與。由於本發明斯塔都聚體之功效有所增強，因此在一些實施例中，斯塔都聚體s與先前分子及/或IVIG相比可以較低劑量經皮下投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.01 mg/Kg至約1000 mg/Kg SQ之劑量經皮下投與。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.2 mg/Kg至約150 mg/Kg SQ投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.5 mg/Kg至約80 mg/Kg SQ投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約2 mg/Kg至約50 mg/Kg SQ投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約5 mg/Kg至約30 mg/Kg SQ投與。

在一個實施例中，將所投與成簇斯塔都聚體共價固定至可植入裝置。在一個實施例中，將成簇斯塔都聚體固定至縫合線。在另一實施例中，將成簇斯塔都聚體固定至移植物或支架。在另一實施例中，將成簇斯塔都聚體固定至心臟瓣膜、整形外科關節置換物或經植入電子引線。在另一實施例中，將成簇斯塔都聚體固定至可植入基質且嵌入其內。在一較佳實施例中，將成簇斯塔都聚體固定至可植入水凝膠且嵌入其內。在一個實施例中，水凝膠由葡聚糖、

聚乙烯醇、聚丙烯酸鈉或丙烯酸酯聚合物構成。在又一實施例中，將所投與成簇斯塔都聚體固定在水凝膠中，該水凝膠之孔徑大至足以允許免疫細胞進入以與經固定成簇斯塔都聚體相互作用且隨後返回循環。在又一實施例中，水凝膠之孔徑係5微米至50微米。在一較佳實施例中，水凝膠之孔徑係25微米至30微米。

在又一實施例中，斯塔都聚體係在投與一或多種其他醫藥劑之前、期間或之後投與。在又一實施例中，其他醫藥活性劑包含類固醇；生物抗自體免疫性藥物，例如單株抗體、融合蛋白或抗細胞因子；非生物抗自體免疫性藥物；免疫抑制劑；抗生素；及抗病毒劑；細胞因子；或其他能夠用作免疫調節劑之藥劑。在再一實施例中，類固醇係潑尼松(prednisone)、潑尼松龍(prednisolone)、可的松(cortisone)、地塞米松(dexamethasone)、莫米松(mometasone)、睪酮、雌激素、氧雄龍(oxandrolone)、氟替卡松(fluticasone)、布地奈德(budesonide)、倍氯米松(beclomethasone)、沙丁胺醇(albuterol)或左旋沙丁胺醇(levsalbuterol)。在再一實施例中，單株抗體係英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、利妥昔單抗(rituximab)、托珠單抗(tocilizumab)、戈利木單抗(golimumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、LY2127399、貝利木單抗(belimumab)、維土珠單抗(veltuzumab)或賽妥珠單抗(certolizumab)。在再一實施例中，融合蛋白係依那西普(etanercept)或阿巴他塞(abatacept)。在再一實施例中，

抗細胞因子生物製劑係阿那白滯素(anakinra)。在再一實施例中，抗風濕性非生物藥物係環磷醯胺、甲胺蝶呤(methotrexate)、硫唑嘌呤(azathioprine)、羥氯喹、來氟米特(leflunomide)、米諾環素(minocycline)、有機金化合物、福他替尼(fostamatinib)、他菲替尼(tofacitinib)、依託考昔(etoricoxib)或柳氮磺吡啶(sulfasalazine)。在再一實施例中，免疫抑制劑係環孢素A、他克莫司(tacrolimus)、西羅莫司(sirolimus)、嗎替麥考酚酯(mycophenolate mofetil)、依維莫司(everolimus)、OKT3、抗胸腺細胞球蛋白、巴利昔單抗(basiliximab)、達利珠單抗(daclizumab)或阿倫珠單抗(alemtuzumab)。在再一實施例中，斯塔都聚體係在投與化學治療劑之前、期間或之後投與。

在再一實施例中，本發明係關於治療有需要之個體之傳染性疾病的方法，其包含投與有效量之包含至少兩個斯塔都聚體單元之成簇斯塔都聚體，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域，或另一選擇為，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列，該多聚體化結構域進而直接連接至IgG1 Fc結構域。在再一實施例中，傳染性疾病係細菌感染。在再一實施例中，傳染性疾病係病毒感染。在又一實施例中，傳染性疾病係細菌或病毒敗血症。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體係經靜脈內、經皮下、經口、經腹膜內、經舌下、經頰、經真皮、藉由皮下或真皮下植入或經肌內

投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係經靜脈內投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係經靜脈內投與。在一個實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.01 mg/Kg至約1000 mg/Kg之劑量投與。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.1 mg/Kg至約100 mg/Kg投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約0.5 mg/Kg至約50 mg/Kg投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約1 mg/Kg至約25 mg/Kg投與。在再一實施例中，成簇斯塔都聚體係以約5 mg/Kg至約15 mg/Kg投與。

在另一實施例中，投與成簇斯塔都聚體以用物種特異性或嵌合斯塔都聚體分子治療人類、非人類靈長類動物(例如，猴子、狒狒及黑猩猩)、小鼠、大鼠、牛、馬、貓、狗、豬、兔、山羊、鹿、綿羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、倉鼠、蝙蝠、禽類(例如，雞、火雞及鴨)、魚及爬行動物。在再一實施例中，人類係成人或兒童。在再一實施例中，投與成簇斯塔都聚體以預防自體免疫性疾病。在又一實施例中，投與成簇斯塔都聚體以預防伴侶動物及家畜之疫苗相關性自體免疫性病況。

在再一實施例中，本發明係關於在活體外或離體分析中封阻抗體之非特異性結合的方法，其包含將目標組織或目標細胞與包含有效量之包含至少兩個斯塔都聚體單元之成簇斯塔都聚體的組合物一起培育，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域，或另一選擇

為，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列，該多聚體化結構域進而直接連接至IgG1 Fc結構域。在一個實施例中，抗體係單株抗體。在另一實施例中，抗體係多株抗體。在一個實施例中，活體外或離體分析係免疫組織化學、流式細胞測量術、西方墨點(western blot)或免疫螢光分析。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體對目標組織或細胞之物種具有物種特異性。

在再一實施例中，本發明係關於用有效量之包含至少兩個斯塔都聚體單元之成簇斯塔都聚體降低組合物中之內毒素含量的方法，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至IgG1 Fc結構域之前導序列，該IgG1 Fc結構域進而直接連接至多聚體化結構域，或另一選擇為，該兩個斯塔都聚體單元各自包含直接連接至多聚體化結構域之前導序列，該多聚體化結構域進而直接連接至IgG1 Fc結構域。在又一實施例中，成簇斯塔都聚體與組合物中之內毒素複合。在再一實施例中，該方法包括自該組合物去除與斯塔都聚體複合之內毒素。在一個實施例中，與斯塔都聚體複合之內毒素係藉由過濾自組合物去除。在一個實施例中，組合物係醫藥組合物。

在一個實施例中，本發明係關於產生成簇斯塔都聚體之方法，其包含自轉染細胞表現斯塔都聚體單元，該斯塔都聚體單元包含直接連接至IgG1 Fc結構域(其進而直接連接至多聚體化結構域)之前導序列或直接連接至多聚體化結構域(其直接連接至IgG1 Fc結構域)之前導序列，其中該多

聚體化結構域產生斯塔都聚體單元多聚體，該方法包含將編碼斯塔都聚體SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 18之DNA序列選殖至表現載體中，將該表現載體轉染至細菌宿主中，自細菌培養物分離含有編碼斯塔都聚體SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 18之DNA的質粒DNA，將該含有編碼斯塔都聚體SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 18之DNA的質粒DNA線性化，將經線性化DNA轉染至哺乳動物細胞中，擴增陽性轉染細胞以獲得穩定轉染細胞庫，自培養基收穫斯塔都聚體蛋白，及純化該斯塔都聚體蛋白，其中該斯塔都聚體蛋白不含有外來序列。在一個實施例中，表現載體含有可選標記物。在又一實施例中，可選標記物係抗生素抗性基因。在再一實施例中，抗生素抗性基因係新黴素抗性基因。在一個實施例中，哺乳動物細胞係CHO細胞、HEK293細胞、PER.C6細胞、CAP細胞或用於產生蛋白質之其他商業相關哺乳動物細胞。在一個實施例中，藉由親和層析來純化斯塔都聚體蛋白。在又一實施例中，藉由凝膠過濾來進一步純化該蛋白。在又一實施例中，藉由離子交換層析來進一步純化該蛋白。在又一實施例中，藉由疏水相互作用層析來進一步純化該蛋白。

【實施方式】

對本文所述hIVIG置換化合物進行合理分子設計的方法

包括免疫活性仿生物之重組及/或生物化學產生，與旨在達成此目標之先前所述分子相比，該(等)免疫活性仿生物可令人驚奇地更有效地多聚體化且因此與結合至Fc γ 受體之Fc結合。該等置換化合物可用於治療(例如)自體免疫性疾病、發炎性疾病、癌症及敗血症。由於該等組合物相對於天然免疫球蛋白對Fc γ 受體具有更高結合親和力，因此其亦可在基於抗體之免疫分析中及在自醫藥及實驗室組合物去除內毒素中用作Fc封阻試劑。每一實施例皆與特定實施例性實施例一起詳細闡述於下文中。

在申請專利範圍及/或說明書中，本文所用詞語「一(a或an)」在與術語「包含」連用時，其用途可意指「一個」，但亦與「一或多個」、「至少一個」及「一或多於一個」之含義吻合。

本文所用術語「仿生物」、「仿生分子」、「仿生化合物」及有關術語係指模擬另一化合物(例如經彙集hIVIG、單株抗體或抗體之Fc片段)之功能之人工化合物。「生物活性」仿生物係具有與天然存在之對等部分相同或相似之生物活性的化合物。所謂「天然存在」意指通常在生物體內發現之分子或其部分。所謂天然存在亦意指實質上天然存在。

「免疫活性」仿生物係展現與天然存在之免疫活性分子(例如抗體、細胞因子、白介素及業內已知之其他免疫學分子)相同或相似之免疫學活性的仿生物。在較佳實施例中，本發明仿生物係如本文所定義斯塔都聚體。

本發明免疫活性仿生物經設計以具有IgG Fc結構域之一

或多種免疫調節活性且至少具有(i)第一Fc結構域，其能夠結合FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1及/或FcγR(包括FcγRI、FcγRII、FcγRIII及FcγRIV)；及(ii)第二Fc結構域，其能夠結合FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1及/或FcγR(包括FcγRI、FcγRII、FcγRIII及FcγRIV)。具體而言，本發明之免疫活性化合物係同源二聚體之多聚體。每一同源二聚體皆具有結合至FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1及/或FcγR之能力。因此，在多聚體化時，免疫活性仿生物含有至少兩個各具有結合至FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1及/或FcγR之能力的同源二聚體。

以下段落同時在結構上與功能上定義本發明仿生物之構件塊，且隨後定義仿生物本身。然而，首先需要注意，如上文所示，本發明仿生物中之每一者皆具有至少兩個Fc結構域。Fc結構域至少為二聚體多肽(或較大多肽之二聚體區)，其包含兩條締合以形成功能性Fcγ受體結合位點之肽鏈或臂(單體)。因此，本文所述個別片段及結構域之功能性形式通常以二聚體(多聚體)形式存在。本文所述個別片段及結構域之單體係單鏈或臂，其必須與第二鏈或臂締合以形成功能性二聚體結構。

Fc片段

「Fc片段」係用於描述通常在免疫球蛋白之羧基末端處發現之蛋白質區或蛋白質摺疊結構的專業術語。Fc片段可藉助使用酵素消化(例如木瓜蛋白酶消化)自單株抗體之Fab片段分離，此係不完全且不完美之過程(參見Mihaesco C及

Seligmann M. Papain Digestion Fragments Of Human IgM Globulins. *Journal of Experimental Medicine*, 第127卷, 431-453 (1968)). Fc片段結合Fab片段(含有抗原結合結構域)構成完全抗體, 此處意指完整抗體。Fc片段由抗體重鏈之羧基末端部分組成。Fc片段中每一鏈之長度介於約220至265個胺基酸之間且該等鏈通常經由二硫鍵連接。Fc片段通常含有一或多個獨立結構性摺疊或功能性子結構域。特定而言, Fc片段涵蓋Fc結構域, 本文定義為結合Fc γ 受體之最小結構。經分離Fc片段由兩個經二聚體化之Fc片段單體(例如, 抗體重鏈之兩個羧基末端部分; 如本文所進一步定義)構成。當兩個Fc片段單體締合時, 所得Fc片段具有Fc γ 受體結合活性。

Fc部分片段

「Fc部分片段」係包含小於抗體之整個Fc片段, 但仍保持足以具有與Fc片段相同之活性(包括Fc γ 受體結合活性)之結構的結構域。因此, Fc部分片段可缺乏鉸鏈區之部分或全部、CH2結構域之部分或全部、CH3結構域之部分或全部及/或CH4結構域之部分或全部, 此端視獲得Fc部分結構域之抗體之同種型而定。Fc部分片段之一實例包括含有IgG3之上部、核心及下部鉸鏈區與CH2結構域之分子(Tan, LK, Shopes, RJ, Oi, VT及Morrison, SL, Influence of the hinge region on complement activation, C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990年1月; 87(1): 162-166)。因

此，在此實例中，Fc部分片段缺乏存在於IgG3之Fc片段中之CH3結構域。Fc部分片段之另一實例包括含有IgG1之CH2及CH3結構域之分子。在此實例中，Fc部分片段缺乏存在於IgG1中之鉸鏈結構域。Fc部分片段由兩個Fc部分片段單體構成。如本文所進一步定義，當兩個此等Fc部分片段單體締合時，所得Fc部分片段具有Fc γ 受體結合活性。

Fc結構域

本文所用「Fc結構域」描述可結合至Fc受體(FcR)或由其結合之最小區(在較大多肽之情形下)或最小蛋白質摺疊結構(在經分離蛋白質之情形下)。在Fc片段與Fc部分片段二者中，Fc結構域係允許分子結合至Fc受體之最小結合區。儘管Fc結構域可限定於由Fc受體結合之離散多肽，但亦應明瞭，Fc結構域可為Fc片段之部分或全部、以及Fc部分片段之部分或全部。當在本發明中使用術語「Fc結構域」時，熟習此項技術者應認識到其意指一個以上之Fc結構域。Fc結構域由兩個Fc結構域單體構成。如本文所進一步定義，當兩個此等Fc結構域單體締合時，所得Fc結構域具有Fc受體結合活性。因此，Fc結構域係可結合Fc受體之二聚體結構。

Fc部分結構域

本文所用「Fc部分結構域」描述Fc結構域之一部分。Fc部分結構域包括不同免疫球蛋白類別及亞類之個別重鏈恆定區結構域(例如，CH1、CH2、CH3及CH4結構域)及鉸鏈區。因此，本發明之人類Fc部分結構域包括IgG1、IgG2、

IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD及IgE之CH1結構域、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD及IgE之CH2結構域、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD及IgE之CH3結構域、IgM及IgE之CH4結構域、及IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD及IgE之鉸鏈區。其他物種中之對應Fc部分結構域將取決於存在於該物種中之免疫球蛋白及其命名。較佳地，本發明之Fc部分結構域包括IgG1之CH1、CH2及鉸鏈結構域及IgG2之鉸鏈結構域。本發明之Fc部分結構域可進一步包含該等結構域及鉸鏈中一者以上之組合。然而，本發明之個別Fc部分結構域及其組合缺乏結合Fc γ R之能力。因此，Fc部分結構域及其組合包含小於一個之Fc結構域。Fc部分結構域可連接在一起以形成具有Fc γ 受體結合活性之肽，由此形成Fc結構域。在本發明中，使用Fc部分結構域與Fc結構域作為構件塊來產生本發明仿生物，如本文所定義。每一Fc部分結構域由兩個Fc部分結構域單體構成。當兩個此等Fc部分結構域單體締合時，形成Fc部分結構域。

如上文所示，Fc片段、Fc部分片段、Fc結構域及Fc部分結構域中之每一者係二聚體蛋白或結構域。因此，該等分子中之每一者由兩個締合以形成二聚體蛋白或結構域之單體構成。上文論述了同源二聚體形式之特性及活性，而單體肽論述如下。

Fc片段單體

本文所用「Fc片段單體」係在與另一Fc片段單體締合時

包含Fc片段之單鏈蛋白。因此，Fc片段單體係構成完全抗體之Fc片段之抗體重鏈之一者的羧基末端部分(例如，重鏈之連續部分，包括IgG之鉸鏈區、CH2結構域及CH3結構域)。在一個實施例中，Fc片段單體至少包含一條鉸鏈區鏈(鉸鏈單體)、一條CH2結構域鏈(CH2結構域單體)及一條CH3結構域鏈(CH3結構域單體)，該等鏈經連續連接以形成肽。在另一實施例中，Fc片段單體包含至少一條鉸鏈區鏈、一條CH2結構域鏈、一條CH3結構域鏈及一條CH4結構域鏈(CH4結構域單體)，該等鏈經連續連接以形成肽。在一個實施例中，CH2、CH3及鉸鏈結構域來自不同同種型。在一特定實施例中，Fc片段單體含有IgG2鉸鏈結構域及IgG1 CH2及CH3結構域。

Fc結構域單體

本文所用「Fc結構域單體」描述在與另一Fc結構域單體締合時包含可結合至Fc γ 受體之Fc結構域的單鏈蛋白。兩個Fc結構域單體之締合產生一個Fc結構域。僅包含Fc結構域之一側的Fc結構域單體單獨不能結合Fc γ 受體。本發明之Fc結構域單體不含有外來序列，而先前所述Fc結構域單體含有外來序列(例如，參見WO 2008/151088，圖17及18)。本發明之Fc結構域單體(SEQ ID NO: 2)直接連接至一末端(舉例而言，Fc單體之N末端)上之前導序列(SEQ ID NO: 1)且連接至另一末端(例如，Fc單體之C末端)上之多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3)。所得斯塔都聚體單體SEQ ID NO: 4在本文中稱作G045c。在另一實施例中，Fc結構域單

體包含IgG2鉸鏈結構域且IgG1 CH2及CH3結構域直接連接至N末端上之前導序列(SEQ ID NO: 1)。所得斯塔都聚體單體SEQ ID NO: 18在本文中稱作G051。或者，多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3)可位於Fc結構域單體(SEQ ID NO: 2)之胺基末端。所得斯塔都聚體單體SEQ ID NO: 8在本文中稱作G019。或者，多聚體化結構域可包含SEQ ID NO: 5而非SEQ ID NO: 3且可位於Fc結構域單體之羧基末端，從而產生SEQ ID NO: 10，或其可位於Fc結構域單體之胺基末端，從而產生SEQ ID NO: 9。該等斯塔都聚體在本文中分別稱作G046及G028。

Fc部分結構域單體

本文所用「Fc部分結構域單體」描述在與另一Fc部分結構域單體締合時包含Fc部分結構域之單鏈蛋白。兩個Fc部分結構域單體之締合產生一個Fc部分結構域。

斯塔都聚體

在特定實施例中，本發明仿生物包括斯塔都聚體。斯塔都聚體係能夠結合兩個或更多個Fc受體、較佳兩個或更多個Fc γ 受體且更佳相對於Fc結構域展示顯著改良之結合且最佳展示結合性之緩慢解離特性的仿生化合物。在一較佳實施例中，本發明斯塔都聚體用於結合效應細胞(例如NK細胞及未成熟樹突細胞及其他衍生自單核細胞之細胞)上之FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1及/或Fc γ 受體。在一個實施例中，Fc γ 受體係低親和力Fc γ 受體。斯塔都聚體可具有四種不同物理構造：連續、成簇、核心或Fc片段。本發明斯

斯塔都聚體較佳為成簇斯塔都聚體。如應明瞭，上述Fc片段、Fc部分片段、Fc結構域及Fc部分結構域用於構建各種斯塔都聚體構造。此外，首先產生亦於上文所述之個別Fc結構域單體及Fc部分結構域單體且其隨後自締合以形成為本發明斯塔都聚體之二聚體結構。

本文所用「斯塔都聚體二聚體」係僅由兩個斯塔都聚體單體構成的斯塔都聚體之具體形式。在一個實施例中，斯塔都聚體二聚體係藉由相關斯塔都聚體單體之自聚集形成之分子。在另一實施例中，斯塔都聚體二聚體中之斯塔都聚體單體係經由斯塔都聚體單體間連接物理連接，如本文所定義。「多聚體斯塔都聚體」由三個或更多個藉由斯塔都聚體單體之自聚集或經由斯塔都聚體單體間連接形成的斯塔都聚體構成，如本文所定義。

斯塔都聚體單體

本文所用術語「斯塔都聚體單體」係指在與至少第二斯塔都聚體單體締合時形成包含至少兩個Fc結構域之多肽的單一連續肽分子。儘管在較佳實施例中，成簇斯塔都聚體由兩個締合斯塔都聚體單體構成，但成簇斯塔都聚體亦可含有三個或更多個斯塔都聚體單體。斯塔都聚體單體可藉由斯塔都聚體單體間連接締合以形成斯塔都聚體或其可經由自聚集形成斯塔都聚體。

斯塔都聚體單體可具有在與另一斯塔都聚體單體締合時將形成1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個或更多個Fc結構域以

形成斯塔都聚體的胺基酸序列。斯塔都聚體單體進一步可具有在與另一斯塔都聚體單體締合時將形成1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個或更多個Fc部分結構域以形成斯塔都聚體的胺基酸序列。

斯塔都聚體單體中在斯塔都聚體之情形下將形成Fc結構域及Fc部分結構域之區域僅可自斯塔都聚體單體分子連續區之羧基末端佈置至胺基末端。包含斯塔都聚體單體之特定Fc結構域單體及Fc部分結構域單體之佈置並不重要。然而，該佈置必須允許在兩個斯塔都聚體單體締合後形成兩個功能性Fc結構域。在一較佳實施例中，本發明斯塔都聚體含有在IgG1 Fc單體(SEQ ID NO: 2)之N末端與前導肽(SEQ ID NO: 1)之C末端之間及IgG1 Fc (SEQ ID NO: 2)之C末端與多聚體化結構域IgG2鉸鏈(SEQ ID NO: 3)或異白胺酸拉鏈(SEQ ID NO: 5)或GPP結構域(SEQ ID NO: 26)之N末端之間之直接連接，以分別形成G045c斯塔都聚體SEQ ID NO: 4、G046斯塔都聚體SEQ ID NO: 10或G089斯塔都聚體SEQ ID NO: 29。在另一較佳實施例中，本發明斯塔都聚體含有在前導肽(SEQ ID NO: 1)之C末端與多聚體化結構域IgG2鉸鏈(SEQ ID NO: 3)、異白胺酸拉鏈(SEQ ID NO: 5)或GPP結構域(SEQ ID NO: 26)之N末端之間之直接連接及在多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3、5或26)之C末端與IgG1 Fc之N末端之間之直接連接，以分別形成G019斯塔都聚體SEQ ID NO: 8、G028斯塔都聚體SEQ ID NO: 9或

G096斯塔都聚體SEQ ID NO: 30，或含有在前導肽(SEQ ID NO: 1)與多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3)之N末端之間之直接連接及在多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3)之C末端與含有IgG1之CH2及CH3部分之IgG1 Fc部分結構域之N末端之間的直接連接，以形成G051斯塔都聚體SEQ ID NO: 18。

作為澄清性實例，熟習此項技術者應瞭解，本發明斯塔都聚體分子可藉由製備編碼Fc結構域單體與Fc部分結構域單體之不同組合的聚核苷酸分子來構建，每一組合具有或不具有所選點突變，但具有將形成最低兩個Fc結構域單體之組合。可將此一聚核苷酸分子(例如編碼斯塔都聚體SEQ ID NO: 4、8、9、10或18之聚核苷酸)插入可用於轉化細菌群或轉染哺乳動物細胞群之表現載體中。然後可藉由在合適培養條件下培養經轉化細菌或轉染哺乳動物細胞來產生斯塔都聚體單體。舉例而言，含有穩定轉染細胞庫之純系細胞系可藉由利用遺傳黴素(geneticin)/G418選擇細胞來達成。或者，細胞可在CMV啟動子控制下經編碼本發明斯塔都聚體(即G045c (SEQ ID NO: 4)、G019 (SEQ ID NO: 8)、G028 (SEQ ID NO: 9)、G046 (SEQ ID NO: 10)或G051 (SEQ ID NO: 18))之DNA瞬時轉染。隨後所表現斯塔都聚體單體可在斯塔都聚體單體自聚集或斯塔都聚體單體使用斯塔都聚體單體間連接締合後形成功能性斯塔都聚體。然後，可藉由親和層析使用(例如)蛋白A或蛋白G管柱自細胞培養基純化所表現斯塔都聚體。本發明涵蓋經由具有相同胺基酸序列之斯塔都聚體單體、具有實質上相似胺基酸序

列之斯塔都聚體單體或具有不同序列之斯塔都聚體單體之締合形成的斯塔都聚體二者。在後一實施例中，包含斯塔都聚體之斯塔都聚體單體之胺基酸序列僅需具有形成兩個或更多個功能性Fc γ R結合位點之此相似性。

令人驚奇地，藉由本發明方法產生之G045c (SEQ ID NO: 4)含有所主張前導序列(SEQ ID NO: 1)之序列，其直接連接至IgG1 Fc (SEQ ID NO: 2)之N末端，IgG1 Fc (SEQ ID NO: 2)進而經由其末端直接連接至IgG2鉸鏈多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3)，與含有先前不認為具有功能重要性之外來序列(例如如SEQ ID NO: 6及7中所顯示IgG1 Fc單體中之限制位點)之先前分子所觀察者相比，G045c (SEQ ID NO: 4)可形成更高次之多聚體。另外，由斯塔都聚體單體SEQ ID NO: 4產生之更高序多聚體與先前所述含有原外來序列之斯塔都聚體相比具有極佳功效。

如上文所示，Fc結構域可藉由其結合FcRn、DC-SIGN、SIGN-R1及/或Fc γ 受體之能力來進行功能定義。本發明化合物結合至同源受體(包括Fc γ RIIIa、Fc γ RIIb及/或SIGN-R1)之親和力遠高於IgG2a對照(圖5及6)。因此，Fc結構域之特定胺基酸序列將基於包含Fc結構域之Fc部分結構域而變。然而，在本發明一個實施例中，Fc結構域包含免疫球蛋白分子之鉸鏈區及CH2結構域。在又一較佳實施例中，Fc結構域包含免疫球蛋白分子之鉸鏈區、CH2結構域及CH3結構域。在又一實施例中，Fc結構域包含免疫球蛋白分子之鉸鏈區、CH2結構域、CH3結構域及CH4結構域。

在再一實施例中，Fc結構域包含免疫球蛋白分子之鉸鏈區、CH2結構域及CH4結構域。在又一較佳實施例中，Fc結構域包含CH2結構域及CH3結構域。在一較佳實施例中，Fc結構域含有IgG1之鉸鏈、CH2及CH3結構域(SEQ ID NO: 2)。在另一較佳實施例中，Fc結構域含有IgG1之CH2及CH3結構域(SEQ ID NO: 19)。

斯塔都聚體單體間連接

在本發明仿生化合物中發現的單獨連接係在兩個或更多個包含本發明斯塔都聚體之個別斯塔都聚體單體之間出現的「斯塔都聚體單體間連接」。結構域連接係用於將包含仿生化合物之個別斯塔都聚體單體之Fc結構域單體及部分Fc結構域單體彼此連接的短胺基酸序列，而斯塔都聚體單體間連接用於接合兩個或更多個包含仿生化合物之個別斯塔都聚體單體。斯塔都聚體單體間連接可係任一能夠穩定締合個別斯塔都聚體單體之連接。在一些實施例中，斯塔都聚體單體間連接可係斯塔都聚體單體之間的共價連接。或者，斯塔都聚體單體之間的斯塔都聚體單體間連接可藉由直接化學交聯達成。在較佳實施例，斯塔都聚體單體結構利用Fc結構域單體之間的天然自聚集性質來產生斯塔都聚體。在某些此等實施例中，所發生自聚集無通常在自然界中發現之共價二硫鍵連接。不受理論限制，舉例而言，完整IgG1在鉸鏈區中具有2個半胱胺酸鍵(Dorai H. Role of inter-heavy and light chain disulfide bonds in the effector functions of human immunoglobulin IgG1. Molecular

Immunology. 29;12, 1992, 1487-1491 ; Meulenbroek AJ及 Zeijlemaker WP. Human IgG Subclasses: Useful diagnostic markers for immunocompetence. ISBN 90-5267-011-0), 而 G045之IgG1鉸鏈、IgG1 CH2及IgG1 CH3結構域未展示單體間連接；在G045中所有單體間連接皆發生在IgG2鉸鏈結構域之C末端中。在其他此等實施例中，在個別斯塔都聚體單體之間形成二硫鍵以形成斯塔都聚體。在包含仿生分子之Fc結構域單體之半胱胺酸殘基之間形成二硫鍵，其中使用出現於天然Fc結構域單體序列中之半胱胺酸殘基或藉由定點誘變納入Fc結構域單體中之半胱胺酸殘基。此等天然自聚集性質亦可用於在斯塔都聚體多聚體中之個別斯塔都聚體單體之間形成斯塔都聚體單體間連接。在一較佳實施例中，形成斯塔都聚體單體間連接之半胱胺酸殘基係在G045之成熟蛋白質之IgG2鉸鏈結構域的位置236、237、240及243處。在一較佳實施例中，形成斯塔都聚體單體間連接之半胱胺酸殘基係在G051之成熟蛋白質之IgG2鉸鏈結構域的位置4、5、8及11處。替代實施例包括斯塔都聚體單體間連接，其中在經由定點誘變引入包含個別斯塔都聚體單體之胺基酸序列中的半胱胺酸殘基之間形成二硫鍵。

如上文所述，在一較佳實施例中，形成斯塔都聚體之斯塔都聚體單體間連接係自斯塔都聚體單體之自聚集產生之連接。在一個實施例中，兩個包含斯塔都聚體之斯塔都聚體單體係相同肽，使得該兩個包含斯塔都聚體之個別斯塔都聚體單體在序列上一致。然而，熟習此項技術者應瞭

解，其他實施例包括斯塔都聚體單體之胺基酸序列彼此不同之斯塔都聚體。

兩個斯塔都聚體單體可藉由(例如)平行對準以使得斯塔都聚體單體中之相同Fc部分結構域單體之間發生配對來形成斯塔都聚體。然而，本發明亦包括在不同Fc部分結構域單體之間發生配對之實施例及在斯塔都聚體單體中之相同Fc部分結構域單體之間發生配對但該兩個斯塔都聚體單體之對準偏移之實施例。

成簇斯塔都聚體

「成簇斯塔都聚體」係具有放射形式之仿生物，該放射形式具有一個中心部分「頭」及兩條或更多條「腿」，其中每條腿包含一或多個能夠結合至少一個Fc γ 受體之Fc結構域，由此產生能夠結合兩個或更個Fc γ 受體之仿生物。每一成簇斯塔都聚體由一個以上二聚體蛋白構成，每一蛋白稱為一個「成簇斯塔都聚體單元」。每一成簇斯塔都聚體單元由多聚體化之區及包含至少一個功能性Fc結構域之「腿」區構成。多聚體化區在與另一成簇斯塔都聚體單元多聚體化後產生成簇斯塔都聚體「頭」。每一腿區中存在多少Fc結構域，該腿區即能結合同樣多之Fc γ 受體。因此，成簇斯塔都聚體係能夠結合兩個或更多個Fc γ 受體從而增強結合親和力及結合性之仿生化合物。

多聚體化區可係使二聚體蛋白進一步多聚體化之肽序列，或另一選擇為，多聚體化區可係增強二聚體蛋白多聚體化之糖基化。肽多聚體化區之實例包括IgG2鉸鏈、IgE

CH2結構域、異白胺酸拉鏈、膠原甘胺酸-脯胺酸-脯胺酸重複單元(「GPP」)及鋅指。業內已詳細闡述糖基化對肽多聚體化之影響(例如, Role of Carbohydrate in Multimeric Structure of Factor VIII/V on Willebrand Factor Protein. Harvey R. Gralnick, Sybil B. Williams及Margaret E. Rick. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第80卷, 第9期, [第1部分: 生物科學](1983年5月1日), 第2771-2774頁; Multimerization and collagen binding of vitronectin is modulated by its glycosylation. Kimie Asanuma, Fumio Arisaka及Haruko Ogawa. International Congress Series第1223卷, 2001年12月, 第97-101頁)。

多聚體化區可為使肽二聚體化或多聚體化之肽序列且包括IgG2鉸鏈、IgE CH2結構域、異白胺酸拉鏈、膠原GPP及鋅指。如業內所熟知, 人類IgG2之鉸鏈區可形成共價二聚體(Yoo, E.M. 等人, J. Immunol. 170, 3134-3138 (2003); Salfeld Nature Biotech. 25, 1369-1372 (2007))。IgG2之二聚體形成係經由IgG2鉸鏈結構藉由C-C鍵潛在地介導(Yoo等人2003), 從而表明單獨鉸鏈結構可介導二聚體形成。然而, 於人類血清中發現之IgG2二聚體之量有限。據估計, 以同源二聚體之二聚體形式存在之IgG2之量小於總IgG2之10%(Yoo等人2003)。此外, IgG2超過同源二聚體之二聚體之多聚體化結構域尚無定量證據。(Yoo等人2003)。亦即, 在人類血清中尚未發現天然IgG2可形成更

高次多聚體。因此，本文所呈現結果尤其令人驚奇，此乃因含有IgG2鉸鏈之斯塔都聚體(即G045c、G019及G051)以高次多聚體存在，且與人類血清中之天然IgG2(其中IgG2鉸鏈相互作用係可變及動態的)不同，已證實G045c可形成高度穩定之多聚體，如藉由分析型超速離心及藉由在100%濕度及37°C下之3個月穩定性研究在非還原性SDS-PAGE凝膠上所證實。此外，亦令人驚奇地，在含有IgG2鉸鏈之斯塔都聚體製劑中，多聚體之量顯著高於在人類血清中觀察到之10%之IgG2。舉例而言，在G045c製劑中，多聚體(包括同源二聚體之二聚體)之量係約67%。

人類IgG2鉸鏈單體之胺基酸序列如下：ERKCCVECPCP (SEQ ID NO: 3)。SEQ ID 3中4個半胱胺酸中任一者之突變皆可與斯塔都聚體顯著減少之多聚體化相關。存在IgG2鉸鏈單體之兩個C-X-X-C部分。因此，本發明之斯塔都聚體單體可包含IgG2鉸鏈單體之完整12個胺基酸序列、或4個胺基酸核心之一者或二者以及Fc結構域單體。儘管核心結構之X-X可為任一胺基酸，但在一較佳實施例中，X-X序列係V-E或P-P。熟習此項技術者應瞭解，IgG2鉸鏈單體可由鉸鏈序列之任一部分以及核心4個胺基酸結構構成，包括全部IgG2鉸鏈序列及一些或全部IgG2 CH2及CH3結構域單體序列。不受理論限制，IgG2鉸鏈多聚體化結構域可藉由與斯塔都聚體單體之任一部分相互作用形成多聚體。亦即，一個斯塔都聚體單體之IgG2鉸鏈可結合另一斯塔都聚體單體之IgG2鉸鏈，藉此形成同源

二聚體之二聚體或更高次多聚體，同時相對於天然 IgG1 Fc 保持與 Fc 受體之提高之功能性結合。或者，一個斯塔都聚體單體之 IgG2 鉸鏈結構域可結合另一斯塔都聚體單體之 IgG1 鉸鏈，藉此形成同源二聚體之二聚體或更高次多聚體，同時相對於天然 IgG1 Fc 保持與 Fc 受體之提高之功能性結合。一個斯塔都聚體單體之 IgG2 鉸鏈結構域亦可結合至另一斯塔都聚體單體之 IgG1 Fc 結構域之另一部分(即 CH2 或 CH3 結構域)以形成同源二聚體之二聚體或更高次多聚體，同時相對於天然 IgG1 Fc 保持與 Fc 受體之提高之功能性結合。

白胺酸及異白胺酸拉鏈亦可用作多聚體化區。已知白胺酸及異白胺酸拉鏈(捲曲螺旋結構域)有助於形成蛋白二聚體、三聚體及四聚體(Harbury 等人 Science 262:1401-1407 (1993); O'Shea 等人 Science 243 :538 (1989))。可藉由利用異白胺酸拉鏈形成三聚體之天然傾向性來產生簇斯塔都聚體。

儘管熟習此項技術者應瞭解，可使用不同類型之白胺酸及異白胺酸拉鏈，但在一較佳實施例中，使用來自如所述所修飾之 GCN4 轉錄調節子之異白胺酸拉鏈(Morris 等人，Mol. Immunol. 44:3112-3121 (2007); Harbury 等人 Science 262:1401-1407 (1993)): GGGSIKQIEDKIEEILSKIYHIENEI ARIKKLIGERGHGGG (SEQ ID NO: 5)。此異白胺酸拉鏈序列僅係若干可用於 Fc 結構域單體之多聚體化之可能序列中的一者。儘管可使用 SEQ ID NO: 5 中所示之整個序列，

但該序列之帶下劃線部分代表可用於本發明成簇斯塔都聚體中之異白胺酸拉鏈之核心序列。因此，本發明之斯塔都聚體單體可包含異白胺酸拉鏈之完整胺基酸序列或28個胺基酸核心以及一或多個Fc結構域單體。熟習此項技術者亦應瞭解，異白胺酸拉鏈可由拉鏈之任一部分以及核心28個胺基酸結構構成，且因此可由28個以上但小於整個序列之胺基酸構成。

GPP係於人類膠原中發現引起膠原蛋白：蛋白結合之胺基酸序列。儘管熟習此項技術者應瞭解，可使用不同類型之GPP重複序列作為多聚體化結構域，但在一較佳實施例中，使用所述甘胺酸-脯胺酸-脯胺酸(Fan等人FASEB雜誌3796第22卷2008年)：(SEQ ID NO: 26)。此甘胺酸-脯胺酸-脯胺酸重複序列僅係若干可用於Fc結構域單體之多聚體化之可能序列中的一者。儘管可使用SEQ ID NO: 26中所示之整個序列，但亦可使用不同長度之重複序列來使Fc結構域單體多聚體化。同樣，在GPP重複序列內含有不同胺基酸之重複序列亦可經取代。

應瞭解，本文所揭示斯塔都聚體及其他仿生分子可自多種物種中之任一者獲得。實際上，任一本發明仿生分子中之Fc結構域或Fc部分結構域皆可得自一種以上(例如，來自2種、3種、4種、5種或更多種)物種之免疫球蛋白。然而，更常見地，其將得自單一物種。另外，應瞭解，可將本文所揭示方法(例如，治療方法)中之任一者施加至任一物種。通常，施加至所關注物種之仿生物之組份將全部得

自該物種。然而，亦可使用所有組份屬於不同物種或來自一種以上物種(包括或不包括施加相關方法之物種)之仿生物。

包含本發明斯塔都聚體及其他仿生物之Fc結構域及Fc部分結構域的具體CH1、CH2、CH3及CH4結構域及鉸鏈區可在免疫球蛋白亞類以及在獲得其之生物體方面經獨立地選擇。因此，本文所揭示之斯塔都聚體及其他仿生物可包含獨立地來自各種免疫球蛋白類型(例如人類IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA1、IgD、IgE及IgM、小鼠IgG2a或狗IgA或IgB)之Fc結構及部分Fc結構域。較佳地，對於人類治療劑而言，本發明Fc結構域屬於人類IgG1同種型。同樣，每一Fc結構域及部分Fc結構域可得自各種物種、較佳哺乳動物物種以產生物種特異性或嵌合斯塔都聚體分子，該等物種包括非人類靈長類動物(例如，猴子、狒狒及黑猩猩)、人類、鼠類、鼠屬、牛、馬科動物、貓科動物、犬、豬、兔、山羊、鹿、綿羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、倉鼠、蝙蝠、禽類(例如，雞、火雞及鴨)、魚及爬行動物。

個別Fc結構域及部分Fc結構域亦可經人類化。熟習此項技術者應認識到，不同Fc結構域及部分Fc結構域可提供不同類型之功能性。舉例而言，Fc γ R特異性結合至IgG免疫球蛋白而非其他類別之免疫球蛋白。因此，意欲設計具有多種Fc γ 受體結合能力之斯塔都聚體的熟習此項技術者會設計至少納入IgG之充分表徵之Fc γ 受體結合序列(包括較

低IgG鉸鏈區及/或IgG CH2 & CH3結構域中之Fc γ 受體結合序列)的斯塔都聚體Fc結構域。熟習此項技術者亦應瞭解，各種有害結果可能與特定Ig結構域之使用相關，例如與IgA輸注相關之過敏性反應。本文所揭示仿生物通常應經設計以避免此等效應，但在特定情況下可能需要此等效應。

本發明亦涵蓋包含Fc結構域及Fc部分結構域之斯塔都聚體；該等Fc結構域及Fc部分結構域具有不同於天然存在之Fc結構域或Fc部分結構域之胺基酸序列的胺基酸。納入本發明仿生化合物內之較佳Fc結構域與完全-Fc γ 受體或Fc γ R之可溶性細胞外結構域部分具有可量測比結合親和力。眾多Fc結構域及Fc結構域單體之一級胺基酸序列及X射線結晶學結構可在業內獲得。例如，參見Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. Nat Rev Immunol. 2004年2月；4(2):89-99。具有Fc γ 受體結合能力之代表性Fc結構域包括來自人類IgG1之Fc結構域(SEQ ID NO: 2)。該等天然序列已經受廣泛的結構-功能分析，包括功能性序列之定點誘變作圖。基於該等先前結構-功能研究及可獲得之結晶學數據，熟習此項技術者可設計功能性Fc結構域序列變體，同時保持Fc結構域之Fc γ R受體結合能力。舉例而言，半胱胺酸殘基可經添加以增強單體間之硫鍵或經缺失以更改斯塔都聚體同源二聚體間之相互作用。

胺基酸變化可見於整個Fc結構域序列內，或侷限於包含

Fc結構域之特定Fc部分結構域。本發明之斯塔都聚體及其他仿生物中所用Fc結構域之功能性變體將與天然Fc結構域具有至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。同樣，本發明之斯塔都聚體及其他仿生物中所用Fc部分結構域之功能性變體將與天然Fc部分結構域具有至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

熟習此項技術者應瞭解，本發明進一步涵蓋Fc結構域單體之功能性變體在構建本發明之Fc片段單體、Fc部分片段單體、斯塔都聚體單體及其他單體中之用途。Fc結構域單體之功能性變體將與天然Fc結構域單體序列具有至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

同樣，本發明亦涵蓋Fc部分結構域單體之功能性變體在構建本發明之Fc片段單體、Fc部分片段單體、Fc結構域單體、斯塔都聚體單體及其他單體中之用途。Fc部分結構域單體之功能性變體將與天然Fc部分結構域單體序列具有至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

胺基酸變化可降低、增加斯塔都聚體與Fc γ 受體之結合親和力或不更改該力。較佳地，此等胺基酸變化將係保守胺基酸取代，然而，此等變化包括缺失、添加及其他取代。保守胺基酸取代通常包括在以下群組內之變化：甘胺酸及丙胺酸；纈胺酸、異白胺酸及白胺酸；天冬胺酸及麩

胺酸；天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸及蘇胺酸；離胺酸、組胺酸及精胺酸；以及苯丙胺酸及酪胺酸。另外，胺基酸變化可藉由(例如)添加半胱胺酸殘基來增強多聚體化強度。

胺基酸變化可係導致Fc結構域多態性之天然存在之胺基酸變化，或胺基酸變化可藉由(例如)定點誘變引入。胺基酸變化可發生於Fc結構域內任何地方，只要Fc結構域保持其受體結合功能及生物活性即可。在一較佳實施例中，多態性或突變使受體結合增強及/或多聚體化或生物功能增強。根據EU指數(如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中所述)，多態性/突變較佳發生於胺基酸位置233至435中之一或多者處。該等胺基酸位置中之具體多態性/突變為業內所熟知且可參見(例如)Shields等人，(2001)「High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR」J. Biol. Chem., 276(9):6591-6601，其全部內容以引用方式併入本文中。

在一較佳實施例中，多態性/突變含有IgG1 Fc之位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、

301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435及/或436之一或多個胺基酸取代。在又一實施例中，多態性/突變含有IgG1 Fc之233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435及/或436之兩個或更多個胺基酸取代。在又一實施例中，多態性/突變含有IgG1 Fc之位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435及/或436之三或更多個胺基酸取代。在又一實施例中，多態性/突變含有IgG1 Fc之位置233、234、235、236、237、238、239、253、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、280、285、286、288、290、293、295、296、297、

298、301、303、305、307、309、311、312、315、317、322、326、327、329、330、331、332、333、334、337、338、339、360、362、376、378、380、382、392、414、415、424、430、433、434、435及/或436之三個以上胺基酸取代。

本文所用術語「功能性變體」係指藉由與參照序列之同源性所關聯之序列，其能夠介導與參照序列(當為多肽時)相同之生物效應，或其編碼能夠介導與由參照序列(當為聚核苷酸時)編碼之多肽相同之生物效應的多肽。舉例而言，本文所述仿生物中任一者之功能性變體將具有指定同源性或一致性且將能夠免疫調節單核細胞或DC。功能性序列變體包括聚核苷酸與多肽二者。通常使用BLAST 2.0(基本局部對準搜索工具)利用默認參數操作來評估序列一致性：過濾器-開啟，計數矩陣-BLOSUM62，字長-3，E值-10，空位成本-11,1及對準-50。

自上文應瞭解，本發明斯塔都聚體包括具有以下之斯塔都聚體：(a)僅天然存在之Fc結構域；(b)天然存在之Fc結構域與具有經更改胺基酸序列之Fc結構域之混合物；及(c)僅具有經更改胺基酸序列之Fc結構域。所需要的一切係含有經更改胺基酸序列之斯塔都聚體與兩個或更多個Fc γ R受體結合之能力為包含具有天然存在之序列之Fc結構域的對應斯塔都聚體與兩個或更多個Fc γ R受體結合之能力的至少25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%或甚至更多。

存在於本發明斯塔都聚體中之上述Fc γ 受體結合位點可經由遺傳改造更改序列以便以可預測方式獲得相對於天然序列具有經更改結合能力及親和力之結合位點。舉例而言，特定殘基可經更改以減少仿生化合物與Fc γ RIIb之Fc結構域結合，同時增加與Fc γ RIIIa之結合。對hIgG Fc γ 受體結合序列進行的基於廣泛誘變之結構-功能分析之一實例係Robert L. Shields等人，High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc γ R. J. Biol. Chem., 2001年2月；276: 6591-6604。已對鼠類IgG Fc (mIgG Fc)實施相似研究。基於天然IgG Fc結構域跨物種之結構及一級序列同源性，熟習此項技術者可將對人類IgG Fc及小鼠IgG Fc之廣泛的結構-功能知識轉化為對本發明仿生化合物中所有天然Fc γ 受體結合位點序列之合理誘變以設計具有特定Fc γ 受體特異性及結合親和力之結合位點。

除天然Fc結構域之胺基酸序列組成外，已知Fc結構域之碳水化合物含量對Fc結構域結構及與Fc γ R之結合相互作用起重要作用。例如，參見Robert L. Shields等人，Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc γ RIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. J. Biol. Chem., 2002年7月；277: 26733-26740 (doi:10.1074/jbc.M202069200)；Ann Wright及Sherie L. Morrison. Effect of C2- Associated Carbohydrate Structure

on Ig Effector Function: Studies with Chimeric Mouse-Human IgG1 Antibodies in Glycosylation Mutants of Chinese Hamster Ovary Cells. J. Immunol, 1998年4月; 160: 3393-3402。碳水化合物含量可使用(例如)特定蛋白質表現系統(包括特定細胞系)或活體外酵素修飾來控制。因此, 本發明包括含有Fc結構域之斯塔都聚體以及彼等具有經更改碳水化合物含量之仿生化合物, 該等Fc結構域具有獲得該等結構域之完全抗體之天然碳水化合物含量。在另一實施例中, 斯塔都聚體之多聚體組份之特徵在於與相同斯塔都聚體之同源二聚體組份相比不同的糖基化模式。在一較佳實施例中, 斯塔都聚體經富集用於包含增強Fc受體結合之糖基化模式的多聚體。

向多肽鏈中添加Fc部分結構域(多聚體化區)或糖基化變化可使Fc結構域產生構造變化, 從而使Fc結構域與Fc γ 受體之結合增強。因此, 多肽表面上極微小之變化亦可產生能夠多個Fc γ 受體之結合增強之斯塔都聚體或結合多個Fc γ 受體之能力降低之斯塔都聚體。

部分結構域及部分片段

熟習此項技術者應進一步認識到, 本發明實施例中所用Fc結構域及Fc部分結構域不必為全長形式。亦即, 本發明涵蓋Fc結構域單體及Fc部分結構域單體之應用, 該等Fc結構域單體及Fc部分結構域單體缺乏來自包含本發明斯塔都聚體及其他仿生物之特定Fc結構域單體及Fc部分結構域單體之胺基末端、羧基末端或中間的胺基酸。

舉例而言，已闡述人類IgG免疫球蛋白上對Fc γ 受體之結合位點(例如，Radaev, S., Sun, P., 2001. Recognition of Immunoglobulins by Fc γ Receptors. *Molecular Immunology* 38, 1073-1083；Shields, R.L.等人，2001. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc γ R. *J. Biol. Chem.* 276 (9), 6591-6604)。基於該認識，可自該等免疫球蛋白之Fc結構域去除胺基酸並確定對Fc結構域與受體之間之結合相互作用之效應。因此，本發明涵蓋具有涵蓋下部鉸鏈及CH2之位置233至338之胺基酸之至少約90%的IgG Fc結構域，如Radaev, S., Sun, P., 2001中所定義。

本發明IgG免疫球蛋白之Fc部分結構域包括鉸鏈區之全部或部分、CH2結構域之全部或部分及CH3結構域之全部或部分。

自Fc部分結構域單體構建僅具有鉸鏈區之一部分、CH2結構域之一部分或CH3結構域之一部分的IgG Fc部分結構域。因此，本發明包括得自鉸鏈區之N末端或鉸鏈區之C末端之IgG鉸鏈區單體。因此，其可含有(例如)鉸鏈區之5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61或62個(對於IgG1最多

15個，對於IgG2最多12個，對於IgG3最多62個，對於IgG4最多12個)胺基酸。

本發明亦包括得自CH2結構域之N末端或CH2結構域之C末端之IgG CH2結構域單體。因此，其可含有(例如)CH2結構域之5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109或110個(對於IgG1及IgG3最多110個，對於IgG2及IgG4最多109個)胺基酸。

本發明進一步包括得自CH3結構域之N末端或CH3結構域之C末端之IgG CH3結構域單體。因此，其可含有(例如)CH3結構域之5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、

87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106或107個(對於IgG1及IgG3最多106個，對於IgG2及IgG4最多107個)胺基酸。

自上文應瞭解，本發明之不同實施例包括含有以下之斯塔都聚體：(a) 全長Fc結構域；(b) 全長Fc結構域與Fc部分結構域之混合物；及(c) Fc部分結構域。在該等實施例中之每一者中，斯塔都聚體可進一步包含CH1結構域。如本文所述，在本發明斯塔都聚體之每一實施例中，斯塔都聚體具有結合兩個或更多個Fc γ 受體之能力。

斯塔都聚體及斯塔都聚體單體之較佳實施例

本文所用術語「Fc γ R」及「Fc γ 受體」包括在免疫細胞表面上表現之Fc γ 受體蛋白質家族的每一成員，如以下文獻中所述：Nimmerjahn F及Ravetch JV. Fc γ receptors: old friends and new family members. Immunity. 2006年1月；24(1): 19-28，或可於稍後定義。本文所述術語「Fc γ R」意欲涵蓋Fc γ RI、RII及RIII家族之所有成員。Fc γ 受體包括低親和力及高親和力Fc γ 受體，包括(但不限於)Fc γ RI (CD64)；Fc γ RII (CD32)及其同種型及同種異型Fc γ RIIa LR、Fc γ RIIa HR、Fc γ RIIb及Fc γ RIIc；Fc γ RIII (CD 16)及其同種型Fc γ RIIIa及Fc γ RIIIb。熟習此項技術者應認識到，本發明包括結合至Fc γ R及Fc γ R同源物(例如彼等闡述於Davis等人，(2004) 「Differential B cell expression of mouse Fc receptor homologs,」 Int. Immunol., 16(9):1343-

1353中者)之化合物，其適用於可能尚未發現之未來Fc γ R及相關同種型及同種異型。

已闡述，hIVIG結合至新生兒Fc受體(「FcRn」)並使其完全飽和且此對FcRn之競爭性抑制可在hIVIG之生物活性上起重要作用(例如Mechanisms of Intravenous Immunoglobulin Action in Immune Thrombocytopenic Purpura. F. Jin, J. Balthasar. Human Immunology, 2005, 第66卷，第4期，第403-410頁)。由於強力結合至Fc γ 受體之免疫球蛋白亦至少在一定程度上結合至FcRn，因此熟習此項技術者應認識到，能夠結合至一個以上Fc γ 受體之斯塔都聚體亦可結合至FcRn並可使其完全飽和。

本文所用「能夠特異性結合至Fc γ Rx」係指結合至Fc γ R，例如Fc γ RIII。特異性結合通常定義為結合分析中可由隨後過量未經標記配體替代之經標記配體之量。然而，此不排除業內已充分建立之其他評估特異性結合之手段(例如，Mendel CM, Mendel DB, 'Non-specific' binding. The problem, and a solution. Biochem J. 1985年5月15日；228(1):269-72)。特異性結合可以業內熟知之多種方式(例如表面電漿共振(SPR)技術(經由BIACORE®購得)或生物層干涉量測法(經由ForteBio®購得))來量測以表徵免疫活性仿生物之締合與解離常數二者(Asian K, Lakowicz JR, Geddes C. Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. Current Opinion in Chemical Biology 2005, 9:538-544)。

「經聚集天然IgG之免疫學活性」係指在使免疫系統暴露於IgG聚集體後影響免疫系統功能之多聚體化IgG之性質。天然多聚體化IgG之特定性質包括與Fc γ R之經更改特異性結合、免疫細胞表面上Fc γ R之交聯或多聚體化IgG之效應功能性，例如抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、細胞吞噬作用(ADCP)或補體固定(例如，參見Nimmerjahn F, Ravetch JV. The anti-inflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med*. 2007; 204: 11-15 ; Augener W, Friedman B, Brittinger G. Are aggregates of IgG the effective part of high-dose immunoglobulin therapy in adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)? *Blut*. 1985; 50: 249-252 ; Arase N, Arase H, Park SY, Ohno H, Ra C, Saito T. Association with FcR γ is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J Exp Med*. 1997;186:1957-1963 ; Teeling JL, Jansen- Hendriks T, Kuijpers TW等人，Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood*. 2001; 98: 1095-1099 ; Anderson CF, Mosser DM. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol*. 2002; 168: 3697-3701 ; Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc γ R: current models. *Immunology Letters*.

2002; 82: 57 ; Banki Z, Kacani L, Mullauer B 等人 , Cross-Linking of CD32 Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Via NF- κ B Signaling Pathway. J Immunol. 2003; 170: 3963-3970 ; Siragam V, Brine D, Crow AR, Song S, Freedman J, Lazarus AH. Can antibodies with specificity for soluble antigens mimic the therapeutic effects of intravenous IgG in the treatment of autoimmune disease? J Clin Invest. 2005; 115: 155-160) 。

通常藉由比較同源二聚體IgG之性質來評價該等性質。

本文所用「相當於或優於複數種天然存在之聚集IgG免疫球蛋白的Fc γ 受體交聯或效應功能性」意指斯塔都聚體產生使用hIVIG之相似劑量或濃度所達成值之約70%或更多的Fc γ 受體交聯分析值。在一些實施例中，分析值至少在使用hIVIG所達成分析值之標準誤差範圍內。在其他實施例中，分析值比hIVIG之值高10%或更高。用於Fc γ 交聯之分析為彼等熟習此項技術者所熟知(例如，參見Nimmerjahn及Ravetch, (2008)「Fc γ receptors as regulators of immune responses」Nature Reviews Immunology, 8: 34-47)。

儘管已發現更高次多聚體可有效調節免疫反應，但令人驚奇地發現同源二聚體亦係有效免疫調節劑。不受理論限制，吾人相信同源二聚體能夠在活體內形成更高次多聚體。已經由多聚體化實驗發現，其他純的同源二聚體群能夠在低濃度血液或胎牛血清存在下多聚體化。因此，儘管

更高次多聚體在調節免疫反應上比同源二聚體部分更為有效，但本發明之天然連接之斯塔都聚體的同源二聚體部分部分地經由同源二聚體在低濃度血液或血清存在下之多聚體化亦為有效免疫調節劑。因此，所謂「更高次多聚體」意指在注射至個體中之前在溶液中形成的超過同源二聚體之多聚體以及在活體內形成之超過同源二聚體之多聚體。

「免疫調節活性」、「調節免疫反應」、「調節免疫系統」及「免疫調節」意指藉由改變一或多種免疫細胞之活性、能力及相對數目(包括細胞類型在其細胞類型內或向其他細胞類型之成熟)來更改免疫系統。舉例而言，對未成熟淋巴細胞之免疫調節可產生更大的更成熟淋巴細胞群、樹突細胞群、巨噬細胞或破骨細胞群，所有該等細胞皆衍生自未成熟單核細胞。就另一實例而言，對記憶性B細胞之免疫調節可導致某些記憶性B細胞之選擇性細胞凋亡，同時伴隨特定抗體之產生減少。就另一實例而言，對NK細胞之免疫調節可使抗體依賴性細胞毒性增強。就另一實例而言，免疫調節活性可使具有其他可能不以高程度表現之表型的細胞群(例如CD8 β +/CD11c +細胞)增加。就另一實例而言，免疫調節活性可使促炎細胞因子或自體免疫性疾病中通常升高之細胞因子(例如IL-6及IL-8)減少。就另一實例而言，免疫調節活性可使NKT細胞激活並隨後使TGF- β 分泌及裂解。舉例而言，免疫細胞受體可由免疫活性仿生物結合並激活細胞內信號傳導以誘導各種免疫細胞變化，其單獨稱作「激活免疫調節」。阻斷免疫細胞受體以

防止受體激活亦涵蓋在「免疫調節」內且可單獨稱作「抑制免疫調節」。

對樹突細胞之調節可藉由(例如)誘導CD86及/或CD1a在樹突細胞表面上之表現來促進或抑制抗原呈遞至T細胞。CD1a係在抗原呈遞細胞、尤其樹突細胞表面上表現的MHC-I類相關糖蛋白。CD1a參與脂質抗原至T細胞之呈遞。CD86亦在抗原呈遞細胞表面上表現並向T細胞提供共刺激。CD86係T細胞表面上CD28與CTLA-4二者之配體以分別發送激活及抑制信號。因此，CD86及其同源受體之表現程度決定將誘導耐受抑或特異性免疫反應。在一較佳實施例中，本發明斯塔都聚體能夠部分地藉由誘導CD86及CD1a在抗原呈遞細胞、尤其樹突細胞表面上之表現來調節免疫反應。

對單核細胞之成熟之調節係指使單核細胞分化為成熟DC、巨噬細胞或破骨細胞。可調節分化以加速經歷分化之單核細胞之成熟速率及/或增加其數目。或者，可在經歷分化之細胞之分化速率及/或數目方面降低分化。

本文所用術語「經分離」多肽或肽係指無天然存在之對等部分或已自天然伴隨之組份分離或純化之多肽或肽，例如存在於組織(例如胰腺、肝、脾、卵巢、睪丸、肌肉、關節組織、神經元組織、胃腸組織或乳腺組織或腫瘤組織(例如，乳腺癌組織))或體液(例如血液、血清或尿)中者。通常，當多肽或肽以乾重計至少70%不含所天然締合之蛋白質及其他天然存在之有機分子時，將其視為「經分

離」。較佳地，本發明多肽(或肽)製劑以乾重計分別係至少80%、更佳至少90%且最佳至少99%本發明多肽(肽)。由於化學合成之多肽或肽本質上係自天然伴隨之組份分離，因此合成多肽或肽係「經分離」的。

本發明之經分離多肽(或肽)可藉由(例如)以下方式獲得：自天然來源(例如，自組織或體液)提取；編碼多肽或肽之重組核酸之表現；或化學合成。在不同於多肽或肽天然發源之來源之細胞系統中產生的該多肽或肽係「經分離」的，此乃因其將必定不含天然伴隨之組份。在一較佳實施例中，本發明之經分離多肽僅含有對應於前導肽(SEQ ID NO: 1)、IgG1 Fc單體(SEQ ID NO: 2)及IgG2鉸鏈多聚體化結構域(SEQ ID NO: 3)或異白胺酸多聚體化結構域(SEQ ID NO: 5)之序列且不含可有助於選殖或純化蛋白質之其他序列(即經引入限制酵素識別位點或純化標籤)。分離程度或純度可藉由任一合適方法來量測，例如管柱層析、聚丙烯醯胺凝膠電泳或HPLC分析。

醫藥組合物

本文所述斯塔都聚體組合物將經由任一常見途徑經口、非經腸或局部投與。實例性途徑包括(但不限於)口、鼻、經頰、直腸、陰道、眼、皮下、肌內、腹膜內、靜脈內、動脈內、腫瘤內、脊椎、鞘內、關節內、動脈內、珠網膜下、舌下、口腔黏膜、枝氣管、淋巴、子宮內、皮下、腫瘤內、整合於諸如縫合線等可植入裝置上或諸如可植入聚合物等可植入裝置中、硬膜內、皮質內或真皮。此等組合

物通常會以本文所述醫藥上可接受之組合物形式投與。在一較佳實施例中，經分離斯塔都聚體係經靜脈內或經皮下投與。

本文所用術語「醫藥上可接受之載劑」包括任何及全部溶劑、分散介質、塗覆劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑及諸如此類。此等醫藥活性物質之介質及試劑之使用為業內所熟知。除任何與本發明之載體或細胞不相容之習用介質或試劑之外，本發明涵蓋其於治療組合物中之用途。亦可將補加之活性成份納入組合物中。

本發明之斯塔都聚體組合物可調配呈中性或鹽形式。醫藥上可接受之鹽包括酸加成鹽(利用蛋白質之游離胺基形成)，且該等鹽係利用無機酸(例如氫氯酸或磷酸)或有機酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸及諸如此類)形成。利用游離羧基形成之鹽亦可衍生自諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵等無機鹼及諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸、普魯卡因(procaine)及諸如此類等有機鹼。

無菌可注射溶液係藉由視需要以所需量在具有上文所列舉各種其他成份之合適溶劑中納入斯塔都聚體、隨後過濾滅菌來製備。通常，分散液係藉由將各種經滅菌活性成份納入含有基本分散介質及來自上文所列舉成份所需其他成份之無菌媒劑中來製備。在使用無菌粉末來製備無菌可注射溶液之情形下，較佳製備方法係真空乾燥及冷凍乾燥技術，其可產生由活性成份加上任一所期望附加成份構成之

粉末(來自其先前經無菌過濾之溶液)。

此外，一個實施例提供在有或無惰性稀釋劑之醫藥上可接受之載劑中適於經口投與之斯塔都聚體組合物。該載劑應可吸收或食用且包括液體、半固體(即，膏糊)或固體載劑。除任一習用介質、試劑、稀釋劑或載劑有害於接受者或含於其中之斯塔都聚體製劑之治療有效性外，其在用於實踐本發明方法之經口可投與斯塔都聚體組合物中之用途係合適的。載劑或稀釋劑之實例包括脂肪、油、水、鹽水溶液、脂質、脂質體、樹脂、黏合劑、填充劑及諸如此類或其組合。本文所用術語「經口投與」包括口、經頰、腸或胃內投與。

在一個實施例中，將斯塔都聚體組合物以任一便利及實際方式(即，藉由溶解、懸浮、乳化、混合、囊封、微囊封、吸收及諸如此類)與載劑組合。此等程序為彼等熟習此項技術者所熟知。

在一具體實施例中，將呈粉末形式之斯塔都聚體組合物與半固體或固體載劑充分組合或混合。可以任一便利方式(例如研磨)來實施混合。亦可在混合過程中添加穩定劑以防止組合物經由即胃中變性損失治療活性。用於經口可投與組合物中之穩定劑之實例包括緩衝劑、胃酸分泌拮抗劑、胺基酸(例如甘胺酸及離胺酸)、碳水化合物(例如右旋糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麥芽糖、山梨醇、甘露醇等)、蛋白水解酵素抑制劑及諸如此類。更佳地，對於經口投與組合物而言，穩定劑亦可包括胃酸分泌

拮抗劑。

此外，可將與半固體或固體載劑組合用於經口投與之斯塔都聚體組合物進一步調配成硬或軟殼明膠膠囊、錠劑或丸劑。更佳地，明膠膠囊、錠劑或丸劑經腸溶性塗覆。腸溶包衣防止組合物在pH為酸性之胃或高位腸道中變性。即，參見美國專利第5,629,001號。在到達小腸後，其中之鹼性pH溶解包衣並使組合物釋放以與腸細胞(例如，培氏斑細胞(Peyer's patch M cell))相互作用。

在另一實施例中，將呈粉末形式之斯塔都聚體組合物與產生囊封免疫活性仿生物或附著免疫活性仿生物之奈米顆粒之材料充分組合或混合。每一奈米顆粒之大小應小於或等於100微米。奈米顆粒可具有黏膜黏著性質，此允許胃腸吸收其他不能經口生物利用之免疫活性仿生物。

在另一實施例中，將組合物粉末與具有或無穩定劑之液體載劑(例如，即水或鹽水溶液)組合。

可使用之具體斯塔都聚體調配物係免疫活性仿生蛋白質存於基於低滲磷酸鹽之緩衝液中之溶液，其不含鉀，其中該緩衝液之組成如下：6 mM磷酸二氫鈉單水合物，9 mM磷酸氫二鈉七水合物，50 mM氯化鈉，pH 7.0 +/- 0.1。免疫活性仿生蛋白質在低滲緩衝液中之濃度可介於10微克/ml至100毫克/ml範圍。此調配物可經由任一投與途徑投與，例如(但不限於)靜脈內投與。

此外，可將與半固體載劑組合用於局部投與之斯塔都聚體組合物進一步調配成乳霜或凝膠軟膏。用於形成凝膠軟

膏之較佳載劑係凝膠聚合物。用於製造本發明凝膠組合物之較佳聚合物包括(但不限於)卡波普(carbopol)、羧甲基纖維素及普流尼克(pluronic)聚合物。具體而言，將Fc多聚體組合物粉末與含有強度介於0.5% wt/體積與5% wt/體積之間之聚合劑(例如卡波普980)的凝膠水溶液組合用於施加至皮膚用以治療皮膚之上或之下之疾病。本文所用術語「局部投與」包括施加至真皮、表皮、皮下或黏膜表面。

此外，斯塔都聚體組合物可調配成聚合物用於皮下或真皮下植入。用於可植入藥物輸注聚合物之較佳調配物係通常視為安全之試劑且可包括(例如)交聯葡聚糖(Samantha Hart, Master of Science Thesis, 「Elution of Antibiotics from a Novel Cross-Linked Dextran Gel: Quantification」 Virginia Polytechnic Institute and State University, 2009年6月8日)、葡聚糖-酪胺(Jin等人(2010) Tissue Eng. Part A. 16(8): 2429-40)、葡聚糖-聚乙二醇(Jukes等人(2010) Tissue Eng. Part A., 16(2): 565-73)或葡聚糖-戊二醛(Bronsted等人(1998) J. Controlled Release, 53: 7-13)。熟習此項技術者應瞭解，可形成許多納入固定於聚合物或水凝膠內之斯塔都聚體之相似聚合物及水凝膠。

在調配後，以與劑量調配物相容之方式且以治療有效量投與各溶液以改良或補救症狀。以多種劑型(例如可攝取溶液、藥物釋放膠囊及諸如此類)容易地投與該等調配物。劑量可端視所治療個體之狀況而進行一些變化。負責投與者無論如何皆可確定個別個體之合適劑量。此外，對

於人類投與而言，製劑符合FDA生物製品評價與研究標準中心(FDA Center for Biologics Evaluation and Research standards)所要求之無菌性、一般安全性及純度標準。

投與途徑將自然地隨所治療疾病之位置及性質而變化，且可包括(例如)真皮內、經真皮、非經腸、鼻、靜脈內、肌內、鼻內、皮下、經皮、氣管內、腹膜內、腫瘤內、灌注、灌洗、直接注射及經口投與。

本文所用術語「非經腸投與」包括不涉及經由腸之吸收而將化合物吸收至個體中之任一形式的投與。用於本發明中之實例性非經腸投與包括(但不限於)肌內、靜脈內、腹膜內、腫瘤內、眼內、鼻或關節內投與。

另外，本發明斯塔都聚體可視情況在另一醫藥劑之前、期間或之後投與。舉例而言，已令人驚奇地發現，本發明斯塔都聚體與潑尼松龍之伴隨投與可協同達成優於利用單獨斯塔都聚體組合物或潑尼松龍所觀察到之結果(參見圖3)。

以下係用於具體實例性疾病之各種醫藥調配物類別及較佳投與途徑的具體實例，如所顯示：

經頰或舌下可溶解錠劑：心絞痛、結節性多動脈炎。

靜脈內：特發性血小板減少性紫癜、包涵體肌炎、副蛋白血症IgM脫髓鞘多發性神經病變、壞死性筋膜炎、天皰瘡、壞疽、皮肌炎、肉芽腫、淋巴瘤、敗血症、再生障礙性貧血、多系統器官衰竭、多發性骨髓瘤及未知意義之單株丙種球蛋白病變、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經根神經

病變、發炎性肌病、血栓性血小板減少性紫癜、肌炎、貧血、腫瘤形成、溶血性貧血、腦炎、脊髓炎、尤其與人類嗜T淋巴細胞病毒1相關之脊髓病變、白血病、多發性硬化及視神經炎、哮喘、表皮壞死、朗-愛氏肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、重症肌無力、神經病變、葡萄膜炎、格-巴氏症候群(Guillain-Barré syndrome)、移植物抗宿主疾病、僵人症候群(Stiff Man Syndrome)、具有抗Yo抗體之副腫瘤性小腦變性、副腫瘤性腦脊髓炎及具有抗Hu抗體之感覺神經病變、全身性血管炎、全身性紅斑狼瘡、自體免疫性糖尿病性神經病變、急性特發性自主神經機能障礙性神經病變、伏格特-小柳-原田氏症候群(Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome)、多灶性運動神經病變、與抗/GM1相關之下位運動神經元症候群、脫髓鞘、膜性增生性腎小球腎炎、心肌病變、川崎病(Kawasaki's disease)、類風濕性關節炎及埃文斯症候群(Evan's syndrome) IM-ITP、CIDP、MS、皮膚炎、重症肌無力、肌營養不良症。本文所用術語「靜脈內投與」包括所有經由靜脈內注射或輸注將本發明化合物或組合物遞送至全身循環之技術。

真皮凝膠、洗劑、乳霜或貼片：白癜風、帶狀皰疹、瘡瘡、唇炎。

直腸栓劑、凝膠或輸注：潰瘍性結腸炎、痔性發炎。

經口，呈經囊封或具有腸溶包衣之丸劑、含錠劑形式：克隆氏病(Crohn's disease)、口炎性腹瀉、腸易激性症候

群、發炎性肝病、巴瑞特氏食道症(Barrett's esophagus)。

皮質內：癲癇、阿茲海默氏病、多發性硬化、帕金森氏病、亨庭頓氏病。

腹內輸注或植入：子宮內膜異位症。

陰道內凝膠或栓劑：細菌性、毛滴蟲性或真菌性陰道炎。

醫學裝置：塗覆於冠狀動脈支架、假關節上。

本文所述斯塔都聚體可以約0.01 mg/kg至約300 mg/kg體重且尤其0.01 mg/kg體重至約1000 mg/kg體重之劑量投與，且可至少每天一次、每週一次、每兩週一次或每月一次投與。可使用二期給藥方案，其中第一給藥期包含第二給藥期之約0.1%至約10%。

斯塔都聚體之治療應用

基於合理設計及活體外及活體內驗證，本發明斯塔都聚體可用作重要的生物藥劑，用於治療自體免疫性疾病及用於在多種其他情形(例如用於癌症及發炎性疾病之生物免疫療法)下調節免疫功能。適於用本文所述免疫活性仿生物治療之醫學病況包括彼等當前可用hIVIGi常規治療或其中已發現hIVIG在臨床上有用者，例如自體免疫性血球減少、格-巴氏症候群、重症肌無力、抗因子VIII自體免疫性疾病、皮膚炎、血管炎及葡萄膜炎(參見F. G. van der Meche, P. I. Schmitz, N. Engl. J. Med. 326, 1123 (1992); P. Gajdos 等人, Lancet i, 406 (1984); Y. Sultan, M. D. Kazatchkine, P. Maisonneuve, U. E. Nydegger, Lancet ii,

765 (1984) ; M. C. Dalakas 等人 , N. Engl. J. Med. 329, 1993 (1993) ; D. R. Jayne, M. J. Davies, C. J. Fox, C. M. Black, C. M. Lockwood, Lancet 337, 1137 (1991) ; P. LeHoang, N. Cassoux, F. George, N. Kullmann, M. D. Kazatchkine, Ocul. Immunol. Inflamm. 8, 49 (2000)) ; 及彼等可使用單株抗體或其業已處於臨床應用中之癌症或發炎性病況者。包括在可藉由為本發明標的之化合物有效治療之病況內之病況包括在細胞因子網絡中具有不平衡之發炎性疾病、由致病性自體抗體或自體攻擊性T細胞介導之自體免疫性病症、或慢性復發性自體免疫性、炎症性或傳染性疾病或過程之急性或慢性期。

另外，具有發炎性組份之其他醫學病況將受益於用斯塔都聚體治療，例如肌萎縮側索硬化、亨庭頓氏病、阿茲海默氏病、帕金森氏病、心肌梗塞、中風、B型肝炎、C型肝炎、人類免疫缺陷病毒相關性發炎、腎上腺腦白質營養不良及癲癇性病症(尤其彼等相信與後病毒腦炎相關者，包括羅斯默森氏症候群(Rasmussen Syndrome)、韋斯特症候群(West Syndrome)及倫-格症候群(Lennox-Gastaut Syndrome))。

使用本文所述經分離斯塔都聚體之療法之一般方法係向患有疾病或病況之個體投與治療有效量之經分離免疫活性仿生物以實現治療。在一些實施例中，可將疾病或病況廣泛地歸類為在細胞因子網絡中具有不平衡之發炎性疾病、由致病性自體抗體或自體攻擊性T細胞介導之自體免疫性

病症、或慢性復發性疾病或過程之急性或慢性期。

本文所用術語「治療(treating及treatment)」係指向個體投與治療有效量之本發明斯塔都聚體，以便改良該個體之疾病或病況或該疾病或病況之症狀。改良係疾病或病況或該疾病或病況之症狀之任一改良或補救。改良係可觀察或可量測之改良，或可係個體之一般幸福感之改良。因此，熟習此項技術者認識到，治療可改良病況，但可能並非完全治癒該疾病。具體而言，個體之改良可包括以下中之一或多者：減少之發炎；減少之發炎性實驗室標記物，例如C-反應性蛋白；減少之自體免疫，如藉由以下中之一或多者所證實：自體免疫性標記物(例如自體抗體)或血小板計數、白血球計數或紅血球計數之改良、減少之疹或紫癍、虛弱、麻木或麻刺感降低、高血糖症患者之上升之葡萄糖含量、減少之關節痛、發炎、腫脹或退化、痛性痙攣及腹瀉頻率及體積減少、減少之心絞痛、減少之組織發炎或發作頻率減少；癌症腫瘤負荷降低、腫瘤進展時間延長、降低之癌症疼痛、延長之存活或生活品質改良；或進展之延遲或骨質疏鬆症改良。

本文所用術語「治療有效量」係指改良或補救疾病或病況之症狀之量。

本文所用「預防」可意指疾病症狀之完全預防、疾病症狀發作之延遲或隨後所產生疾病症狀之嚴重度之減輕。

本文所用術語「個體」意指根據本文所述方法投與本發明斯塔都聚體之任一哺乳動物個體。在一具體實施例中，

本發明方法用於治療人類個體。本發明方法亦可用於治療非人類靈長類動物(例如，猴子、狒狒及黑猩猩)、小鼠、大鼠、牛、馬、貓、狗、豬、兔、山羊、鹿、綿羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、倉鼠、蝙蝠、禽類(例如，雞、火雞及鴨)、魚及爬行動物以產生物種特異性或嵌合斯塔都聚體分子。

特定而言，本發明斯塔都聚體可用於治療包括(但不限於)以下之病況：充血性心臟衰竭(CHF)、血管炎、酒渣鼻、痤瘡、濕疹、心肌炎及其他心肌病況、全身性紅斑狼瘡、糖尿病、脊椎病、滑膜纖維母細胞病及骨髓間質病；骨丟失；佩吉特氏病(Paget's disease)、破骨細胞瘤；多發性骨髓瘤；乳腺癌；廢用性骨質減少；營養不良、牙周病、高歇氏病(Gaucher's disease)、朗格漢斯細胞組織細胞增生症(Langerhans' cell histiocytosis)、脊髓損傷、急性敗血性關節炎、骨軟化症、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、單骨纖維發育不良、多骨纖維發育不良、牙周重建及骨折；結節病；溶骨性骨癌、肺癌、腎癌及直腸癌；骨轉移、骨痛管控及體液惡性高鈣血症、強直性脊柱炎及其他脊椎關節病；移植排斥、病毒感染、血液腫瘤形成及腫瘤樣病況，例如，何傑金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)；非何傑金氏淋巴瘤(伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、小淋巴細胞淋巴瘤/慢性淋巴細胞白血病、蕁樣肉芽腫病、套細胞淋巴瘤、濾泡淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病及淋巴質漿細胞

白血病)、淋巴細胞前體細胞瘤(包括B細胞急性淋巴母細胞白血病/淋巴瘤及T細胞急性淋巴母細胞白血病/淋巴瘤)、胸腺瘤、成熟T及NK細胞瘤(包括周圍T細胞白血病、成人T細胞白血病/T細胞淋巴瘤及大顆粒狀淋巴細胞白血病)、朗格漢斯細胞組織細胞增生症、髓樣腫瘤形成(例如急性髓性白血病,包括成熟性AML、無分化AML、急性前髓細胞性白血病、急性骨髓單核細胞性白血病及急性單核細胞性白血病;脊髓發育不良症候群;及慢性脊髓增生性病變,包括慢性髓性白血病)、中樞神經系統瘤(例如,腦瘤(膠質瘤、神經母細胞瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、室管膜瘤及視網膜母細胞瘤))、實體瘤(鼻咽癌、基底細胞癌、胰腺癌、膽管癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、睪丸癌、子宮、陰道或宮頸癌、卵巢癌、原發性肝癌或子宮內膜癌、血管系統瘤(血管肉瘤及血管外皮細胞瘤))或其他癌症。

本文中之「癌症」係指或描述哺乳動物之通常特徵在於細胞生長失調之生理病況。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤(包括脂肪肉瘤、成骨性肉瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、纖維肉瘤、黏液肉瘤、軟骨肉瘤)、神經內分泌瘤、間皮瘤、脊索瘤、滑膜瘤、許旺細胞瘤(schwannoma)、腦膜瘤、腺癌瘤、黑素瘤及白血病或淋巴樣惡性腫瘤。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌、非小

細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌)、小細胞肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃(gastric或stomach)癌(包括胃腸癌)、胰腺癌、膠質母細胞瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌瘤、唾液腺癌瘤、腎(kidney或renal)癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、肛門癌瘤、陰莖癌瘤、睪丸癌、食道癌、膽道瘤、尤因氏瘤(Ewing's tumor)、基底細胞癌瘤、腺癌瘤、汗腺癌瘤、皮脂腺癌瘤、乳頭狀癌瘤、乳頭狀腺癌瘤、囊腺癌瘤、髓樣癌瘤、枝氣管原癌瘤、腎細胞癌瘤、肝細胞瘤、膽道癌瘤、絨毛膜癌瘤、精原細胞瘤、胚胎性癌瘤、維爾姆氏瘤(Wilms' tumor)、睪丸瘤、肺癌瘤、膀胱癌瘤、上皮癌瘤、膠質瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑素瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、沃爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、骨髓發育不良病、重鏈病、神經內分泌瘤、許旺細胞瘤及其他癌瘤、以及頭頸癌。

本發明斯塔都聚體可用於治療自體免疫性疾病。本文所用術語「自體免疫性疾病」係指80種以上疾病及病況之不同群。在所有該等疾病及病況中，根本問題係機體免疫系統攻擊機體本身。自體免疫性疾病影響所有主要機體系統，包括結締組織、神經、肌肉、內分泌系統、皮膚、血

液及呼吸及胃腸系統。自體免疫性疾病包括(例如)全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、多發性硬化、重症肌無力及1型糖尿病。

可使用本發明之組合物及方法治療之疾病或病況可係血液免疫學過程，包括(但不限於)特發性血小板減少性紫癜、同種免疫性/自體免疫性血小板減少、獲得性免疫性血小板減少、自體免疫性嗜中性白血球減少症、自體免疫性溶血性貧血、细小病毒B19相關性紅血球再生障礙、獲得性抗因子VIII自體免疫、獲得性馮韋爾布蘭德病(acquired von Willebrand disease)、多發性骨髓瘤及未知意義之單株丙種球蛋白病變、敗血症、再生障礙性貧血、純紅血球再生障礙、戴-布氏貧血(Diamond-Blackfan anemia)、新生兒溶血病、免疫介導之嗜中性白血球減少症、血小板輸注無效、新生兒輸血後紫癜、溶血性尿毒癥症候群、全身性血管炎、血栓性血小板減少性紫癜或埃文斯症候群。

該疾病或病況亦可係神經免疫學過程，包括(但不限於)格-巴氏症候群、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經根神經病變、副蛋白血症IgM脫髓鞘多發性神經病變、朗-愛氏肌無力症候群、重症肌無力、多灶性運動神經病變、與抗/GM1相關之下位運動神經元症候群、脫髓鞘、多發性硬化及視神經炎、僵人症候群、具有抗Yo抗體之副腫瘤性小腦變性、副腫瘤性腦脊髓炎、具有抗Hu抗體之感覺神經病變、癲癇、腦炎、脊髓炎、尤其與人類T細胞嗜淋巴細胞病毒1

相關之脊髓病變、自體免疫性糖尿病性神經病變、阿茲海默氏病、帕金森氏病、亨庭頓氏病或急性特發性自主神經機能障礙性神經病變。

該疾病或病況亦可係風濕性疾病過程，包括(但不限於)川崎病疾病、類風濕性關節炎、費爾蒂氏症候群(Felty's syndrome)、ANCA陽極血管炎、自發性多肌炎、皮膚炎、抗磷脂症候群、復發性自然流產、全身性紅斑狼瘡、幼年特發性關節炎、雷諾氏CREST症候群(Raynaud's CREST syndrome)或葡萄膜炎。

該疾病或病況亦可係皮膚免疫學疾病過程，包括(但不限於)中毒性表皮壞死、壞疽、肉芽腫、自體免疫性皮膚發皰性疾病(包括尋常型天皰瘡、大皰性類天皰瘡、落葉型天皰瘡)、白癜風、鏈球菌中毒性休克症候群、硬皮病、全身性硬化(包括彌漫性及局限性皮膚全身性硬化或異位性皮炎(尤其類固醇依賴性))。

該疾病或病況亦可係肌肉骨骼免疫學疾病過程，包括(但不限於)包涵體肌炎、壞死性筋膜炎、發炎性肌病、肌炎、抗核心蛋白多糖(BJ抗原)肌病、副腫瘤性壞死性肌病、X-連鎖具空泡肌病、青黴胺誘導性多肌炎、動脈粥樣硬化、冠狀動脈病或心肌病變。

該疾病或病況亦可係胃腸免疫學疾病過程，包括(但不限於)惡性貧血、自體免疫性慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬變、乳糜瀉、皰疹樣皮炎、隱源性肝硬化、反應性關節炎、克隆氏病、惠伯爾氏病(Whipple's disease)、潰

瘍性結腸炎或硬化性膽管炎。

該疾病或病況亦可係移植物抗宿主疾病、抗體介導之移植物排斥、骨髓移植後排斥、傳染性疾病後發炎、淋巴瘤、白血病、腫瘤形成、哮喘、具有抗 β 細胞抗體之1型糖尿病、薛格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、混合性結締組織病、阿狄森氏病(Addison's disease)、伏格特-小柳-原田氏症候群、膜性增生性腎小球腎炎、古德帕斯徹氏症候群、葛雷夫斯氏病(Graves' disease)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)、微多動脈炎、丘-施氏症候群(Churg-Strauss syndrome)、結節性多動脈炎或多系統器官衰竭。

在另一實施例中，本文所述斯塔都聚體可用於初免系統中，其中自患者抽取血液並使其與斯塔都聚體短暫接觸約半小時至約3小時時間，隨後將其引入回該患者中。在此形式之細胞療法中，使患者之自身效應細胞離體暴露於固定於基質上之斯塔都聚體以經由效應細胞向斯塔都聚體之暴露來調節效應細胞。然後，將包括調節效應細胞之血液輸注回該患者中。此一初免系統可具有眾多臨床及治療應用。

亦可在多種情形下容易地施加本文所揭示斯塔都聚體來更改免疫系統反應以影響免疫反應曲線之特異性變化。更改或調節個體之免疫反應係指增加、減少或改變免疫反應之比率或組份。舉例而言，可視需要藉由用經設計以與FcR相互作用之斯塔都聚體靶定該等受體之合適組合來增

加或減少細胞因子之產生或分泌量。亦可增加或減少抗體產生；可改變兩種或更多種細胞因子或免疫細胞受體之比率；或可使其他類型之細胞因子或抗體產生。免疫反應亦可係表現Fc γ R之免疫細胞之效應功能，包括與不由本文所揭示免疫活性仿生物調節之免疫反應相比，增加或減少之單核細胞巨噬細胞衍生細胞之吞噬潛力、增加或減少之破骨細胞功能、增加或減少之藉由抗原呈遞細胞(例如DC)之抗原呈遞、增加或減少之NK細胞功能、增加或減少之B細胞功能。

在一較佳實施例中，患有癌症或自體免疫性或發炎性疾病之個體之免疫反應已經更改，包含向個體投與治療有效量之本文所述斯塔都聚體之步驟，其中該治療有效量之斯塔都聚體更改該個體之免疫反應。本發明可理想地治療個體之疾病或病況。經更改免疫反應可係增加或減少之反應且可涉及經更改細胞因子含量，包括IL-6、IL-10、IL-8、IL-23、IL-7、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、TNF- α 及IFN- α 中任一者之含量。在一較佳實施例中，IL-6或IL-8對療法之反應有所減少。在一尤佳實施例中，IL-6及IL-8對療法之反應有所減少。然而，本發明並不受限於所述仿生物之任一特定作用機制。經更改免疫反應可係個體之經更改自體抗體層面。更改免疫反應可係個體之經更改自體攻擊性T細胞層面。

舉例而言，減少自體免疫性疾病之TNF- α 產生量可具有治療效應。其實際應用係抗TNF- α 抗體療法(例如

REMICADE®), 已在臨床上證明該療法可治療斑塊狀牛皮癬、類風濕性關節炎、牛皮癬關節炎、克隆氏病、潰瘍性結腸炎及強直性脊柱炎。該等自體免疫性疾病具有獨特病因, 但共有與發炎及免疫細胞活性有關之疾病過程之關鍵免疫學組份。同樣, 經設計以減少TNF- α 產生之斯塔都聚體將在該等及許多其他自體免疫性疾病中有效。經更改免疫反應曲線亦可係直接或間接調節以實現抗體產生之減少, 例如靶向個體自身組織之自體抗體或個體之經更改自體攻擊性T細胞含量。舉例而言, 多發性硬化係涉及自體反應性T細胞之自體免疫性病症, 其可藉由干擾素 β 療法來治療。例如, 參見Zafranskaya M等人, Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis, Immunology 2007 May;121(1):29-39-電子版2006年12月18日。同樣, 經設計以減少自體反應性T細胞含量之斯塔都聚體將在涉及自體反應性T細胞之多發性硬化及許多其他自體免疫性疾病中有效。

本文所述斯塔都聚體可用於調節來自免疫細胞(包括樹突細胞、巨噬細胞、破骨細胞、單核細胞或NK細胞)之共刺激分子之表現或抑制該等相同免疫細胞之分化、成熟或細胞因子(包括白介素-12 (IL-12))之分泌, 或增加細胞因子(包括白介素-10 (IL-10)或白介素-6 (IL-6))之分泌。熟習此項技術者亦可藉由使免疫細胞暴露於免疫活性仿生物並量測免疫細胞功能之調節來驗證免疫活性仿生物之功效, 其中該免疫細胞係樹突細胞、巨噬細胞、破骨細胞或單核

細胞。在一個實施例中，使免疫細胞在活體外暴露於免疫活性仿生物且進一步包含確定細胞表面受體或細胞因子產生之量之步驟，其中該細胞表面受體或細胞因子產生之量之變化指示免疫細胞功能之調節。在另一實施例中，使免疫細胞在用於自體免疫性疾病之模式動物之活體內暴露於免疫活性仿生物，進一步包含評估自體免疫性疾病之改良程度之步驟。

採用固定之Fc之方法

為瞭解Fc: Fc γ 受體(Fc γ R, IgG Fc之Fc受體)相互作用之作用及hIVIG經生物固定之Fc在免疫球蛋白內之hIVIG功能的重要性，比較在自單核細胞至未成熟樹突細胞(iDC)之分化過程期間，具有固定形式之重組IgG1 Fc片段(rFCF)與可溶形式之重組IgG1 Fc片段(sFc)二者之hIVIG(含有鉸鏈-CH2-CH3結構域)對單核細胞之功能之影響。

使在粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)及白介素-4 (IL-4)中培養之單核細胞暴露於經固定rFCF及經固定hIVIG而非低劑量可溶性hIVIG可增強CD86之表現，延遲CD11c之表現，並抑制CD11a在該等細胞上之表現。此外，該等變化可能並不歸因於rFCF在塑膠上之非特異性蛋白質固定，此乃因可溶性熱聚集(sHA) hIVIG、sHA rFCF或高劑量hIVIG)(認為含有多聚體Fes)可誘導與用經固定rFCF所觀察到之變化相似之變化。

數據綜合指示，使iDC暴露於固定於固體、半固體或凝膠狀基質表面上之hIVIG產生能夠協調免疫耐受之獨特DC

群(高CD86，低CD1a)，且包括免疫球蛋白G (IgG) Fc片段之功能性部分之固定分子可用作hIVIG之模擬物用以治療局部及全身性發炎、以及多種由單核細胞衍生細胞(MDC)(例如iDC)直接或間接介導之其他病理病況。此外，將IgG Fc之功能性部分及含有IgG Fc片段之功能性部分之分子固定於植入動物(例如，人類患者)機體內或附接至動物機體之裝置(本文描述為「塗覆裝置」)上可減輕(若非預防)對此等裝置之發炎性反應。

本發明提供抑制單核細胞衍生細胞(MDC)之活性之方法。該方法包括使該細胞與包含結合有Fc試劑之基質之組合物接觸。接觸可在活體外、活體內或離體。或者，該細胞可在動物中。動物可係具有或處於產生單核細胞衍生細胞介導之病況(MDCMC)之風險者。MDC可係(例如)樹突細胞、巨噬細胞、單核細胞或破骨細胞。本發明亦提供治療或預防方法。該方法包括向動物投與含有結合有Fc試劑之基質之組合物，該動物係具有或處於產生MDCMC之風險者。

本發明斯塔都聚體亦可產生活體內固定之Fc試劑。所謂「活體內固定之Fc試劑」意指活體內固定至細胞(即血小板)表面之Fc。已觀察到，表現Fc γ Rs之血小板經本發明斯塔都聚體有效塗覆，且該等經塗覆血小板在生物體中誘導耐受性直至其被清除。已驚奇地觀察到本發明斯塔都聚體有效地結合至該百分比表現Fc γ Rs之血小板。由於卵白蛋白：抗卵白蛋白聚集體複合物及RBC：抗-RBC聚集體複合

物在ITP中誘導耐受性並預防血小板破壞，因此該等經斯塔都聚體塗覆之血小板可在生物體中誘導耐受性。此可為本發明斯塔都聚體發揮其免疫調節功能之另一機制。

基於本發明斯塔都聚體對Fc γ 受體之結合親和力遠高於斯塔都聚體內所含天然免疫球蛋白Fc，本發明斯塔都聚體亦可產生活體內固定之免疫球蛋白Fc對照試劑。所謂「活體內固定之免疫球蛋白Fc對照試劑」意指活體內固定至細胞(即單核細胞、樹突細胞、T細胞、調節性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞及血小板)表面之斯塔都聚體。斯塔都聚體藉由結合至細胞表面受體(包括Fc γ 受體)來封阻其他免疫球蛋白結合至該等受體。單株或多株抗體用於諸如流式細胞測量術等研究分析中及在臨床診斷中。本發明之一重要態樣係防止該等抗體之Fc組份非特異性結合至Fc γ 受體及免疫球蛋白Fc可結合之其他細胞表面受體。

本文所用術語「單核細胞衍生細胞介導之病況(MDCMC)」係指直接或間接地、部分或完全地因單核細胞衍生細胞之活性或產生之因子所致之病理病況。單核細胞衍生細胞包括(但不限於)單核細胞、巨噬細胞、交錯樹突細胞(本文統稱為「樹突細胞」，包含樹突樣細胞及濾泡樹突樣細胞)(成熟及未成熟)、破骨細胞、小膠質樣細胞、單核細胞衍生之產生胰島素之胰島樣細胞、單核細胞衍生之未成熟肥大細胞及單核細胞衍生之微粒子。

就使用經固定之Fc之方法而言，術語「Fc試劑」係指包括免疫球蛋白Ig (IgG) Fc片段之一或多個(例如，2、3、

4、5、6、7、8、9、10、12、15、18、20或更多個)功能性部分的任一分子或分子複合物。IgG之Fc片段由IgG分子之兩條連接在一起之IgG重鏈之C末端部分組成且由兩條連接在一起之重鏈之鉸鏈區、CH2結構域及CH3結構域組成。「IgG Fc片段之功能性部分」由兩條連接在一起之重鏈之鉸鏈區、CH2結構域及視情況CH3結構域之前50個(來自N末端)胺基酸之全部或一些(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48或49個)組成。在人類中，(a) IgG1鉸鏈區含有15個胺基酸，CH2結構域含有110個胺基酸，且CH3結構域含有106個胺基酸；(b) IgG2鉸鏈區含有12個胺基酸，CH2結構域含有109個胺基酸，且CH3結構域含有107個胺基酸；(c) IgG3鉸鏈區含有62個胺基酸，CH2結構域含有104個胺基酸，且CH3結構域含有106個胺基酸；且(d) IgG4鉸鏈區含有12個胺基酸，CH2結構域含有109個胺基酸，且CH3結構域含有107個胺基酸。

就在野生型IgG分子中而言，在上述Fc試劑中，兩條衍生自IgG重鏈之多肽鏈通常(但未必)一致。因此，Fc試劑可係(但不限於)全IgG分子、連接至非免疫球蛋白衍生多肽之全IgG分子、IgG Fc片段、連接至非免疫球蛋白衍生多肽之IgG Fc片段、IgG Fc片段之功能性部分、連接至非免疫球蛋白衍生多肽之IgG Fc片段之功能性部分或該等物

質中任一者之多聚體(例如，二聚體、三聚體、四聚體、五聚體、六聚體、七聚體、八聚體、九聚體或十聚體)。Fc試劑亦可係上述斯塔都聚體及斯特多博(stradobody)，前提為其屬於上述Fc試劑之定義範圍內。

在經固定之Fc中，Fc試劑之免疫球蛋白重鏈組份可具有野生型胺基酸序列，或可為野生型胺基酸序列但具有不超過20個(例如不超過19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個)胺基酸取代。此等取代較佳(但未必)為保守取代。保守變化通常包括在以下群組內之變化：甘胺酸及丙胺酸；纈胺酸、異白胺酸及白胺酸；天冬胺酸及麩胺酸；天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸及蘇胺酸；離胺酸、組胺酸及精胺酸；及苯丙胺酸及酪胺酸。

本發明之「Fc試劑」具有衍生該Fc試劑之IgG重鏈組份之IgG分子(參考IgG分子)與所關注Fc受體結合之能力的至少25%(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或100%或甚至更多)。若「Fc試劑」具有來自一種以上類型之IgG分子之重鏈組份，則參考IgG分子係以最大結合性結合至所關注相關Fc受體者。

本文所用「經固定之Fc」係指結合至如下文所定義「基質」之Fc試劑。術語「經固定之Fc」、「經結合之Fc」及「經穩定之Fc」係同義術語。經固定之Fc係由Fc之功能性部分(包括(但不限於)任何含有Fc之功能性部分之多肽)連

接至基質構成。經固定之Fc包括例如Fc直接結合以及經由聚合物間接結合至基質；納入所分離之全IgG Fc；僅納入IgG Fc之功能性結構域；或納入全IgG Fc或IgG Fc之功能性結構域作為較大多肽(例如抗體、斯塔都聚體或斯特多博)之一部分。用於經固定之Fc時，術語「基質」係指固體、半固體或凝膠狀物體。可將基質植入動物體內或附接(黏附)至其表面上。基質可包括例如液體或氣態組份，但基質之至少一部分係固體、半固體或凝膠狀。因此，基質可為實質上不溶於水性溶劑但溶於非水性溶劑之物質。此等物質包括脂質(例如磷脂)、脂肪酸，及其他脂溶性、水性溶劑不溶之化合物。由此可明瞭，該等基質包括脂質體。基質可為多孔或非多孔。在某些實施例中，基質對所植入、附接或黏附之表面及/或機體為惰性。

基質可含有合成聚合物或由其製成，例如耐綸(nylon)、特氟隆(Teflon)、達克龍(dacron)、聚氯乙炔、PEU(聚(酯胺基甲酸酯))、PTFE(聚四氯乙炔)、PMMA(甲基丙烯酸甲酯)、PEEK、熱塑性彈性體、不透射線之聚合物、聚醚砜、矽、聚碳酸酯、聚氨基甲酸酯、聚異丁烯及其共聚物、聚酯、聚烯烴、聚異丁烯、乙烯- α 烯烴共聚物、丙烯酸系聚合物及共聚物、乙烯基鹵化物聚合物及共聚物(例如聚氯乙炔)、聚乙烯基醚、聚乙烯基甲基醚、聚亞乙烯鹵化物、聚二氯亞乙炔、聚二氯亞乙炔、聚丙烯腈、聚乙烯基醚、聚乙烯基芳香族化合物、聚苯乙烯、聚乙烯基酯、多乙酸乙烯酯、乙烯基單體共聚物、乙基單體與烯烴

之共聚物、乙烯-甲基丙烯酸甲酯共聚物、丙烯腈-苯乙烯共聚物、ABS樹脂、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、聚醯胺、耐綸66、聚己內酯、醇酸樹脂(alkyd resin)、聚氧乙烯、聚醯亞胺、聚醚、環氧樹脂、三乙酸人造絲(rayon-triacetate)、纖維素、乙酸纖維素、丁酸纖維素、乙酸丁酸纖維素、賽璐玢(cellophane)、硝酸纖維素、丙酸纖維素、纖維素醚、羧甲基纖維素、膠原、甲殼質、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸-聚環氧乙烷共聚物、聚矽氧烷、經取代之矽氧烷、乙烯乙酸乙烯酯共聚物、聚烯烴彈性體及EPDM橡膠及其組合。

基質亦可含有金屬或金屬合金或由其製成，例如，不銹鋼、鉑、鈱、鈦、鈹、鎳-鈦合金或鈷-鉻合金。此外，基質可包括或為動物組織或動物組織產物，例如，組織或器官移植物。動物組織可係(例如)骨(例如，成骨性骨)或軟骨。此外，基質可含有蛋白質，例如，膠原或角蛋白。基質亦可為或含有組織基質，例如，非細胞組織基質。微粒及非微粒非細胞基質詳細闡述於(例如)美國專利第5,336,616號及第6,933,326號中，該等案件之揭示內容係全文以引用方式併入本文中。基質亦可為或包括動物細胞(例如，組織修復細胞，例如纖維母細胞；間質幹細胞)且其可為(例如)毛髮移植栓塞。基質可含有或為多糖，例如，瓊脂糖。其亦可含有或係鹽，較佳為相對不溶性鹽，例如，硫酸鈣。基質可係凝膠或乳霜。此外，其可含有矽或矽橡膠(silastic)。基質亦可含有天然纖維，例如，絲、

棉花或羊毛。

另外，基質可為可植入醫學裝置。其可為(例如)支架(例如，血管支架，例如冠狀動脈支架；氣道支架，例如氣管內或鼻支架；胃腸支架，例如膽或胰腺支架；或尿道支架，例如輸尿管支架)或手術縫合線(例如，編織絲、鉻腸線、耐綸、塑膠或金屬縫合線)或手術夾鉗(例如，動脈瘤夾鉗)。基質可為(例如)人造髖部、人造髖關節、人造膝蓋、人造膝關節、人造肩、人造肩關節、人造手指或趾關節、骨板、骨銷、骨不接合植入物、椎間盤植入物、骨水泥或骨水泥隔體。其亦可為動-靜脈分流器、可植入導線、起搏器、人造心臟、心臟輔助裝置、耳蝸植入物、可植入除顫器、脊髓刺激器、中樞神經系統刺激器或周圍神經植入物。其他基質係牙科假體或牙冠。

在其他實施例中，基質可為大容器栓子過濾裝置或籠、經皮裝置、真皮或黏膜下貼片或可植入藥物遞送裝置。基質亦可為大血管移植物，其中該血管係(例如)頸動脈、股動脈或主動脈。此外，基質可為真皮下植入物、角膜植入物、人工晶狀體或接觸鏡。

基質可呈以下形式：薄片、珠粒、網狀物、粉末顆粒、線、珠粒或纖維。其亦可包括或為固體、半固體或凝膠狀物質。

基質亦可為表現FcγR之細胞。較佳地，基質係血小板。

用於本發明中之聚合物較佳為彼等尤其在裝置插入或植入機體中後生物穩定、生物相容且避免刺激機體組織者。

可以多種方式中之任一者將Fc試劑塗覆(即，固定或穩定)至基質上。舉例而言，可將其直接塗覆於基質表面上，其中其藉由(例如)疏水相互作用保持附接。以下闡述幾種涉及使用聚合物之其他方法((a)-(e))：

(a)將Fc試劑與可混溶聚合物摻合物混合，隨後將其分層堆積至可植入合成材料表面上，藉此穩定Fc試劑。業內通常用於製備聚合物摻合物之單體包括PLMA [聚(甲基丙烯酸月桂酯)]；PEG [聚乙二醇]、PEO [聚環氧乙烷]；烷基官能化甲基丙烯酸酯聚合物PMMA、PEMA、PPMA及PBMA；衣康酸酯；富馬酸酯；及苯乙烯。

(b)將聚合物底塗層或奈米尺寸膜黏附至基質表面且隨後將Fc試劑黏附至聚合物底塗層或奈米尺寸膜，藉此穩定Fc試劑。

(c)將聚合物單體薄膜施加至可植入基質表面且隨後使單體聚合。此等單體包括(例如)甲烷、四氟乙烯、苯、甲醇、環氧乙烷、四乙醇二甲醚(Tetraglyme)、丙烯酸、烯丙胺、甲基丙巰基乙醇烯酸羥乙基酯、N-乙基吡咯啉酮及巰基乙醇。然後將Fc試劑附接至所得單體。

(d)用附接至Fc試劑之諸如蛋白A或白蛋白等蛋白塗覆該基質，藉此使Fc穩定至基質表面。

(e)可對Fc試劑加疏水性胺基酸鏈標籤，該等胺基酸結合至可植入合成材料並使經穩定之Fc一致定向。

可將本發明方法施加至任一動物物種且製備Fc試劑之IgG衍生部分之IgG分子可來自任一動物物種。自然地，相

關動物物種係彼等產生IgG或IgG樣分子者。通常，施用該等方法之物種與該等方法中使用Fc試劑之IgG衍生部分之物種係相同的。然而，其未必相同。相關動物物種較佳為哺乳動物且其包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物(例如，猴子、狒狒及黑猩猩)、馬、牛類動物(例如，閹割公牛、母牛或未閹割公牛)、豬、山羊、綿羊、狗、貓、兔、沙鼠、倉鼠、大鼠及小鼠。非哺乳動物物種包括(例如)禽類(例如，雞、火雞及鴨)及魚。

在使用固定之Fc時，術語「治療(treating, treatment)」及「預防」具有與如上文針對斯塔都聚體所述相同之含義。

倘若經固定之Fc係用Fc試劑塗覆之可植入裝置，則可使用業內熟知之方法將其植入相關個體之相關內部器官或組織或機體內，附接至或黏附至該等相關內部器官或組織或機體表面上。倘若將其調配成(例如)懸浮液、粉末，則可將其如上文針對斯塔都聚體所述調配並投與。

本發明之經固定之Fc試劑可用於治療或預防包括(但不限於)以下之病況：癌症、充血性心臟衰竭(CHF)、血管炎、酒渣鼻、痤瘡、濕疹、心肌炎及其他心肌病況、全身性紅斑狼瘡、糖尿病、脊椎病、滑膜纖維母細胞病及骨髓間質病；骨丟失；佩吉特氏病、肥大性骨形成；廢用性骨質減少；營養不良、牙周病、高歌氏病、朗格漢斯細胞組織細胞增生症、脊髓損傷、急性敗血性關節炎、骨軟化症、庫欣氏症候群、單骨纖維發育不良、多骨纖維發育不

良、牙周重建及骨折、骨痛管控及體液惡性高鈣血症、強直性脊柱炎及其他脊椎關節病；移植排斥及病毒感染。

所有自體免疫性疾病皆可部分或完全為MDCMD。本文所用術語「自體免疫性疾病」係指80種以上慢性疾病之不同群。在所有該等疾病中，根本問題係機體免疫系統攻擊機體本身。自體免疫性疾病影響所有主要機體系統，包括結締組織、神經、肌肉、內分泌系統、皮膚、血液及呼吸及胃腸系統。

自體免疫性疾病或病況可係血液免疫學過程，包括(但不限於)特發性血小板減少性紫癜、同種免疫性/自體免疫性血小板減少、獲得性免疫性血小板減少、自體免疫性嗜中性白血球減少症、自體免疫性溶血性貧血、細小病毒B19相關性紅血球再生障礙、獲得性抗因子VIII自體免疫、獲得性馮韋爾布蘭德病、多發性骨髓瘤及未知意義之單株丙種球蛋白病變、敗血症、再生障礙性貧血、純紅血球再生障礙、戴-布氏貧血、新生兒溶血病、免疫介導之嗜中性白血球減少症、血小板輸注無效、新生兒輸血後紫癜、溶血性尿毒癥症候群、全身性血管炎、血栓性血小板減少性紫癜或埃文斯症候群。

自體免疫性疾病或病況可係神經免疫學過程，包括(但不限於)格-巴氏症候群、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經根神經病變、副蛋白血症IgM脫髓鞘多發性神經病變、朗-愛氏肌無力症候群、重症肌無力、多灶性運動神經病變、與抗/GM1相關之下位運動神經元症候群、脫髓鞘、多發性硬

化及視神經炎、僵人症候群、具有抗Yo抗體之副腫瘤性小腦變性、副腫瘤性腦脊髓炎、具有抗Hu抗體之感覺神經病變、癲癇、腦炎、脊髓炎、尤其與人類T細胞嗜淋巴細胞病毒1相關之脊髓病變、自體免疫性糖尿病性神經病變或急性特發性自主神經機能障礙性神經病變。

自體免疫性疾病或病況可係風濕性疾病過程，包括(但不限於)川崎病疾病、類風濕性關節炎、費爾蒂氏症候群、ANCA陽極血管炎、自發性多肌炎、皮肌炎、抗磷脂症候群、復發性自然流產、全身性紅斑狼瘡、幼年特發性關節炎、雷諾氏CREST症候群或葡萄膜炎。

自體免疫性疾病或病況可係皮膚免疫學疾病過程，包括(但不限於)中毒性表皮壞死、壞疽、肉芽腫、自體免疫性皮膚發皰性疾病(包括尋常型天皰瘡、大皰性類天皰瘡及落葉型天皰瘡)、白癜風、鏈球菌中毒性休克症候群、硬皮病、全身性硬化(包括彌漫性及侷限性皮膚全身性硬化或異位性皮炎(尤其類固醇依賴性))。

自體免疫性疾病或病況可係肌肉骨骼免疫學疾病過程，包括(但不限於)包涵體肌炎、壞死性筋膜炎、發炎性肌病、肌炎、抗核心蛋白多糖(BJ抗原)肌病、副腫瘤性壞死性肌病、X-連鎖具空泡肌病、青黴胺誘導性多肌炎、動脈粥樣硬化、冠狀動脈病或心肌病變。

自體免疫性疾病或病況可係胃腸免疫學疾病過程，包括(但不限於)惡性貧血、自體免疫性慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬變、乳糜瀉、皰疹樣皮炎、隱源性肝硬化、

反應性關節炎、克隆氏病、惠伯爾氏病、潰瘍性結腸炎或硬化性膽管炎。

自體免疫性疾病或病況可係移植物抗宿主疾病、抗體介導之移植物排斥、骨髓移植後排斥、傳染性疾病後發炎、淋巴瘤、白血病、腫瘤形成、哮喘、具有抗 β 細胞抗體之1型糖尿病、薛格連氏症候群、混合性結締組織病、阿狄森氏病、伏格特-小柳-原田氏症候群、膜性增生性腎小球腎炎、古德帕斯徹氏症候群、葛雷夫斯氏病、橋本氏甲狀腺炎、韋格納氏肉芽腫、微多動脈炎、丘-施氏症候群、結節性多動脈炎或多系統器官衰竭。

本文中之「癌症」係指或描述哺乳動物之通常特徵在於細胞生長失調之生理病況。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤(包括脂肪肉瘤、成骨性肉瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、纖維肉瘤、黏液肉瘤、軟肌肉瘤)、破骨細胞瘤、神經內分泌瘤、間皮瘤、脊索瘤、滑膜瘤、許旺細胞瘤、腦膜瘤、腺癌瘤、黑素瘤及白血病或淋巴樣惡性腫瘤。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌瘤及肺鱗狀癌瘤)、小細胞肺癌瘤、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌包括胃腸癌、胰腺癌、膠質母細胞瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌瘤、唾液膜癌瘤、腎癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、

肝癌、肛門癌、陰莖癌、睪丸癌、食道癌、膽道癌、尤因氏瘤、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、囊腺癌、髓樣癌、支氣管原癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膽道癌、絨毛膜癌、精原細胞瘤、胚胎性癌、維爾姆氏瘤、睪丸瘤、肺癌、膀胱癌、上皮癌、膠質瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑素瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、沃爾登斯特倫氏巨球蛋白血症、骨髓發育不良病、重鏈病、神經內分泌瘤、許旺細胞瘤及其他癌瘤、頭頸癌、髓樣腫瘤形成(例如急性髓性白血病，包括成熟性AML、無分化AML、急性前髓細胞性白血病、急性骨髓單核細胞性白血病及急性單核細胞性白血病；脊髓發育不良症候群；及慢性骨髓增生性病變，包括慢性髓性白血病)、中樞神經系統瘤(例如，腦瘤(膠質瘤、神經母細胞瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、室管膜瘤及視網膜母細胞瘤)、實體瘤(鼻咽癌、基底細胞癌、胰腺癌、膽管癌、卡波西氏肉瘤、睪丸癌、子宮、陰道或宮頸癌、卵巢癌、原發性肝癌或子宮內膜癌、血管系統瘤(血管肉瘤及血管外皮細胞瘤)、血液腫瘤形成及腫瘤樣病況(例如何傑金氏淋巴瘤)；非何傑金氏淋巴瘤(伯基特氏淋巴瘤、小淋巴細胞淋巴瘤/慢性淋巴細胞白血病、蕁樣肉芽腫病、套細胞淋巴瘤、濾泡淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、邊緣區淋

巴瘤、毛細胞白血病及淋巴質漿細胞白血病)、淋巴細胞前體細胞瘤(包括B細胞急性淋巴母細胞白血病/淋巴瘤及T細胞急性淋巴母細胞白血病/淋巴瘤)、胸腺瘤、成熟T及NK細胞瘤(包括周圍T細胞白血病、成人T細胞白血病/T細胞淋巴瘤及大顆粒狀淋巴細胞白血病)、溶骨性骨癌及骨轉移。

本文所用「處於產生單核細胞衍生細胞介導之疾病(MDCMD)之風險下」之個體係具有產生MDCMD之易感性(即,產生MDCMD之遺傳易感性)或已暴露於可導致MDCMD之條件下之個體。「懷疑患有MDCMD」之個體係患有MDCMD之一或多種症狀者。由上文可明瞭,「處於產生MDCMD之風險下」之個體與「懷疑患有MDCMD」之個體二者皆不全為在所關注物種內之個體。

在上述方法中之任一者中,MDCMC可係由基質所引起者且Fc試劑用於預防或改善MDCMC。

在免疫學分析中之應用

可使用本文所揭示免疫活性仿生物來實施免疫學分析用以測試免疫細胞功能,其中免疫活性仿生物經設計來調節該等免疫細胞功能。

經由低親和力Fc γ 受體途徑之信號傳導需要受體在細胞表面上聚集並交聯。假設該等聚集及交聯參數係經由Fab與抗原特異性靶標之結合及隨後Fc區與反應細胞表面上低親和力Fc γ R之間之相互作用來滿足。在此情形下,抗體具有經由以下兩種獨特途徑激發細胞反應之潛力:1. Fab與

表位特異性靶標之相互作用/對其實施封阻及2. Fc與FcR之相互作用。儘管有此認識，但大多數使用活體內所用單株抗體之治療研究中的現行對照不能充分確定Fc: Fc γ 受體相互作用作為所觀察到功能性效應之促成因素的可能性。當前採用多個策略來消除作為混淆變量之Fc:FcR相互作用。舉例而言，一些研究採用保持表位特異性但缺乏Fc區之Scv(單鏈可變區)或Fab片段。該等方法受限於該等試劑之短半衰期及其誘導信號傳導之有限潛力。其他研究採用由融合至Fc片段之受體或配體構成的融合蛋白。儘管該等類型之方法有助於區別Fab特異性效應與彼等用受體配體相互作用所觀察到者，但其不能有效地控制Fc介導之效應。在動物模型中評價基於抗體之治療劑亦可採用具有無關Fab結合位點之同種型對照抗體。此選擇之原理基於對相同同種型抗體間之功能相似性之假定，而不論其Fab結合特異性或親和力。然而，此對無關同種型對照之使用具有若干基本缺陷：

- 1.若該等抗體之Fab片段不能結合配體或抗原表位，則Fc片段可能會因不存在Fc γ 受體交聯而不刺激經由低親和力FcR相互作用之信號傳導。因此，利用缺乏一種手段來交聯Fc γ R之表位特異性靶標不能將所觀察到實驗抗體與對照抗體間之功能性差異正確地歸因於Fab相互作用。

- 2.若在產生不同於母體抗體之糖形或相對百分比之個別糖形的細胞中產生該等同種型，則即使Fab親和力相同，亦將更改與低親和力FcR及高親和力FcR二者之結合。

儘管尚無完美對照來克服此問題，但一種選擇係使用在與母體抗體相同之細胞中產生且以與實驗抗體所靶定表位之表現程度成比例之劑量給出的同種型特異性斯塔都聚體。舉例而言，用於大鼠中產生之表位特異性抗體之合適對照可為能夠使Fc γ 受體聚集於效應細胞表面上之大鼠同種型特異性斯塔都聚體。

通常，使免疫細胞暴露於有效量之免疫活性仿生物以便以已知方式調節免疫細胞之活性並比較此免疫調節與測試化合物或分子以確定該測試化合物是否具有相似的免疫調節活性。

在另一實施例中，經熱聚集斯塔都聚體及經聚集免疫球蛋白可在本文所述及彼等熟習此項技術者已知之各種免疫學分析中用作實驗室對照之試劑。

免疫學分析可係活體外分析或活體內分析且可涉及使用物種匹配或物種不匹配斯塔都聚體之人類或非人類免疫細胞。在一個實施例中，免疫學分析係藉由以下步驟來實施：使用有效量之免疫活性仿生來調節免疫細胞之活性並比較該調節與測試化合物對免疫細胞之調節。斯塔都聚體可在涉及測試其他化合物之免疫學效應之分析中起到陽極對照試劑之功能。該分析可藉由(例如)使用混合淋巴細胞反應來比較個體單株抗體相對於斯塔都聚體在效應細胞Fc γ 受體結合及功能性反應上之效應，如藉由受體表現程度、細胞因子釋放及功能之變化所量測。以此方式，若斯塔都聚體(其缺乏Fab)產生與單株抗體部分相似之反應，則

單株抗體之效應在一定程度上並不歸因於其Fab之特異性，而是歸因於效應細胞上一個以上Fc γ 受體之結合及交聯的一般效應。

若物種特異性及同種型特異性斯塔都聚體可部分或完全複製物種特異性及同種型特異性抗體之生物活性，則所觀察到可歸屬於物種特異性及同種型特異性斯塔都聚體之生物活性之一部分顯然係Fc-Fc γ 受體活性。因此，物種特異性及同種型特異性斯塔都聚體可用於評估潛在治療抗體，以確定觀察到之生物活性可歸屬於測試抗體之Fab部分抑或可歸屬於該分子中結合並交聯一個以上Fc γ 受體之Fc部分的非特異性效應，以及該生物活性在何種程度上可歸屬於其。

本發明斯塔都聚體亦可用於在基於抗體之免疫分析(例如流式細胞測量術、西方墨點、免疫組織化學及免疫螢光分析)期間封阻Fc受體之非特異性結合。傳統上，在諸如該等分析中，使用與測試抗體相同之物種之非特異性抗體封阻與Fc受體之非特異性結合。本發明斯塔都聚體提供優於傳統Fc封阻手段之益處，此乃因每一斯塔都聚體具有多個FcR結合位點，且因此可使用少得多之斯塔都聚體。另外，由於本發明斯塔都聚體缺乏抗體之Fab抗原-結合部分，因此舉例而言，將觀察不到與死細胞之非特異性結合，如通常用物種匹配IgG對照所觀察到的情形一樣。

已令人驚奇地發現，本發明斯塔都聚體以極高親和力結合內毒素。標準內毒素去除套組及管柱不能自斯塔都聚體

去除顯著百分比之緊密結合之內毒素。因此，所主張組合物可用於用作內毒素之結合庫，此係用於在醫藥與實驗室二者之製劑中去除內毒素的有用工具。此係有益的原因於在於，在內毒素與斯塔都聚體之間形成之複合物具有足夠高之親和力從而可自醫藥製劑或組合物有效地去除內毒素。在一個實施例中，藉由過濾自組合物去除內毒素-斯塔都聚體複合物。

本文所引用之全部參考資料皆全文以引用方式併入本文中。

實例

實例1斯塔都聚體之產生及純化

使用HEK293F細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)或中國倉鼠卵巢細胞(CHO)來穩定表現G045/M045及G051。懸浮生長HEK293F或CHO細胞以供按比例放大蛋白質表現。

將編碼G045c (SEQ ID NO: 4)/M045c (SEQ ID NO: 11)、G045old (SEQ ID NO: 7)/M045old (SEQ ID NO: 12)或G051 (SEQ ID NO: 18)之基因選殖至含有新黴素抗性基因且在CMV啟動子之轉錄控制下之載體(例如pcDNA3.3，來自Invitrogen (Carlsbad, CA))中以促進G045/M045或G051之高程度表現。使用無內毒素質粒DNA分離套組(Nucleobond, Macherey-Nagel)自細菌培養物分離用於轉染之質粒DNA。用限制酵素將G045c/M045c、G045old/M045old及G051編碼質粒DNA線性化並轉染至293-F細胞或CHO細胞中。轉染後，利用遺傳黴素/G418選擇表現

G045c/M045c、G045old/M045old或G051之陽極細胞以獲得轉染細胞庫。為獲得純系細胞系，將穩定轉染細胞庫以1個2個細胞/孔稀釋至獲得穩定細胞系之單一細胞純系之96孔板中。藉由ELISA篩選單細胞純系之蛋白質表現。生長單細胞純系並自培養基收穫G045c、M045c、G045old、M045old或G051蛋白作為分泌蛋白質。

為藉由瞬時轉染產生G045c/M045c、G045old/M045old或G051蛋白，用在CMV啟動子之控制下編碼G045c/M045c、G045old/M045old或G051蛋白之DNA轉染HEK293細胞或CHO細胞以確保蛋白質之高程度表現。用若干市售轉染試劑中之一者進行轉染。在轉染後4至5天自細胞培養基收穫G045c/M045c、G045old/M045old或G051分泌蛋白。

為藉由瞬時轉染產生G045c/M045c、G045old/M045old及G051蛋白，用在CMV啟動子之控制下編碼G045c、M045c、G045old、M045old或G051蛋白之DNA轉染HEK293細胞或CHO細胞以確保蛋白質之高程度表現。用若干市售轉染試劑中之一者進行轉染。在轉染後4至5天自細胞培養基收穫G045c、M045c、G045old、M045old或G051分泌蛋白。

使用0.22 μm 過濾器過濾來自瞬時轉染細胞或穩定細胞系之細胞培養基且用1體積結合緩衝液(20 mM磷酸鈉pH7.2+150 mM NaCl)將其調節至pH 7.2並藉由使用AKTAXpress純化系統(GE life sciences)在HiTrap Mabselect蛋白A親和管柱上實施親和層析來純化。在0.1 M檸檬酸鈉(pH 3.3)中

溶析後，在用於緩衝液交換之HiPrep 26/20脫鹽管柱上純化蛋白質。

為進一步純化，藉由在HiLoad Superdex 200凝膠過濾管柱(GE Lifesciences)上於50 mM Tris-HCL pH7.5 + 150 mM NaCl中凝膠過濾、隨後在Mono S離子交換管柱(GE Lifesciences)上純化來純化G045c/M045c、G045old/M045old或G051蛋白。在20 mM MES緩衝液(pH 6)中以0-1 M NaCl梯度進行離子交換純化。層析後，藉由透析將蛋白質調節至PBS。所得G045c斯塔都聚體之示意圖繪示於圖1中。

為測試所得G045c蛋白之多聚體化能力，運行10%聚丙烯醯胺凝膠，其含有等濃度之G045c(藉由上述方法產生)與G045old(藉由先前闡述於WO 2008/151088中之方法產生)且含有外來選殖序列。令人驚奇地，去除外來片段使G045c之多聚體化與G045old相比顯著增加，其中G045c與G045old相比顯示高得多濃度之更高次多聚體。(參見圖2)。

實例2：M045c與M045old相比在關節炎之小鼠模型中之增強功效

評估M045c與M045old相比在膠原誘導之關節炎中之功效。簡言之，在第0天及第21天，用具有4 mg/ml經不完全弗氏佐劑(Incomplete Freund's Adjuvant)(Sigma，目錄編號5506)乳化之溶液的II型牛膠原(Chondrex公司，目錄編號20021)對DBA1/J小鼠實施免疫。每週稱重小鼠且每天對關

節炎體徵進行評分。對每只爪子進行評分且將所有4次評分之總和記錄為關節炎指數(AI)。最大可能AI係如下16：
0=關節炎無可見效應；1=一個腳趾水腫及/或紅斑；2=2個關節水腫及/或紅斑；3=2個以上關節水腫及/或紅斑；4=整個爪子及腳趾皆患有嚴重關節炎，包括肢體變形及關節之關節強直。在第22天(治療0天)開始，基於平均AI (3.3)將10只膠原免疫小鼠分選為治療組且將10只非患病小鼠命名為非患病組。量測14個治療天之關節炎指數，然後將小鼠無痛致死。對於陽性對照組而言，基於平均AI (3.3)將10只小鼠分選為治療且每天經口給予10 ml/kg潑尼松龍。對於用M045c或M045old治療之組而言，基於平均AI (3.3)將20只小鼠分選為治療且每隔4天(第0天、第4天、第8天及第12天)給予400 µg M045c或M045old (17.4 mg/kg)。

在幾乎所有測試時間點下，用M045c治療之小鼠患有與M045old治療小鼠相比嚴重度在統計學上更低之疾病。(參見圖3)。因此，去除前導序列與IgG1 Fc間之16個胺基酸之選殖片段不僅使更多多聚體形成，且亦提高抗發炎性疾病之功效。

以相似方式評估M045c、M019、M028、M046及M051在膠原誘導之關節炎中之功效且將其與潑尼松龍之功效進行比較。在如上文所述小鼠中誘導CIA且在CIA誘導後22天開始，每週兩次經靜脈內用400 µg M045、M019、M028、M046或M051或每天用10 ml/kg潑尼松龍治療小鼠且經兩週對AI進行評分，如上文所述。接收測試斯塔都聚體中每

一者之小鼠患有嚴重度在統計學上低於疾病PBS治療對照之疾病(圖9)。

實例3：M045與潑尼松龍在關節炎之小鼠模型中之協同效應

評估M045c與低劑量潑尼松龍之組合在膠原誘導之關節炎模型中之功效。簡言之，在第0天及第21天，用具有4 mg/ml經不完全弗氏佐劑(Sigma，目錄編號5506)乳化之溶液的II型牛膠原(Chondrex公司，目錄編號20021)對DBA1/J小鼠實施免疫。每週稱重小鼠且每天對關節炎體徵進行評分。對每只爪子進行評分且將所有4次評分之總和記錄為關節炎指數(AI)。最大可能AI係如下16：0=關節炎無可見效應；1=一個腳趾水腫及/或紅斑；2=2個關節水腫及/或紅斑；3=2個以上關節水腫及/或紅斑；4=整個爪子及腳趾皆患有嚴重關節炎，包括肢體變形及關節之關節強直。在第22天(治療0天)開始，基於平均AI (3.3)將10只膠原免疫小鼠分選為治療組且將10只非患病小鼠命名為非患病組。量測14個治療天之關節炎指數，然後將小鼠無痛致死。對於陽性對照組而言，基於平均AI (3.3)將10只小鼠分選為治療且每天經口給予10 ml/kg潑尼松龍。對於用M045c治療之組而言，基於平均AI (3.3)將20只小鼠分選為治療且每隔4天(第0天、第4天、第8天及第12天)給予400 μ g M045c (17.4 mg/kg)。為量測潑尼松龍與M045c間之協同效應，每天用2 mg/kg低劑量潑尼松龍對一組進行治療，用每隔4天給予之低劑量M045c 200 μ g/劑量對一組進行治療且向一

組給予每隔4天給予之2 mg/kg低劑量潑尼松龍與200 µg/劑量低劑量M045c。

高劑量潑尼松龍(10 mg/kg)可有效作為改善膠原誘導之關節炎之單一藥劑，而低劑量潑尼松龍(2 mg/kg)僅勉強有效。另外，低劑量M045c(200 µg/劑量或9.1 mg/kg)與未經治療對照相比在降低疾病嚴重度上亦無效。然而，令人驚奇地，用低劑量潑尼松龍與低劑量M045c之組合治療之小鼠與潑尼松龍及M045c單一治療組合相比展示疾病嚴重度之協同(大於加性)降低。(參見圖4)。

實例4：對IgG2A、M045、M046、M028、M019及G051與小鼠受體結合之分析

使用胺固定分別以560、500及1000 RU將FcγRIIIA、FcγRIIB及SIGN-R1受體固定至CM4晶片以補償蛋白質大小。

在HBSS-EP運行緩衝液中自500 nM至1.9 nM連續稀釋M045c (SEQ ID NO: 11)、M046 (SEQ ID NO: 15)、M019 (SEQ ID NO: 13)及M028 (SEQ ID NO: 14)並以20 µl/min注射180 sec。藉由以100 µl/min經10 sec注射1 M MgCl₂、隨後用運行緩衝液進行短暫洗滌來達成再生。使用T100評價軟體計算KD。

與每一測試斯塔都聚體相比，小鼠IgG2a Fc同源二聚體以更低親和力且更快解離速率結合小鼠FcγR3A及FcγR2b。小鼠IgG2a Fc同源二聚體不顯著結合小鼠SIGN-R1，而選擇性斯塔都聚體以不同程度締合併緩慢解離。

(參見圖5)。

在此模型中評估M045c部分。首先使用AktaXpress蛋白質純化系統及GE HiLoad 16/60 Superdex 200製備級管柱對M045F實施凝膠分級分離。在根據大小分離多聚體後，部分1 (M045F1)含有M045多聚體之最高分子量組份。M045F2係具有較低分子量之多聚體組份且M045F3係同源二聚體單體部分。與其他部分或IgG2a Fc對照相比，M045F1與小鼠FcγRIIIa、FcγRIIb(參見圖6a)及SIGN-R1(參見圖6b)之結合親和力最高且解離速率緩慢。

根據製造商說明書(數據獲取使用者指南6.4 ForteBio)在Octet 96 Red Instrument (ForteBio, Menlo Park CA)上實施生物層干涉量測法分析以評估G051之結合。對於小鼠蛋白質之結合分析而言，在1X動力學分析緩衝液(ForteBio目錄編號18-5032)中以10 µg/ml將加His標籤小鼠FcγRII(R&D系統目錄編號1460-CD)及FcγRIII(R&D系統目錄編號1960)單獨地加載於抗-五-His生物感測器(ForteBio目錄編號18-5077)上。對於人類蛋白質之結合分析而言，在1X動力學分析緩衝液(ForteBio目錄編號18-5032)中以10 µg/ml將加His標籤人類FcγRIIb(R&D系統目錄編號1875-CD)及FcγRIIIa(R&D系統目錄編號4325-Fc)單獨地加載於抗-五-His生物感測器(ForteBio目錄編號18-5077)上。在感測器尖端加載後，藉由將尖端轉移至單體部分(在多個濃度內)或多聚體部分(在多個濃度內)存於1X動力學分析緩衝液中之製劑中來量測蛋白質締合且藉由將感測器尖端轉移至1X動

力學緩衝液中來量測解離。如所述(分析使用者指南 6.4ForteBio)進行分析。如上文所述將分析標準化，指定同源二聚體之MW為 50 kD且所有其他蛋白質製劑為 150 kD。

表 1 顯示，M051之較大斯塔都聚體多聚體部分與較小多聚體部分相比以較大親和力及結合性結合且解離較慢，M051之較大斯塔都聚體多聚體部分與同源二聚體部分相比進而以較大親和力及結合性結合且解離較慢。

表 1

試樣	KD	K締合	K解離	R最大	R2	部分
M051	6.55E-9	8.53E+5	5.59E-3	0.394	0.987	
M051單體	9.59E-7	7.24E+5	6.94E-1	0.373	0.985	2A11
M051二聚體	1.25E-8	1.45E+6	1.81E-2	0.4129	0.987	2H10
M051三聚體	3.36E-9	1.28E+6	4.28E-3	0.5093	0.996	3E12
M051四聚體	1.39E-9	1.56E+6	2.04E-3	0.567	0.996	3H4
M051多聚體	1.77E-9	4.19E+6	1.15E-4	0.6237	0.998	4F4

在 Octet 96 Red Instrument上實施生物層干涉量測法分析以評估 G045或 G051相對於 G001(天然 IgG1 Fc)之結合動力學，如上文所述。量測 G045及 G001與人類 FcγRIIb、FcγRIIIa(與 F 變體與 V 變體二者)、獼猴 FcγRIIIa、獼猴 FcγRIIIb及獼猴 FcγRIII之結合。G045與 G001相比對每一測試受體具有顯著較高之結合親和力(解離較慢)及結合性證據。(參見表 2及表 3)。

表 2

受體	蛋白質	KD	K締合	K解離	R最大	R2
人類FcγRIIb	G045	1.42E-9	7.99E+5	1.14E-3	0.7166	0.999
人類FcγRIIIa (F)	G045	1.22E-9	6.20E+5	7.567E-4	0.7507	0.999
人類FcγRIIIa (V)	G045	2.95E-10	6.07E+5	1.79E-4	0.9182	0.999
獼猴FcγRIIb	G045	1.19E-9	7.56E+5	8.81E-4	0.7125	0.999
獼猴FcγRIIIa	G045	2.58E-10	6.17E+5	1.59E-4	1.0356	0.999
小鼠FcγRIIb	G045	5.42E-10	1.21E+6	6.56E-4	0.4555	0.998
小鼠FcγRIII	G045	8.00E-10	1.03E+6	8.23E-4	0.519	0.998

表 3

受體	蛋白質	KD	K締合	K解離	R最大	R2
人類FcγRIIb	G001	1.31E-6	6.86E+5	8.99E-1	0.19	0.986
人類FcγRIIIa (F)	G001	2.43E-6	1.11E+5	2.69E-1	0.383	0.990
人類FcγRIIIa (V)	G001	1.14E-6	1.18E+5	1.35E-1	0.7265	0.995
獼猴FcγRIIb	G001	2.04E-6	3.94E+5	8.06E-1	0.3456	0.988
獼猴FcγRIIIa	G001	9.15E-7	1.24E-5	1.14E-1	0.837	0.995
小鼠FcγRII *	G001	1.51E-6	2.56E+5	3.87E-1	0.1173	0.963 *
小鼠FcγRIII *	G001	4.18E-6	1.18E+5	4.91E-1	0.1026	0.904 *

同樣，量測 G051 及 G001 與人類 FcγRIIb 及 FcγRIIIa 之結合。G051 與 G001 相比對每一測試受體具有顯著較高之結合親和力(解離較慢)及結合性證據。(參見表 4)。

表 4

蛋白質	受體	KD	K締合	K解離	R最大	R2
G001	FcγRIIb	2.99E-06	3.72E+05	1.11E+00	0.3152	0.986
G001	FcγRIIIa	6.77E-07	1.64E+05	1.11E-01	0.6535	0.991
G051	FcγRIIb	4.39E-08	7.10E+05	3.12E-02	0.2868	0.991
G051	FcγRIIIa	2.30E-08	2.83E+05	6.50E-03	0.886	0.996

實例5：天然連接之斯塔都聚體化合物可有效治療/預防ITP

為闡明斯塔都聚體在特發性血小板減少性紫癜(ITP)中之效應，在ITP之預防性小鼠模型中斯塔都聚體測試。在暴露於小鼠融合素抗IIb抗體後誘導低血小板計數，該小鼠融合素抗IIb抗體將融合素受體塗覆於血小板上。簡言之，在血液抽取及血小板計數後第1天經尾靜脈向8週齡C57BL/6小鼠(Charles River)注射斯塔都聚體或對照。在血液抽取及血小板計數後第2天，用藉由腹膜內注射投與且以2 μ g抗體存於200 μ l磷酸鹽緩衝鹽水中之濃度給出的MWReg30(BD Pharmingen目錄編號553847)處理小鼠以誘導血小板損失。用於血小板計數之血液抽取及MWReg30注射持續第3天、第4天及第5天。在第2天至第5天每天給予IVIG陽性對照。用Drew Scientific Hemavet 950血球計數器進行血小板計數。藉由尾靜脈切口採集血液並將其與檸檬酸鹽緩衝液混合以防止凝固。

M045c相對於無藥物治療ITP對照與IgG2a Fc對照二者在此模型中具有顯著保護性且與IVIG預防性療法及不接受MWReg30刺激之小鼠二者相當(參見圖7)。如實例4中所述製備M045c部分。M045部分1相對於無藥物治療ITP對照在此模型中具有顯著保護性，而M045部分3則無顯著保護性。

實例6：具有天然連接之斯塔都聚體複合物之內毒素複合物之去除

可在將內毒素結合斯塔都聚體混合至含有所關注蛋白質之含有內毒素之蛋白質溶液後，用1體積結合緩衝液(20 mM磷酸鈉 pH7.2 +150 mM NaCl)將該溶液調節至pH 7.2以去除內毒素。可將含有該蛋白質之溶液施加至親和層析管柱(HiTrap Mabselect蛋白A親和管柱，GE Life Sciences)以去除內毒素。結合斯塔都聚體之內毒素將結合至親和管柱且經純化無內毒素之蛋白質將溶析於流穿部分中。

在使用斯塔都聚體來捕獲內毒素之替代方法中，可將蛋白A塗覆之磁性珠粒(New England BioLabs, MA)與結合內毒素之斯塔都聚體一起混合至含有內毒素之蛋白質溶液中且可藉由磁性分離去除結合斯塔都聚體之內毒素。

實例7：天然連接之斯塔都聚體複合物在免疫學分析中用於Fc封阻之用途

改良基於抗體之研究工具及臨床診斷之靈敏度及特異性。抗體之研究效用及臨床診斷效用受限於非特異性結合。此限制可因(例如)以下情形而發生：單株或多株純系抗體之Fc部分與包括免疫細胞及腫瘤之細胞上高親和力Fc γ 受體及其他Fc結合受體之結合或抗體聚集體或用抗體塗覆之細胞聚集體與低親和力Fc γ 受體之結合。

為證明斯塔都聚體封阻Fc γ 受體與特異性抗Fc γ 受體抗體之相互作用的能力，實施流式細胞測量術並比較增加劑量之人類斯塔都聚體G045c與G001(IgG1 Fc之同源二聚體單體)在封阻抗Fc γ R抗體與已知存在於特定細胞上之Fc γ R結合方面之能力。發現相對於IgG1 Fc對照，斯塔都聚體

可有效封阻抗Fc γ R抗體與Fc γ Rs結合且以濃度依賴性方式達成(參見圖8)。

由於斯塔都聚體對結合免疫球蛋白Fc區之Fc γ 受體及其他受體之極高結合親和力，因此其可令人驚奇地有效封阻特異性抗Fc γ 受體單株抗體之結合及甚至相互作用。因此斯塔都聚體可用作對照試劑來減少所投與抗體在研究工具環境與臨床診斷環境二者中之非特異性抗體結合。

實例8：天然連接之斯塔都聚體化合物可有效治療實驗自體免疫性神經炎

在實驗自體免疫性神經炎(EAN)大鼠模型中評估M045c及M051與IVIG及白蛋白相比在每一情形下之功效。鼠類EAN模型係人類急性發炎性脫髓鞘多發性神經根神經病變之廣泛使用之動物模型。簡言之，用全牛周圍神經髓磷脂對45只Lewis大鼠實施免疫並將其隨機化成3組。在臨床虧損(通常在第9天或第10天開始之重量損失)開始時，用IVIg(1 gm/1 Kg體重)、M045 (20 mg/Kg)或M051 (17.5 mg/Kg)或用白蛋白治療15只大鼠/治療組，該等藥劑皆係連續兩天以兩次IV劑量給予。藉由尾靜脈注射經靜脈內投與所有藥物。

在臨床、電生理學及組織學上評估EAN大鼠。藉由每天臨床分級並藉由重量變化來評價臨床疾病嚴重度。電生理學研究包括檢查複合肌肉動作電位(CMAP)之幅值及運動傳導速度(MCV)。在第15天，在疾病之峰值下，將來自每組之5只大鼠處死，採集坐骨神經並分析組織病理學變

化。比較IVIg組與白蛋白組之間、及重組M045c或M051組與白蛋白組之間之治療功效。

接受測試斯塔都聚體M045c之大鼠患有嚴重度在統計學上低於白蛋白治療對照之疾病(參見12)。用白蛋白治療之EAN大鼠與IVIg治療(15只中有1)大鼠及M045c治療大鼠(15中有0只)相比呈現更高死亡率(15只中有4只)。接受M045c及IVIg治療之動物展現顯著更小的明顯重量損失。IVIg及M045c治療大鼠與彼等用白蛋白治療者相比在運動傳導速度(MCV)與遠端及鄰近CMAP之幅值二者上皆有統計學顯著改良。白蛋白治療大鼠與用IVIg或M045c治療之大鼠相比顯示更嚴重的坐骨神經軸突喪失及活動性軸突變性。因此，斯塔都聚體M045c與白蛋白相比顯示死亡率、重量、臨床、電生理學及組織病理學功效，且與藉由臨床金標準IVIg以約2% IVIg劑量所顯示之功效相當。

在利用11只大鼠/測試組進行的單獨實驗中，接受測試斯塔都聚體M051之大鼠患有嚴重度在統計學上低於白蛋白治療對照之疾病(參見圖11)。在此研究中，對照(白蛋白)組中11只動物中有7只死亡，相比之下，在M051組中有4只死亡。接受IVIg或M051之大鼠與接受白蛋白對照之大鼠相比顯示顯著更小之重量損失。接受IVIg或M051之大鼠與接受白蛋白對照之大鼠相比顯示臨床評分之顯著改良。在用IVIg或M051治療後，MCV與CMAP之幅值二者皆有統計學顯著改良。因此，斯塔都聚體M051與白蛋白相比顯示顯著死亡率、重量、臨床及電生理學功效，且與藉由臨

床金標準IVIg以約2%IVIg劑量所證明之功效相當。

實例9：含有Fc突變之天然連接之斯塔都聚體化合物展示與FcγR之增強結合且可有效用於治療關節炎之小鼠模型

藉由如上文實例4中所述Biacore結合分析實施含有Fc突變體之斯塔都聚體G075 (SEQ ID NO: 20)及G076 (SEQ ID NO: 21)與FcγRIIIa、FcγRIIb及FcγRIIa之結合。G075顯示與FcγRIIIa之結合增加且與FcγRIIa及FcγRIIb之結合減少，而G076顯示與FcγRIIIa之結合減少且與FcγRIIa及FcγRIIb之結合增加。(參見圖10A及B)。

接下來，如上文實例3中一樣測定含有Fc突變體之斯塔都聚體M075 (SEQ ID NO: 22)、M076 (SEQ ID NO: 23)及M098 (SEQ ID NO: 25)對關節炎之小鼠模型之功效之評估。比較含有Fc突變體之斯塔都聚體與媒劑及M045c。M098與M075二者皆可顯著更有效地抑制CIA進展，而M076斯塔都聚體則並非如此。(參見圖13 A及B)。

【圖式簡單說明】

圖1係本發明較佳斯塔都聚體之示意圖。圖1a係G045c斯塔都聚體之示意圖；圖1b係G045old斯塔都聚體之示意圖；圖1c係G046斯塔都聚體之示意圖；圖1d係G019斯塔都聚體之示意圖；圖1e係G028斯塔都聚體之示意圖；且圖1f係G051斯塔都聚體之示意圖；

圖2係顯示第一代斯塔都聚體化合物與本發明直接天然連接之斯塔都聚體化合物之間之多聚體化能力差異之蛋白凝膠；

圖3顯示本發明直接天然連接之斯塔都聚體(M045c)與含有外來序列之先前斯塔都聚體化合物(M045old)相比對膠原誘導關節炎之嚴重度具有更大效應；

圖4顯示本發明直接天然連接之斯塔都聚體化合物在與潑尼松龍一起投與時在膠原誘導之關節炎中之協同效應；

圖5顯示本發明之M046、M045、M019及M028化合物與IgG2a對照相比與FcγRIIIa、FcγRIIb及SIGN-R1之增強的結合親和力；

圖6顯示本發明化合物與(a) FcγRIIb及FcγRIIIa及(b) SIGN-R1之增強的結合親和力；

圖7顯示本發明直接天然連接之斯塔都聚體化合物在投與ITP小鼠時之效應；

圖8顯示，斯塔都聚體相對於IgG1 Fc對照更有效地封阻抗FcγR抗體與FcγR之結合；

圖9顯示天然連接之斯塔都聚體M045c、M019、M028、M046及M051對膠原誘導之關節炎之嚴重度的效應；

圖10A顯示G075斯塔都聚體與FcγRIIIa之結合增強且G075斯塔都聚體與FcγRIIa及FcγRIIb之結合減弱。B顯示G076斯塔都聚體與FcγRIIa及FcγRIIb之結合親和力提高且G076斯塔都聚體與FcγRIIIa之結合減弱；

圖11顯示M051與IVIg及白蛋白對照相比對以下之效應：
(A) 大鼠與實驗自體免疫性神經炎(EAN)相關之重量損失；(B) EAN大鼠之臨床評分；(C) EAN大鼠之髖部幅值；(D) EAN大鼠之踝部幅值；及(E) EAN大鼠之運動神經傳導

速度；

圖 12 顯示 M045c 與 IVIg 及 白 蛋 白 對 照 相 比 對 以 下 之 效 應：(A) 大 鼠 與 實 驗 自 體 免 疫 性 神 經 炎 (EAN) 相 關 之 重 量 損 失；(B) EAN 大 鼠 之 臨 床 評 分；(C) EAN 大 鼠 之 髌 部 幅 值；(D) EAN 大 鼠 之 踝 部 幅 值；及 (E) EAN 大 鼠 之 運 動 神 經 傳 導 速 度；及

圖 13 顯示 本 發 明 之 M075 (A)、M096 (B) 及 M098 (C) 而 非 M076 (A) 斯 塔 都 聚 體 與 媒 劑 對 照 及 M045C 相 比，對 膠 原 誘 導 關 節 炎 之 嚴 重 度 之 效 應 更 大。

七、申請專利範圍：

1. 一種成簇斯特多姆(cluster stradomer)單元，其包含IgG1 Fc結構域，該IgG1 Fc結構域以其羧基末端直接連接多聚化結構域，其中該多聚化結構域為IgG2鉸鏈結構域。
2. 如請求項1之成簇斯特多姆單元，其中該Fc結構域包含Fc結構域單體之同源二聚體，其各包含IgG1之鉸鏈以及CH2及CH3結構域；且其中該IgG2鉸鏈結構域包含IgG2鉸鏈單體之同源二聚體。
3. 如請求項2之成簇斯特多姆單元，其中各該IgG1 Fc結構域單體包含SEQ ID NO: 2之第一多肽序列；且其中各該IgG2鉸鏈結構域單體包含SEQ ID NO: 3之第二多肽序列，其中該第二多肽序列直接連接該第一多肽序列的羧基末端。
4. 如請求項3之成簇斯特多姆單元，其中該化合物係糖基化。
5. 如請求項3之成簇斯特多姆單元，進一步包含SEQ ID NO: 1之前導序列，其直接連接至少一個該等第一多肽的胺基末端。
6. 如請求項3之成簇斯特多姆單元，其中SEQ ID NO: 3中4個半胱胺酸殘基中無一為突變。
7. 一種如請求項3之成簇斯特多姆單元的高次(high order)多聚體，其中該二聚體或高次多聚體能夠結合至少二個Fc γ 受體(Fc γ R)。

8. 如請求項7之高次多聚體，其中該高次多聚體包含至少3、至少4、至少5、至少6或至少7個成簇斯特多姆單元。
9. 如請求項7之高次多聚體，其中第一成簇斯特多姆單元藉由其多聚化結構域連接至少第二成簇斯特多姆單元。
10. 如請求項9之高次多聚體，其中第二成簇斯特多姆單元藉由其多聚化結構域連接該第一成簇斯特多姆單元。
11. 如請求項9之高次多聚體，其中該第一及至少第二成簇斯特多姆單元藉由存在於各多聚化結構域半胱胺酸殘基間的二硫鍵共價連接。
12. 一種單離之核酸，其包含編碼請求項3中該等直接連接之第一及第二多肽序列的核酸。
13. 如請求項12之核酸，進一步包含編碼直接連接於該第一多肽序列之胺基末端之前導序列的核酸序列。
14. 一種表現載體，其包含如請求項12之核酸。
15. 一種哺乳動物細胞，其穩定轉染如請求項12之核酸且表現其所編碼的多肽。
16. 如請求項15之哺乳動物細胞，其中該哺乳動物細胞係選自由CHO細胞、HEK293細胞、PER.C6細胞及CAP細胞所組成之群。
17. 一種獲得如請求項3之成簇斯特多姆單元的方法，包含從穩定轉染表現載體的哺乳動物細胞培養基收穫該化合物，該表現載體包含編碼該直接連接的第一及第二多肽

序列之核酸序列。

18. 一種組合物，其包含如請求項7之高次多聚體。
19. 如請求項18之組合物，其中該二聚體或高次多聚體包含該組合物中化合物總量的至少約45%、至少約55%、至少約65%、至少約70%或至少約73%。
20. 一種如請求項7之高次多聚體之用途，其係用於製備調節免疫反應之藥物。
21. 如請求項20之用途，其中該調節造成樹突細胞上CD86表現之誘導及CD1a表現之抑制。
22. 一種如請求項7之高次多聚體之用途，其係用於製備治療發炎性或自體免疫疾病之藥物。
23. 如請求項22之用途，其中該發炎性或自體免疫疾病可以人類靜脈內免疫球蛋白(IVIG)治療。
24. 如請求項22之用途，其中該發炎性或自體免疫疾病選自由以下組成之群：後天自體免疫性血小板減少、後天抗因子VIII自體免疫、後天馮韋爾布蘭德病(acquired von Willebrand disease)、急性特發性自主神經機能障礙性神經病變、同種免疫性/自體免疫性血小板減少、ANCA陽極血管炎、強直性脊柱炎、抗核心蛋白多糖(BJ抗原)肌病、惡性貧血、氣喘、異位性皮膚炎、自體免疫性貧血、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性嗜中性白血球減少症、自體免疫性甲狀腺炎、自體免疫性葡萄膜炎、骨髓移植後排斥、腹腔疾病、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變(CIDP)、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經根神經

病變、慢性淋巴細胞白血病 (CLL)、克隆氏病 (Crohn's disease)、庫欣氏症候群 (Cushing's syndrome)、皮膚炎、皮多肌炎、糖尿病性神經病變、戴-布氏貧血 (Diamond-Blackfan anemia)、癲癇、埃文斯症候群 (Evan's syndrome)、費爾蒂氏症候群 (Felty's syndrome)、高歇氏病 (Gaucher's disease)、古德帕斯徹氏病 (Goodpasture's Disease)、格雷夫斯氏病 (Grave's Disease)、格-巴氏症候群 (Guillain-Barré syndrome)、新生兒溶血病、溶血性尿毒癥症候群、特發性血小板減少性紫癥 (ITP)、免疫介導之嗜中性白血球減少症、包涵體肌炎、發炎性腸病、發炎性肌病、幼年特發性關節炎、川崎病 (Kawasaki Disease)、朗-愛氏肌無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、與抗 GM1 相關之下位運動神經元症候群、未知意義之單株丙種球蛋白病變、多灶性運動神經病變 (MMN)、多發性硬化症、重症肌無力、脫髓鞘、肌炎、壞死性筋膜炎、視神經炎、器官移植排斥、佩吉特氏病 (Paget's disease)、具有抗 Yo 抗體之副腫瘤性小腦變性、副腫瘤性腦脊髓炎、副腫瘤性壞死性肌病、副蛋白血症 IgM 脫髓鞘多發性神經病變、天皰瘡、青黴胺誘導性多肌炎、輸血後紫癥、牛皮癬、純紅血球再生障礙、反應性關節炎、血小板輸注無效、風濕性關節炎、肉瘤病、硬皮症、硬化性膽管炎、具有抗 Hu 抗體之感覺神經病變、敗血症、鎌狀細胞危象、脊椎關節病、自發性多肌炎、僵人症候群 (Stiff Man Syndrome)、全身

性紅斑狼瘡(SLE)、全身性血管炎、血栓性血小板減少性紫癜、1型糖尿病、潰瘍性結腸炎、韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)、惠伯爾氏病(Whipple's disease)及X-連鎖具空泡肌病。

25. 如請求項24之用途，其中該發炎性或自體免疫疾病選自由以下組成之群：慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變(CIDP)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、糖尿病性神經病變、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、格-巴氏症候群、多灶性運動神經病變(MMN)及全身性紅斑狼瘡(SLE)。
26. 一種成簇斯特多姆，其包含多聚體之成簇斯特多姆單元，各成簇斯特多姆單元包含二個單體，各單體包含具有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的IgG1 Fc結構域單體，其以羧基末段直接連接具有SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的IgG2絞鏈結構域單體，其中二聚體之連接藉由其個別之IgG2絞鏈結構域發生。
27. 如請求項26之成簇斯特多姆單元，其中該多聚體包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6或至少7個連接二聚體。
28. 一種如請求項3之成簇斯特多姆單元之用途，其係用於製備治療發炎性或自體免疫疾病之藥物，其中該發炎性或自體免疫疾病選自由以下組成之群：後天自體免疫性血小板減少、後天抗因子VIII自體免疫、後天馮韋爾布蘭德病、急性特發性自主神經機能障礙性神經病變、同種免疫性/自體免疫性血小板減少、ANCA陽極血管

炎、強直性脊柱炎、抗核心蛋白多糖(BJ抗原)肌病、惡性貧血、氣喘、異位性皮膚炎、自體免疫性貧血、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性嗜中性白血球減少症、自體免疫性甲狀腺炎、自體免疫性葡萄膜炎、骨髓移植後排斥、腹腔疾病、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變(CIDP)、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經根神經病變、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、克隆氏病、庫欣氏症候群、皮膚炎、自發性多肌炎、糖尿病性神經病變、戴-布氏貧血、癲癇、埃文斯症候群、費爾蒂氏症候群、高歇氏病、古德帕斯徹氏病、格雷夫斯氏病、格-巴氏症候群、新生兒溶血病、溶血性尿毒癥症候群、特發性血小板減少性紫癥(ITP)、免疫介導之嗜中性白血球減少症、包涵體肌炎、發炎性腸病、發炎性肌病、幼年特發性關節炎、川崎病、朗-愛氏肌無力症候群、與抗GMI相關之下位運動神經元症候群、未知意義之單株丙種球蛋白病變、多灶性運動神經病變(MMN)、多發性硬化症、重症肌無力、脫髓鞘、肌炎、壞死性筋膜炎、視神經炎、器官移植排斥、佩吉特氏病、具有抗Yo抗體之副腫瘤性小腦變性、副腫瘤性腦脊髓炎、副腫瘤性壞死性肌病、副蛋白血症IgM脫髓鞘多發性神經病變、天皰瘡、青黴胺誘導性多肌炎、輸血後紫癥、牛皮癬、純紅血球再生障礙、反應性關節炎、血小板輸注無效、風濕性關節炎、肉瘤病、硬皮症、硬化性膽管炎、具有抗Hu抗體之感覺神經病變、敗血症、鐮狀細胞危象、脊椎關節病、自發

性多肌炎、僵人症候群、全身性紅斑狼瘡(SLE)、全身性血管炎、血栓性血小板減少性紫癜、1型糖尿病、潰瘍性結腸炎、韋格納氏肉芽腫、惠伯爾氏病及X-連鎖具空泡肌病。