



(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 I670078 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：104117112

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 27 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)**C07K16/18 (2006.01)**C07K16/30 (2006.01)*

(30)優先權：2014/05/27 美國

62/003,136

2014/07/02 美國

62/020,199

2015/01/30 美國

62/110,338

(71)申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)

臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

(72)發明人：翁啟惠 WONG, CHI HUEY (TW)；吳宗益 WU, CHUNG YI (TW)；蔡名鴻 TSAI, MING HUNG (TW)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2013120066A1

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：26 項 圖式數：9 共 96 頁

(54)名稱

抗 CD 20 醣抗體及其用途

ANTI-CD20 GLYCOANTIBODIES AND USES THEREOF

(57)摘要

本揭示係關於新穎種類之抗 CD20 單株抗體，其包括在每一 Fc 上具有相同 N-聚醣之抗 CD20 IgG 分子之均質群體。本發明抗體可自抗 CD20 單株抗體由 Fc 醣改造產生。重要的是與未經醣改造之相應單株抗體相比，本發明抗體具有改良之治療價值與增加之 ADCC 活性及增加之 Fc 受體結合親和力。

The present disclosure relates to a novel class of anti-CD20 monoclonal antibodies comprising a homogeneous population of anti-CD20 IgG molecules having the same N-glycan on each of Fc. The antibodies of the invention can be produced from anti-CD20 monoclonal antibodies by Fc glycoengineering. Importantly, the antibodies of the invention have improved therapeutic values with increased ADCC activity and increased Fc receptor binding affinity compared to the corresponding monoclonal antibodies that have not been glycoengineered.

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】

抗CD20醣抗體及其用途

ANTI-CD20 GLYCOANTIBODIES AND USES THEREOF

【技術領域】

本文揭示結合至CD20之抗體、抗體變體、抗原結合片段及其偶聯物以及相關組合物及使用方法。使用方法包含但不限於癌症療法及診斷。

【先前技術】

免疫球蛋白及Fc受體係免疫系統之關鍵醣蛋白組份。Fc受體結合抗體分子之Fc (效應物)區且在先天性及獲得性免疫系統內傳送資訊。抗體醣基化(尤其在IgG之Fc區中)在抗體活性之調變中發揮重要作用。相同重鏈中之N-聚醣已展示對於維持結構完整性、與Fc受體之通信及下游免疫反應至關重要。

Fc醣基化已成為治療性單株抗體領域中之重要主題。Fc醣基化可顯著改質Fc效應物功能(例如Fc受體結合及補體活化)，且由此影響治療抗體之活體內安全及功效特徵。

基於基因改造之若干表現系統已報導會產生治療性單株抗體。該等表現系統包含酵母(例如嗜甲醇酵母菌)、昆蟲細胞系及甚至細菌。然而，該等表現系統具有諸多可不利地影響治療抗體之效應物功能之缺陷。

大部分生物藥物係在酵母或哺乳動物細胞培養系統中產生以遞送具有具有期望醣基化模式之蛋白質且由此確保減小之免疫原性及較高活體內功效及穩定性。非哺乳動物表現系統(例如CHO或NS0細胞)

具有添加複雜人類型聚醣所需之機制。然而，該等系統中所產生之聚醣可不同於人類中所產生之聚醣。其醣基化機制通常添加不期望碳水化合物污染物，此可改變蛋白質摺疊，誘導免疫原性，且減小藥物之循環壽命。顯而易見，呈N-乙醯基神經胺酸形式之唾液酸不能有效添加於大部分哺乳動物細胞中且6-鏈接在該等細胞中丟失。唾液酸轉移所需之具有各種酶活性之改造細胞尚未成功提供醣型至蛋白質藥物之人類樣模式。迄今為止，需要將動物細胞或醣蛋白改造成儘可能類似於人類蛋白質之高度唾液酸化產物。

另外，哺乳動物細胞培養遞送並不皆具有相同性質之醣基化模式之異質混合物。該等醣基化模式可影響諸如治療性蛋白質之安全性、功效及血清半衰期等性質。

【發明內容】

本揭示內容係關於新穎種類之單株抗體(稱為「醣抗體」)之研發。因此，本揭示內容之一態樣係關於抗CD20醣抗體之組合物，其包括在每一Fc上具有相同N-聚醣之抗CD20 IgG分子之均質群體。本發明之抗CD20醣抗體可自抗CD20單株抗體由Fc醣改造產生。重要的是，與未醣改造之相應單株抗體相比，抗CD20醣抗體具有改良之治療價值以及增加之ADCC活性及增加之Fc受體結合親和力。此外，本揭示內容亦提供適於單一療法或組合療法之組合醫藥組合物，其包括本文所闡述之實質上均質醣抗體及其他抗體及/或其他治療劑。醫藥組合物可以共同調配物形式投與或以共同投與治療方案使用。

在一實施例中，N-聚醣連接至Fc區之Asn-297 (CH2結構域)。

在一些實施例中，本文所闡述之抗CD20醣抗體包括具有SEQ ID NO: 1中所陳述胺基酸序列之重鏈及具有SEQ ID NO: 2中所陳述胺基酸序列之輕鏈。在一較佳實施例中，該醣抗體包括利妥昔單抗(Rituximab)(Rituxan®)之輕鏈序列及重鏈序列。存在兩種不同類型之

抗CD20抗體(Cragg, M.S.等人, Blood, 103 (2004) 2738-2743; 及Cragg, M.S.等人, Blood, 101 (2003) 1045-1052)。I型抗體(例如利妥昔單抗(具有正常醣基化模式之未-非典型岩藻醣基化、非醣改造抗體, 亦稱為「RTX」))具有強力補體介導之細胞毒性, 而II型抗體(例如托西莫單抗(Tositumomab) (B1)、11B8、AT80或人類化B-Ly1抗體)經由級聯獨立性細胞凋亡有效引發靶細胞死亡且同時具有磷脂醯絲胺酸暴露。

本文揭示諸多自利妥昔單抗由Fc醣改造構築之功能活性抗CD20醣抗體。重要的是, 與利妥昔單抗相比, 具有最佳化醣型之抗CD20醣抗體展現顯著改良之ADCC活性。此係首次報導展示已成功生成具有增進之ADCC活性之均質Fc-醣基化抗CD20抗體。

在一些實施例中, 本文所闡述之抗CD20醣抗體之特徵在於該等醣抗體與利妥昔單抗相比展現對Fc γ RIIIA之增進之結合。在某些實施例中, 與親代抗體之ADCC活性相比, 本發明醣抗體之所得ADCC活性增加至少8倍、較佳地至少15倍、更佳地ADCC活性增加至少35倍、較佳地ADCC活性增加至少50倍、較佳地ADCC活性增加至少60倍、最佳地ADCC活性增加至少80倍。

在一些實施例中, 本文所闡述之N-聚醣具有二分枝結構。在一些實施例中, N-聚醣包括二等分GlcNAc。

在一些實施例中, 本文所闡述之N-聚醣包括至少一個 α 2-6末端唾液酸。在某些實施例中, N-聚醣包括一個 α 2-6末端唾液酸。在一較佳實施例中, N-聚醣包括兩個 α 2-6末端唾液酸。

在一些實施例中, 本文所闡述之N-聚醣包括至少一個 α 2-3末端唾液酸。在某些實施例中, N-聚醣包括一個 α 2-3末端唾液酸。在一較佳實施例中, N-聚醣包括兩個 α 2-3末端唾液酸。

在一些實施例中, 本文所闡述之N-聚醣包括至少一種半乳糖。

在某些實施例中，N-聚醣包括一種半乳糖。在一較佳實施例中，N-聚醣包括兩種半乳糖。

較佳地，本揭示內容之N-聚醣不含核心岩藻醣。

在一些實施例中，本文所闡述之N-聚醣包括選自由以下組成之群之序列：
Sia₂(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3/α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-6/α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3/α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-6/α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂、Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GlcNAcMan₃GlcNAc₂及Man₃GlcNAc₂。

在較佳實施例中，本文所闡述之N-聚醣具有選自由以下組成之群之序列：
Sia₂(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3/α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-6/α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-3/α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia₂(α2-6/α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂、Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GlcNAcMan₃GlcNAc₂及Man₃GlcNAc₂。

6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂及Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂。

本揭示內容之另一態樣描述一種醫藥組合物，其包括本文所闡述之抗CD20醣抗體之組合物及醫藥上可接受之載劑。

本揭示內容之醫藥組合物可用於治療。本文所揭示者包含治療患者之癌症之方法，該方法包括向患者投與有效量之本文所闡述之醫藥組合物。

癌症之實例包含但不限於表現CD20之癌症、B細胞淋巴瘤、NHL、前體B細胞淋巴母細胞白血病/淋巴瘤及成熟B細胞贅瘤、B細胞慢性淋巴細胞性白血病(CLL)/小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、B細胞前淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤(MCL)，濾泡性淋巴瘤(FL)、低度(low-grade)、中度及高度(FL)，皮膚濾泡中心淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、MALT型邊緣區B細胞淋巴瘤、結節邊緣區B細胞淋巴瘤、脾臟型邊緣區B細胞淋巴瘤、多毛細胞白血病、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、漿細胞瘤、漿細胞骨髓瘤、移植後淋巴增生性病徵、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)及間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)。

在某些實施例中，癌症係B細胞淋巴瘤，例如非何傑金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)。

另外，本文所闡述之醫藥組合物可用於治療患有自體免疫或發

炎性疾病之患者。治療方法包括向患者投與有效量之本文所闡述之醫藥組合物。在某些實施例中，共同投與一或多種增進該等藥劑之效應之其他細胞毒性劑、化學治療劑或抗癌劑或化合物或電離輻射。

自體免疫或發炎性疾病之實例包含但不限於包含但不限於類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、韋格納氏病(Wegener's disease)、發炎性腸疾病、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、自體免疫性血小板減少症、多發性硬化、牛皮癬、IgA腎病變、IgM多發性神經病變、重症肌無力、血管炎、糖尿病、雷諾氏症候群(Reynaud's syndrome)、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、胃炎、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、強直性脊柱炎、C型肝炎相關冷球蛋白血症性血管炎、慢性局灶性腦炎、大皰性類天皰瘡、血友病A、膜性增殖性腎小球腎炎、成人及幼年型皮肌炎、成人型多肌炎、慢性蕁麻疹、原發性膽汁性肝硬變、視神經脊髓炎、格雷夫氏甲狀腺機能障礙性疾病(Graves' dysthyroid disease)、大皰性類天皰瘡、膜性增殖性腎小球腎炎、丘-施二氏症候群(Churg-Strauss syndrome)、哮喘、牛皮癬性關節炎、皮炎、呼吸下窘迫症候群、腦膜炎、腦炎、葡萄膜炎、濕疹、動脈粥樣硬化、白血球黏附缺陷、幼年發病型糖尿病、萊特爾氏病(Reiter's disease)、貝切特氏病(Behcet's disease)、溶血性貧血、特應性皮炎、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、歐門氏症候群(Omenn's syndrome)、慢性腎衰竭、急性感染性單核白血球增多症、HIV及皰疹相關疾病、全身性硬化、薛格連氏症候群(Sjorgen's syndrome)及腎小球腎炎、皮肌炎、ANCA、再生障礙性貧血、自體免疫溶血性貧血(AIHA)、因子VIII缺陷、血友病A、自體免疫嗜中性白血球減少症、卡斯爾曼氏症候群(Castleman's syndrome)、古德巴斯德症候群(Goodpasture's syndrome)、實體器官移植排斥、移植物抗宿主

病(GVHD)、自體免疫肝炎、淋巴樣間質性肺炎(HIV)、閉塞性細支氣管炎(非移植)、格-巴二氏症候群(Guillain-Barre syndrome)、大血管血管炎、巨細胞(高安氏(Takayasu's))動脈炎、中血管血管炎、川崎氏病(Kawasaki's disease)及結節性多動脈炎(polyarteritis nodosa)。

在某些實施例中，自體免疫或發炎性疾病係類風濕性關節炎。

在本文所闡述之該等治療方法中，抗CD20醣抗體之醫藥組合物可單獨或連同第二治療劑(例如第二抗體或化學治療劑或免疫阻抑劑)投與。第二抗體可為結合CD20或不同B細胞抗原或NK或T細胞抗原者。

本文所闡述之抗CD20醣抗體可自由FDA批准或正處於研發中之抗CD20單株抗體生成。抗CD20單株抗體可為人類化、人類或嵌合抗體。

可在活體外產生本文所闡述之抗CD20醣抗體。可藉由Fc醣改造生成抗CD20醣抗體。在某些實施例中，抗CD20醣抗體係自哺乳動物細胞培養獲得之抗CD20單株抗體以酶或化學酶改造。

在又一態樣中，本揭示內容係關於製備抗CD20醣抗體之方法，該方法包括：(a)使抗CD20單株抗體與 α -岩藻醣苷酶及至少一種醣苷內切酶接觸，由此產生在Fc上具有去岩藻醣基化單醣GlcNAc之抗CD20單株抗體，及(b)在適宜條件下向GlcNAc中添加碳水化合物部分。

在一些實施例中，用於製備抗CD20醣抗體之抗CD20單株抗體係利妥昔單抗。

在一些實施例中，碳水化合物部分係選自由以下組成之群：
 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、
 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-$

6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-
 3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-3/α2-
 6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-
 3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-
 6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia(α2-6)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-
 3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia(α2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、
 GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂ 、 Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、
 GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、
 GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 GlcNAcMan₃GlcNAc₂
 及Man₃GlcNAc₂。

在較佳實施例中，碳水化合物部分係選自由以下組成之群：

Sia₂(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-
 6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia₂(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-3/α2-
 6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-
 3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-3/α2-
 6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-
 3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-
 6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia(α2-6)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-
 3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、
 Sia(α2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、

GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂及Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂。

可藉由轉醣苷酶實施步驟(b)中之添加。轉醣苷酶包含但不限於EndoS、EndoS2、EndoH、EndoA、EndoM、EndoF、EndoF1、EndoF2及EndoF3。

可用於本發明方法之醣苷酶切酶包含但不限於EndoS、EndoS2、EndoH、EndoA、EndoM、EndoF、EndoF1、EndoF2及EndoF3。

在一些實施例中， α -岩藻醣苷酶包括具有與SEQ ID NO: 5至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列之多肽。

在某些實施例中， α -岩藻醣苷酶係重組類桿菌(*Bacteroides*) α -岩藻醣苷酶。

本發明一或多個實施例之詳細內容陳述於下文說明書中。根據下列圖式及若干實施例之詳細說明亦及隨附申請專利範圍，本發明之其他特徵或優點將顯而易見。

【圖式簡單說明】

圖1.展示單株抗體之Fc醣改造之示意圖。途徑(A)展示業內已知產生岩藻醣基化抗體及非岩藻醣基化抗體之混合物之方法。途徑(B)展示產生均質醣抗體之本發明方法。

圖2.展示抗CD20 GAb 101、102、104、105、106、107、108、109、110、111、201及利妥昔單抗之SDS-PAGE分析。

圖3.展示抗CD20 GAb 101、102、104、105、106、107、108、109、110及111之N-聚醣特徵分析。

圖4.展示利妥昔單抗、GAb101及GAb104與(A) Ramos細胞及(B) SKW6.4細胞之結合及利妥昔單抗、GAb101及GAb117與(C) Ramos、Raji及SU-DHL4細胞之結合。

圖5.展示藉由利妥昔單抗、GAb101及GAb104達成之對(A) Ramos

細胞及(B) SKW6.4細胞之細胞凋亡。

圖6.展示藉由(A)利妥昔單抗、GAb101及GAb117、(B) GAb101、GAb104及GAb108誘導之對Ramos細胞之CDC。

圖7.展示藉由利妥昔單抗、GAb101、GAb104及GAb117使用效應物PBMC細胞誘導之對(A) Ramos細胞及(B) (C) SKW6.4細胞之ADCC。

圖8.展示在不存在自體血漿下藉由利妥昔單抗及抗CD20 GAb 101、102、105、106、107、108、109、110及111所達成來自三種供體之PBMC中之人類B細胞之消耗。

圖9.展示藉由GAb101達成之SCID小鼠中之Ramos腫瘤異種移植物之阻抑。

【實施方式】

利妥昔單抗(Rituxan®)係靶向表現於超過95%之B細胞淋巴瘤上之CD20蛋白質之嵌合抗CD20抗體。使用抗CD20 mAb利妥昔單抗之單株抗體療法代表過去30年治療組織增殖性病變之最重要進展之一。利妥昔單抗係在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中產生。哺乳動物細胞培養系統遞送並不皆具有相同性質之醣基化模式之異質混合物。抗體內Fc醣基化之多樣性對應於Fc效應物功能之多樣性。因此，Fc聚醣之此異質性具有功能後果，此乃因其影響IgG分子與Fc受體及C1q之結合且由此影響抗體效應物功能，且可觸發患者中之不期望效應，由此可視為安全問題。舉例而言，在接受含有利妥昔單抗之免疫化學療法之後，部分患有CD20陽性惡性腫瘤之患者不能作出反應，或更通常而言復發。

仍需要使用改良之抗CD20抗體來改良單株抗體療法。醣基化模式之異質混合物中之少數特異性醣型已知會賦予期望生物功能。因此，極為關注生成含有充分定義之聚醣結構及序列作為用於治療目的

之期望醣型之治療抗體。

定義

除非另外指示，否則本發明實踐將採用熟習此項技術者熟知之分子生物學、微生物學、重組DNA及免疫學之習用技術。該等技術全面闡釋於文獻中。例如參見Molecular Cloning A Laboratory Manual，第2版，由Sambrook、Fritsch及Maniatis編輯(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)；DNA Cloning，第I及II卷(D. N. Glover編輯，1985)；Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss公司，1987)；Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)；B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)；the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press公司，N.Y.)；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller及M. P. Calos編輯，1987, Cold Spring Harbor Laboratory)；Methods In Enzymology，第154及155卷(Wu等人，編輯)，Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer及Walker編輯，Academic Press, London, 1987)；Antibodies: A Laboratory Manual，Harlow及Lanes (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)；及Handbook Of Experimental Immunology，第I-IV卷(D. M. Weir及C. C. Blackwell，編輯，1986)。

術語「醣抗體」係由發明者Dr. Chi-Huey Wong創造，其係指具有結合Fc區之單一均勻醣型之單株抗體(較佳地治療性單株抗體)之均質群體。構成基本上均質群體之個別醣抗體相同，結合相同表位，且含有具有充分定義之聚醣結構及序列之相同Fc聚醣。

如本文中所使用，術語「抗CD20醣抗體」(「anti-CD20 glycoantibodies，抗CD20 GAbs」)係指在Fc上具有相同醣型之抗CD20 IgG分子之均質群體。

如本文中所使用，術語「抗CD20醣抗體」(「anti-CD20

glycoantibody，抗 CD20 GAb」)係指抗 CD20 醣抗體 (anti-CD20 glycoantibodies)中之個別IgG分子。

如本文中所使用，術語「聚醣」係指多醣、寡醣或單醣。聚醣可為醣殘基之單體或聚合物且可為直鏈或具支鏈。聚醣可包含天然醣殘基(例如葡萄糖、N-乙醯基葡糖胺、N-乙醯基神經胺酸、半乳糖、甘露醣、岩藻醣、己醣、阿拉伯醣、核醣、木醣等)及/或改質醣(例如2'-氟核醣、2'-去氧核醣、磷酸甘露醣、6'硫N-乙醯基葡糖胺等)。聚醣在本文中亦用於係指醣偶聯物(例如醣蛋白、醣脂、醣肽、醣蛋白質組、肽多醣、脂多醣或蛋白聚醣)之碳水化合物部分。聚醣通常僅由單醣之間之O-醣苷鏈接組成。舉例而言，纖維素係由 β -1,4-連接D-葡萄糖構成之聚醣(或更具體而言葡聚醣)，且甲殼質係由 β -1,4-連接N-乙醯基-D-葡糖胺構成之聚醣。聚醣可為單醣殘基之均聚物或異聚物，且可為直鏈或具支鏈。聚醣可發現連接至蛋白質，如在醣蛋白及蛋白聚醣中。其通常發現於細胞之外表面上。O-及N-連接聚醣極常見於真核細胞中，但亦可發現(但較不常見)於原核細胞中。N-連接聚醣發現連接至序列子中天門冬醯胺之R-基團氮(N)。序列子係Asn-X-Ser或Asn-X-Thr序列，其中X係除堅果醣外之任一胺基酸。

如本文中所使用，術語「岩藻醣」、「核心岩藻醣」及「核心岩藻醣殘基」可互換使用且係指在 α 1,6-位連接至N-乙醯基葡糖胺之岩藻醣。

如本文中所使用，術語「N-聚醣」、「N-連接聚醣」、「N-連接醣基化」、「Fc聚醣」及「Fc醣基化」可互換使用且係指由連接至含Fc多肽中天門冬醯胺殘基之醯胺氮之N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)連接之N-連接寡醣。術語「含Fc多肽」係指包括Fc區之多肽(例如抗體)。

如本文中所使用，術語「醣基化模式」及「醣基化特徵」可互換使用且係指以酶方式或以化學方式自醣蛋白或抗體釋放且然後(例

如)使用LC-HPLC或MALDI-TOF MS及諸如此類分析碳水化合物結構之N-聚醣物質之特徵性「指紋」。例如參見Current Analytical Chemistry，第1卷，第1期(2005)，第28-57頁中之綜述；其全部內容以引用方式併入本文中。

如本文中所使用，術語「醣改造Fc」在本文中使用時係指Fc區上之N-聚醣以酶方式或以化學方式發生改變或改造。本文所用之術語「Fc醣改造」係指用於製備醣改造Fc之酶或化學製程。改造之實例性方法闡述於(例如) Wong等人，USSN12/959,351中，其內容以引用方式併入本文中。

在Fc區醣基化特徵背景中之術語「均質」、「均勻」、「均勻地」及「均質性」可互換使用且欲指由一種期望N-聚醣物質代表之單一醣基化模式，其中具有較少或並無痕量前體N-聚醣。在某些實施例中，前體N-聚醣之痕量係小於約2%。

「基本上純」蛋白質意指基於組合物之總重量包括至少約90重量% (包含(例如)至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99重量%)之蛋白質之組合物。

「基本上均質」蛋白質意指基於組合物之總重量包括至少約98重量%之蛋白質(包含(例如)至少約98.5%、至少約99%)之組合物。在某些實施例中，蛋白質係抗體、結構變體及/或其抗原結合片段。

如本文中所使用，術語「IgG」、「IgG分子」、「單株抗體」、「免疫球蛋白」及「免疫球蛋白分子」可互換使用。

如本文中所使用，術語「Fc受體」或「FcR」闡述結合抗體之Fc區之受體。較佳FcR係原始序列人類FcR。另外，較佳FcR係結合IgG抗體者(γ 受體)且包含Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)及Fc γ RIII (CD16)亞類之受體，包含該等受體之對偶基因變體及交替剪接形式。Fc γ RII

受體包含FcγRIIA(「活化型受體」)及FcγRIIB(「抑制型受體」)，二者具有類似胺基酸序列，其主要差異在於其胞質結構域上。活化型受體FcγRIIA在其胞質結構域中含有免疫受體酪胺酸活化基序(ITAM)。抑制型受體FcγRIIB在其胞質結構域中含有免疫受體酪胺酸抑制基序(ITIM)。(參見M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)中之綜述)。在Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92(1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34(1994)；及de Haas等人，*J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)中對FcR進行綜述。本文之術語「FcR」涵蓋其他FcR，包含彼等欲在將來鑑別者。該術語亦包含新生兒受體(FcRn)，該受體負責將母體IgG轉移至胎兒體內(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587(1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249(1994))。

本文所用之術語「效應物功能」係指源自抗體Fc區與Fc受體或配體之相互作用之生物化學事件。實例性「效應物功能」包含C1q結合、補體依賴性細胞毒性、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、吞噬作用、細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)下調。可使用業內已知之各種分析來分析該等效應物功能。

如本文中所使用，「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指以下細胞毒性形式：其中與存在於某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性球及巨噬球)上之Fc受體(FcR)結合之分泌Ig使該等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合帶抗原靶細胞且隨後利用細胞毒素殺死該靶細胞。抗體「武裝」該等細胞毒性細胞且為該殺死過程絕對所需。用於介導ADCC之原代細胞(NK細胞)僅表現FcγRIII，而單核球表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR於造血細胞上之表現匯總於Ravetch及Kinet，*Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁表3中。為評估所關注分子之ADCC活性，可實施活體外ADCC分析，例如闡述於美國專利第5,500,362號或美國專利第

5,821,337號中者。可用於該等分析之效應細胞包含周邊血單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。另一選擇為或另外，可在活體內(例如在諸如揭示於Clynes等人，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中之動物模型等動物模型中)評估所關注分子之ADCC活性。

本文所用之術語「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指靶細胞在補體存在下之裂解。經典補體途徑之活化係藉由補體系統之第一補體(C1q)與抗體(適當亞類)之結合來起始，該等抗體結合其同族抗原。為評估補體活化，可實施CDC分析，例如如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所闡述。

「嵌合」抗體(免疫球蛋白)中重鏈及/或輕鏈之一部分與衍生自特定物種或屬特定抗體種類或亞類之抗體的相應序列相同或同源，而該(等)鏈之其餘部分與衍生自另一物種或屬另一抗體種類或亞類之抗體的相應序列相同或同源；且包含該等抗體之片段，只要其展現期望生物活性即可(美國專利第4,816,567號；Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，81:6851-6855 (1984))。本文所用之人類化抗體係嵌合抗體之子組。

「人類化」形式之非人類(例如鼠類)抗體係含有最少量源自非人類免疫球蛋白之序列之嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體係如下人類免疫球蛋白(接受者或受體抗體)：其中接受者之超變區殘基由來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之超變區(供體抗體)之具有期望特異性、親和力及容量之殘基所代替。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv框架區(FR)殘基由相應非人類殘基代替。另外，人類化抗體可包括未在接受者抗體或供體抗體中發現之殘基。作出該等改質以進一步改善抗體性能，例如結合親和力。通常，人類化抗體將包括實質上全部之至少一個且通常兩個可變結構域，其中全部或實質上全部超變環對應於非人類免疫球蛋白之彼等超變環，且全

部或實質上全部FR區為人類免疫球蛋白序列之彼等FR區，但FR區可包含改良結合親和力之一或多個胺基酸取代。FR中之該等胺基酸取代之數量通常在H鏈中不超過6，且在L鏈中不超過3。人類化抗體視情況亦包括通常人類免疫球蛋白之免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分。其他細節參見Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta，*Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦參見下列綜述文件及其中所引用之參考文獻：Vaswani及Hamilton，*Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)；Harris，*Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross，*Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

如本文中所使用，術語「抗原」定義為任一能夠誘發免疫反應之物質。如本文中所使用，術語「抗原特異性」係指特定抗原或抗原片段之供應產生特異性細胞增殖之細胞群體之性質。

如本文中所使用，術語「免疫原性」係指免疫原、抗原或疫苗刺激免疫反應之能力。

如本文中所使用，術語「表位」定義為抗原分子中接觸抗體之抗原結合位點或T細胞受體之部分。

如本文中所使用，術語「特異性結合」係指結合對(例如抗體及抗原)之間之相互作用。在各種情況下，特異性結合可體現為親和力常數為約 10^{-6} 莫耳/公升、約 10^{-7} 莫耳/公升或約 10^{-8} 莫耳/公升或更小。

「分離」抗體係已經鑒定並自其天然環境組份中分離及/或回收之抗體。其天然環境之污染組份係會干擾抗體之研究、診斷或治療用途之材料，且可包含酶、激素及其他蛋白質性溶質或非蛋白質性溶質。

本文所用之片語「實質上類似」、「實質上相同」、「等效」或

「實質上等效」表示兩個數值(例如一個值與分子有關且另一者與參考/對比分子有關)之間具有足夠高相似度，從而熟習此項技術者會認為該兩個值之間之差異在藉由該等值(例如Kd值、抗病毒效應等)所量測生物特性之背景下具有較少或不具有生物及/或統計學顯著性。該兩個值之間之差異係(例如)小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%及/或小於約10%，其隨參考/對比分子之值而變化。

本文所用之片語「實質上減少」或「實質上不同」表示兩個數值(通常一個值與分子有關且另一值與參考/對比分子有關)之間具有足夠高差異度，從而熟習此項技術者會認為該兩個值之間之差異在藉由該等值(例如Kd值)所量測生物學特性之背景下具有統計學顯著性。該兩個值之間之差異係(例如)大於約10%、大於約20%、大於約30%、大於約40%及/或大於約50%，其隨參考/對比分子之值而變化。

「結合親和力」通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間之非共價相互作用的總強度。除非另外指示，否則本文所用之「結合親和力」係指固有結合親和力，其反映結合對之成員(例如抗體及抗原)之間之1:1相互作用。分子X對於其配偶體Y之親和力通常可表示為解離常數(Kd)。可藉由業內已知之常用方法(包含彼等闡述於本文中者)來量測親和力。低親和力抗體通常緩慢地結合抗原且往往易於解離，而高親和力抗體通常較快結合抗原且往往較長時間保持結合。多種量測結合親和力之方法為業內已知，其任一者皆可用於本發明目的。具體闡釋性實施例闡述於下文中。

抗體之「可變區」或「可變結構域」係指抗體重鏈或輕鏈之胺基末端結構域。該等結構域通常係抗體之最可變部分且含有抗原結合位點。

術語「可變」係指如下事實：在抗體之間可變結構域的某些部分於序列上存在廣泛差異且可用於實現每一特定抗體對其特定抗原之

結合及特異性。然而，可變性在整個抗體可變結構域中並非均勻分佈。在輕鏈及重鏈可變結構域二者中該可變性均集中在三個稱為互補決定區(CDR)或超變區之區段上。可變結構域之保守程度較高之部分稱為框架(FR)。原始重鏈及輕鏈之可變結構域各自包括4個由三個CDR連結之主要採用 β 薄片構形的FR區，該等CDR形成連結且在一些情形下形成 β 薄片結構之一部分的環。每一鏈中之CDR藉助FR區保持緊密靠近，且與來自另一鏈之CDR一起促進形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，National Institutes of Health，Bethesda，Md (1991))。恆定結構域並不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應物功能，例如抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

抗體之木瓜酶消化產生兩個相同抗原結合片段，稱為「Fab」片段，其各自具有單一抗原結合位點；及殘餘「Fc」片段，其名稱反映其易於結晶之能力。經胃蛋白酶處理產生F(ab')₂片段，該片段具有兩個抗原組合位點且仍然能夠交聯抗原。

「Fv」係含有完全抗原識別及結合位點之最小抗體片段。在雙鏈Fv物質中，此區域係由一個重鏈可變結構域與一個輕鏈可變結構域之緊密非共價結合二聚體組成。在單鏈Fv物質中，一個重鏈可變結構域及一個輕鏈可變結構域可藉由柔性肽連接體共價連接，從而該等輕鏈及重鏈可以與雙鏈Fv物質中類似之「二聚體」結構來締合。每一可變結構域之3個CDR以此構形相互作用以界定VH-VL二聚體之表面上之抗原結合位點。六個CDR共同賦予了該抗體抗原結合特異性。然而，即使單一可變結構域(或Fv之一半，其僅包括三個對抗原具有特異性之CDR)亦具有識別並結合抗原之能力，但其親和力低於完整結合位點。

Fab片段亦含有輕鏈恆定結構域及重鏈之第一恆定結構域

(CH1)。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於在重鏈CH1結構域之羧基末端添加幾個殘基，包含一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。在本文中，Fab'-SH係恆定結構域中之半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之Fab'之名稱。F(ab')₂抗體片段最初係作為在其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對產生。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

根據恆定結構域之胺基酸序列，可將來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)之「輕鏈」指定為兩種完全不同類型(稱為卡帕(κ)及蘭布達(λ))中之一種。

端視抗體(免疫球蛋白)重鏈中恆定結構域之胺基酸序列，可將抗體(免疫球蛋白)指定為不同種類。存在5大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等類別中之若干可進一步分成子類(同種型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定結構域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同種類之免疫球蛋白之亞單位結構及三維構形已眾所周知且通常闡述於(例如) Abbas等人，Cellular及Mol. Immunology，第4版(2000)中。抗體可為較大融合分子之一部分，其係藉由抗體與一或多種其他蛋白質或肽之共價或非共價締合來形成。

術語「全長抗體」、「完整抗體」與「全抗體」在本文中可互換使用，其係指呈實質上完整形式之抗體，且不為如下文所定義之抗體片段。該等術語尤其係指重鏈含有Fc區之抗體。

「抗體片段」僅包括完整抗體之一部分，其中該部分保留至少一種及(至多)大部分或所有通常在存在於完整抗體中時與該部分有關之功能。在一實施例中，抗體片段包括完整抗體之抗原結合位點且由此保留結合抗原之能力。在另一實施例中，抗體片段(例如包括Fc區者)保留其在存在於完整抗體中時通常與Fc區有關之至少一種生物功能，例如FcRn結合、抗體半衰期調變、ADCC功能及補體結合。在一

實施例中，抗體片段係其活體內半衰期實質上類似於完整抗體之單價抗體。舉例而言，此一抗體片段可包括連接至能賦予該片段活體內穩定性之Fc序列的抗原結合臂。

本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體之群體(亦即構成該群體之個別抗體除了可能少量存在之可能天然突變外，其餘均相同)獲得之抗體。因此，修飾語「單株」指示並非獨立抗體混合物之抗體性質。這種單株抗體通常包括含有會結合標靶之多肽序列之抗體，其中靶結合多肽序列係藉由包括自複數個多肽序列中選拔單一靶結合多肽序列之過程獲得。舉例而言，選拔過程可為自複數個純系(例如一組集合之雜交瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系)選拔獨特純系。應理解，可進一步改變所選拔之靶結合序列，以(例如)改良對靶之親和力、人類化該靶結合序列、改良其在細胞培養物中之生產、降低其活體內免疫原性、產生多特異性抗體，等等，且包含經改變靶結合序列之抗體亦係本發明之單株抗體。與通常包含針對不同決定簇(表位)之不同抗體的多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之每一單株抗體係針對抗原上之單個決定簇。除特異性外，單株抗體製劑之優勢亦在於其通常不受其他免疫球蛋白污染。修飾語「單株」指示抗體特徵係自實質上均質之抗體群體獲得，且不應理解為需要藉由任一特定方法來產生該抗體。舉例而言，擬用於本發明之單株抗體可藉由各種技術製得，包含(例如)雜交瘤方法(例如Kohler等人，Nature, 256: 495 (1975)；Harlow等人，Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版，1988)；Hammerling等人，Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重組DNA方法(例如參見美國專利第4,816,567號)、噬菌體展示技術(例如參見Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)；Marks等人，J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)；Sidhu等人，J. Mol. Biol.

338(2): 299-310 (2004)；Lee等人，J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)；及Lee等人，J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004))及用於在動物中產生具有一部分或所有編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因座或基因之人類或人類樣抗體之技術(例如參見WO98/24893；WO96/34096；WO96/33735；WO91/10741；Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature 362: 255-258 (1993)；Bruggemann等人，Year in Immunol. 7:33 (1993)；美國專利第5,545,807號、第5,545,806號、第5,569,825號、第5,625,126號、第5,633,425號、第5,661,016號；Marks等人，Bio. Technology 10: 779-783 (1992)；Lonberg等人，Nature 368: 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)；Fishwild等人，Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)及Lonberg及Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)。

具體而言，本文之單株抗體包含「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與衍生自特定物種或屬特定抗體種類或亞類之抗體的相應序列相同或同源，而該(等)鏈之其餘部分與衍生自另一物種或屬另一抗體種類或亞類之抗體的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現期望生物學活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，81:6851-6855(1984))。

亦參見下列綜述文件及其中所引用之參考文獻：Vaswani及Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

本文所用之術語「超變區」、「HVR」或「HV」係指抗體可變結

構域中序列超變及/或結構上形成所定義環之區域。通常，抗體包括6個超變區；3個位於VH中(H1、H2、H3)，且3個位於VL中(L1、L2、L3)。本文使用且涵蓋多個超變區之描述。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且使用最為廣泛(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。而Chothia係指結構環之位置(Chothia及Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM超變區代表Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷方案且用於Oxford Molecular之AbM抗體建模軟體中。「接觸」超變區係基於對可獲得複雜晶體結構之分析。來自該等超變區中每一者之殘基如下所述。

Loop Kabat AbM Chothia Contact

L1 L24-L34 L24-L34 L26-L32 L30-L36

L2 L50-L56 L50-L56 L50-L52 L46-L55

L3 L89-L97 L89-L97 L91-L96 L89-L96

H1 H31-H35B H26-H35B H26-H32 H30-H35B

(Kabat編號)

H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35

(Chothia編號)

H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

超變區可包括如下「經延伸超變區」：VL中之24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56或49-56 (L2)及89-97或89-96 (L3)以及VH中之26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2)及93-102、94-102或95-102 (H3)。對於該等定義中之每一者，根據Kabat等人(見上文)對可變結構域殘基編號。

「框架」或「FR」殘基係彼等除如本文所定義超變區殘基外之可變結構域殘基。

術語「依Kabat中之可變結構域殘基編號」或「依Kabat中之胺基酸位置編號」及其變化形式係指在Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中用於抗體編譯之重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域之編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有較少或額外之對應於可變結構域FR或HVR之縮短或插入之胺基酸。舉例而言，重鏈可變結構域可包含在H2之殘基52後之單胺基酸插入(根據Kabat編號之殘基52a)及重鏈FR殘基82後之插入殘基(例如，根據Kabat編號之殘基82a、82b及82c等)。可藉由將抗體序列之同源區與「標準」Kabat編號序列比對來確定所指定抗體殘基之Kabat編號。

單鏈「Fv」或「scFv」抗體片段包括抗體之VH及VL結構域，其中該等結構域係以單一多肽鏈存在。通常，scFv多肽進一步包括VH結構域與VL結構域之間之多肽連接體，其使得scFv能夠形成用於結合抗原之期望結構。關於scFv之綜述，參見Pluckthun，*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Rosenburg及Moore編輯，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

術語「雙價抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包括在同一多肽鏈(VH - VL)中與輕鏈可變結構域(VL)連結之重鏈可變結構域(VH)。藉由使用過短而不容許在同一鏈上之兩個結構域之間配對之連接體，迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對並產生兩個抗原結合位點。雙價抗體更全面地闡述於(例如) EP 404,097；WO93/1161；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

「人類抗體」指其擁有之胺基酸序列係對應於由人類產生之抗體之胺基酸序列及/或係使用如本文所揭示製備人類抗體的任一技術

所製備者。此人類抗體之定義明確排除包括非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「親和力成熟」抗體係在其一或多個HVR中存在一或多處改變之抗體，該等改變之結果會使該等抗體比沒有彼等改變之親代抗體更改良對抗原之親和力。在一實施例中，親和力成熟抗體對靶抗原具有毫微莫耳或甚至皮莫耳親和力。親和力成熟抗體係藉由業內已知程序產生。Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)闡述藉由VH及VL結構域改組達成親和力成熟。CDR及/或框架殘基之隨機突變誘發闡述於以下文獻中：Barbas等人，*Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

「阻斷性」抗體或「拮抗劑」抗體係抑制或降低所結合抗原之生物活性的抗體。某些阻斷性抗體或拮抗劑抗體實質上或完全地抑制抗原之生物活性。

本文所用之「激動劑抗體」係模擬所關注多肽之功能活性中之至少一者的抗體。

「病症」係任一受益於本發明抗體之治療之病狀。此包含慢性及急性病症或疾病，包含使哺乳動物易患所討論病症之彼等病理學病狀。本文擬治療病症之非限制性實例包含癌症。

術語「細胞增殖性病症」及「增殖性病症」係指與一定程度之異常細胞增殖有關之病症。在一實施例中，細胞增殖性病症係癌症。

本文所用之「腫瘤」係指所有腫瘤性細胞生長及增殖(無論係惡性的抑還係良性的)以及所有癌前期及癌性細胞及組織。本文中所提及之術語「癌症」、「癌性」、「細胞增殖性病症」、「增殖性病症」及

「腫瘤」並不相互排斥。

術語「癌症」及「癌性」通常係指或闡述哺乳動物之特徵通常在於細胞生長/增殖失調之生理學病狀。癌症之實例包含但不限於癌瘤、淋巴瘤(例如何傑金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非何傑金氏淋巴瘤)、母細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包含鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌瘤、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、膠質母細胞瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌瘤、唾液腺癌瘤、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、白血病及其他淋巴增生性病症及各種類型之頭頸癌。

如本文中所使用，術語「抗原」定義為任一能夠誘發免疫反應之物質。

如本文中所使用，術語「抗原特異性」係指特定抗原或抗原片段之供應產生特異性細胞增殖之細胞群體之性質。

本文所用之術語「表現CD20之癌症」係指癌細胞展示表現CD20抗原之所有癌症。較佳地，本文所用之表現CD20之癌症係指淋巴瘤(較佳為B-細胞非何傑金氏淋巴瘤(NHL))及淋巴細胞白血病。該等淋巴瘤及淋巴細胞白血病包含(例如) a)濾泡性淋巴瘤；b)小無裂細胞淋巴瘤/伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma) (包含地方性伯基特氏淋巴瘤、偶發性伯基特氏淋巴瘤及非伯基特氏淋巴瘤)；c)邊緣區淋巴瘤(包含結節外邊緣區B細胞淋巴瘤(黏膜相關淋巴樣組織淋巴瘤，MALT)、結節邊緣區B細胞淋巴瘤及脾臟邊緣區淋巴瘤)；d)外套細胞淋巴瘤(MCL)；e)大細胞淋巴瘤(包含B-細胞瀰漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、瀰漫性混合細胞淋巴瘤、免疫母細胞性淋巴瘤、原發性縱隔B細胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤-肺B-細胞淋巴瘤)；f)多毛細胞白血病；g)淋巴細胞淋巴瘤、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症；h)急性淋巴

細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)/小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、B-細胞前淋巴細胞白血病；i)漿細胞腫瘤、漿細胞性骨髓瘤、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤；j)何傑金氏病(Hodgkin's disease)。該表現CD20之癌症更佳係B-細胞非何傑金氏淋巴瘤(NHL)。表現CD20之癌症尤其係外套細胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、B-細胞瀰漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特氏淋巴瘤、多毛細胞白血病、濾泡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、邊緣區淋巴瘤、移植後淋巴增生性病變(PTLD)、HIV伴發性淋巴瘤、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症或原發性CNS淋巴瘤。

如本文中所使用，「治療」係指試圖改變所治療個體或細胞之自然過程之臨床介入，且可用於預防或在臨床病理學過程期間實施。治療之期望效應包含防止疾病發生或復發、緩解症狀、減少疾病之任何直接或間接病理結果、防止或降低發炎及/或組織/器官損害、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病狀態及緩解或改良預後。在一些實施例中，使用本發明抗體來延遲疾病或病症之發生。

「個體(individual或subject)」係脊椎動物。在某些實施例中，脊椎動物係哺乳動物。哺乳動物包含(但不限於)農場動物(例如牛)、運動動物、寵物(例如貓、狗及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，脊椎動物係人類。

用於治療目的之「哺乳動物」係指任何歸類為哺乳動物之動物，包含人類、家畜及農場動物，以及動物園動物、運動動物或寵物(例如狗、馬、貓、牛等)。在某些實施例中，哺乳動物係人類。

「有效量」係指在所需劑量及時間段內有效達成期望治療或預防結果之量。

本發明之物質/分子之「治療有效量」可根據諸如以下因素而變化：個體之疾病狀態、年齡、性別及體重，以及物質/分子於該個體

內引發期望反應之能力。治療有效量亦為物質/分子之治療有益效應勝過其任何毒性或有害效應的量。「預防有效量」係指在所需劑量及時間段有效達成期望預防結果之量。通常(但未必)，因預防劑量係在患病之前或患病早期用於個體中，故預防有效量會小於治療有效量。

本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包含放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素)；化學治療劑(例如胺甲蝶呤(methotrexate)、阿黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他嵌入劑)；酶及其片段，例如溶核酶；抗生素；及毒素，例如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶活性毒素，包含其片段及/或變體；及下文所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒性劑闡述於下文中。殺腫瘤劑引起腫瘤細胞破壞。

「化學治療劑」係可用於治療癌症之化學化合物。化學治療劑之實例包含烷基化劑，例如噻替哌(thiotepa)及CYTOXAN®(環磷醯胺(cyclophosphamide))；磺酸烷基酯，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮雜環丙烷，例如苯得哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米得哌(meturedopa)及烏得哌(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基蜜胺，包含六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基嘧胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基嘧胺；多聚乙醯(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol)、MARINOL®)； β -拉帕醌(lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼

(colchicine)；樺木酸；喜樹鹼(camptothecin) (包含合成類似物托泊替康(topotecan) (HYCAMTIN®)、CPT-11 (伊立替康(irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼(acetylcamptothecin)、莨菪素及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(bryostatin)；卡利司他汀(callystatin)；CC-1065 (包含其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸；替尼泊苷(teniposide)；念珠藻素(cryptophycin) (尤其念珠藻素1及念珠藻素8)；多拉司他汀(dolastatin)；多卡米星(duocarmycin) (包含合成類似物 KW-2189 及 CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥，例如苯丁酸氮芥、蔡氮芥(chlomaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、鹽酸氧氮芥、美法侖、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥膽甾醇酯(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，例如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω II (例如參見Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達內黴素(dynemicin)，包含達內黴素A；埃斯波黴素(esperamicin)；以及新製癌菌素髮色團(neocarzinostatin chromophore)及有關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、安麴黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素c(cactinomycin)、卡拉比星(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、更生黴素

(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺基、ADRIAMYCIN®多柔比星(包含嗎啉基-多柔比星、氰基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星及去氧阿黴素)、泛艾黴素(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(例如絲裂黴素C)、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、波弗黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他汀(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝劑，例如胺甲蝶呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，例如二甲葉酸(denopterin)、胺甲蝶呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，例如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-阿紮尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，例如卡普甾酮(calusterone)、丙酸甲雄烷酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺劑，例如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，例如亞葉酸；醋葡醛內酯；醛磷醯胺糖苷；胺基酮戊酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯特布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；依氟鳥胺酸(elfornithine)；依利乙銨(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多醣；氯尼達明

(lonidamine)；類美坦辛(maytansinoids)，例如美坦辛(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；美得眠(mopidanmol)；硝基胺；噴司他汀(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西佐喃(sizofuran)；鍺螺胺(spirogermanium)；替奴佐酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(trichothecene) (尤其T-2毒素、疣孢菌素A (verrucurin A)、桿孢菌素A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine) (ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加賽特辛(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside) (「Ara-C」)；噻替哌(thiotepa)；類紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel) (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、太平洋紫杉醇之無克列莫佛(Cremophor)、經白蛋白改造之奈米顆粒調配物(ABRAXANE™) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)及多西紫杉醇(doxetaxel) (TAXOTERE®) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥；吉西他濱(gemcitabine) (GEMZAR®)；6-硫鳥嘌呤；巯嘌呤；胺甲蝶呤；鉑類似物，例如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春鹼(VELBAN®)；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼(ONCOVIN®)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；醛氫葉酸；長春瑞濱(vinorelbine) (NAVELBINE®)；諾肖林(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素(daunomycin)；胺基蝶呤(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸

(DMFO)；類視色素，例如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)(XELODA®)；上述藥劑中任一者之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述藥劑中之兩者或更多者之組合，例如環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及潑尼松龍(prednisolone)之組合療法之縮寫CHOP及利用與5-FU及醛氫葉酸組合之奧沙利鉑(ELOXATIN™)之治療方案的縮寫FOLFOX。

如本文中所使用，「治療」係指試圖改變所治療個體或細胞之自然過程之臨床介入，且可用於預防或在臨床病理學過程期間實施。治療之期望效應包含防止疾病發生或復發、緩解症狀、減少疾病之任何直接或間接病理結果、防止或降低發炎及/或組織及/或器官損害、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病狀態及緩解或改良預後。在一些實施例中，使用本發明抗體來延遲疾病或病症之發生。

「個體(individual或subject)」係脊椎動物。在某些實施例中，脊椎動物係哺乳動物。哺乳動物包含(但不限於)農場動物(例如牛)、運動動物、寵物(例如貓、狗及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，脊椎動物係人類。

用於治療目的之「哺乳動物」係指任何歸類為哺乳動物之動物，包含人類、家畜及農場動物，以及動物園動物、運動動物或寵物(例如狗、馬、貓、牛等)。在某些實施例中，哺乳動物係人類。

「有效量」係指在所需劑量及時間段內有效達成期望治療或預防結果之量。

本發明之物質/分子之「治療有效量」可根據諸如以下因素而變化：個體之疾病狀態、年齡、性別及體重，以及物質/分子於該個體內引發期望反應之能力。治療有效量亦為物質/分子之治療有益效應勝過其任何毒性或有害效應的量。「預防有效量」係指在所需劑量及時間段內有效達成期望預防結果之量。通常(但未必)，因預防劑量係

在患病之前或患病早期用於個體中，故預防有效量會小於治療有效量。

本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包含放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及 Lu 之放射性同位素)；化學治療劑(例如胺甲蝶呤、阿黴素、長春花生物鹼(長春新鹼、長春鹼、依託泊苷)、多柔比星、美法侖、絲裂黴素C、苯丁酸氮芥、道諾黴素或其他嵌入劑)；酶及其片段，例如溶核酶；抗生素；及毒素，例如來自細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶活性毒素，包含其片段及/或變體；及下文所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒性劑闡述於下文中。殺腫瘤劑引起腫瘤細胞破壞。

「治療(treating或treatment)」或「緩解」係指治療性治療及預防性(prophylactic或preventative)措施；其中目標係預防或減緩(減弱)靶定病理學病狀或病症。彼等需要治療者包含彼等已患有病症者以及彼等易於患有病症者或彼等擬預防病症者。若在接受治療量之本發明方法之抗體之後，患者展示下列情形中之一或多者之可觀察及/或可量測減小或不存在，則個體或哺乳動物成功「治療」感染：減小感染細胞數量或不存在感染細胞；減小總感染細胞之百分比；及/或減輕(至一定程度)一或多種與特定感染有關之症狀；減小發病率及死亡率；及改良生活品質問題。用於評估疾病之成功治療及改良之上述參數可易於藉由醫師熟知之常規程序量測。

術語「治療有效量」係指有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症之抗體或藥物之量。參見「治療」之先前定義。

與一或多種其他治療劑「組合」投與包含以任一順序同時(並行)及連續投與。

本文所用之「載劑」包含在所用劑量及濃度下對所暴露細胞或哺乳動物無毒之醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。通常，生理學上可接受之載劑係pH緩衝水溶液。生理學上可接受之載劑的實例包含緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包含抗壞血酸，低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露醣或糊精；螯合劑，例如EDTA；醣醇，例如甘露醣醇或山梨醣醇；形成鹽之抗衡離子，例如鈉；及/或非離子型表面活性劑，例如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)及PLURONICS™。

醣抗體

自培養物中之哺乳動物細胞所產生重組蛋白之醣基化係確保有效使用治療抗體之重要過程(Goochee等人，1991；Jenkins及Curling, 1994)。哺乳動物細胞培養遞送並不皆具有相同性質之醣基化模式之異質混合物。該等醣基化模式可影響諸如治療性蛋白質之安全性、功效及血清半衰期等性質。已藉由研發新穎種類之單株抗體(稱為「醣抗體」)來成功解決醣型異質性問題。

醣抗體可自市售或研發中之單株抗體(較佳地治療性單株抗體)生成。用於治療性應用之單株抗體可為人類化、人類或嵌合單株抗體。用於治療應用之經批准單株抗體之實例包含但不限於莫羅單抗(Muromomab)、阿昔單抗(Abciximab)、利妥昔單抗、達克珠單抗(Daclizumab)、巴利昔單抗(Basiliximab)、帕利珠單抗(Palivizumab)、英夫利昔單抗(Infliximab)、曲妥珠單抗(Trastuzumab)、依那西普(Etanercept)、吉姆單抗(Gemtuzumab)、阿來組單抗(Alemtuzumab)、伊布莫單抗(Ibritomomab)、阿達木單抗(Adalimumab)、阿來塞普

(Alefacept)、奧馬珠單抗(Omalizumab)、依法珠單抗(Efalizumab)、西妥昔單抗(Cetuximab)、貝伐珠單抗(Bevacizumab)、那他珠單抗(Natalizumab)、蘭尼單抗(Ranibizumab)、帕尼單抗(Panitumumab)、艾庫珠單抗(Eculizumab)及賽妥珠單抗(Certolizumab)。

本文闡述藉由Fc醣改造衍生自治療性單株抗體之功能活性醣抗體。具有最佳化醣型之醣抗體展現強於治療性單株抗體之生物活性。具有最佳化醣型之醣抗體預計可提供用於治療性應用之替代方式。

抗CD20醣抗體(抗CD20 GAb)

「CD20」抗原係分子量大約為35 kD之非醣基化跨膜磷蛋白，其發現於來自周邊血或淋巴樣器官之大於90%之B細胞之表面上。CD20表現於早期前B細胞發育期間且保留至血漿細胞分化；其並未發現於人類幹細胞、淋巴樣祖細胞或正常血漿細胞上。CD20存在於正常B細胞以及惡性B細胞上。文獻中之用於CD20之其他名稱包含「B-淋巴球限制分化抗原」及「Bp35」。CD20抗原闡述於(例如) Clark及Ledbetter, *Adv. Can Res.* 52:81-149 (1989)及Valentine等人, *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989)中。

本揭示內容描述新穎種類之抗CD20抗體，稱為「抗CD20醣抗體」(「抗CD20 GAb」)。抗CD20醣抗體可自抗CD20單株抗體由Fc醣改造生成。構成均質群體之個別抗CD20醣抗體相同且含有具有充分定義之聚醣結構及序列之相同Fc聚醣。本發明之抗CD20 GAb特異性結合細胞膜上人類CD20抗原之相同表位作為其親代抗體。

本文所用之術語「親代抗體」係指用於產生抗CD20醣抗體之抗CD20單株抗體。

親代抗體可藉由細胞培養(例如哺乳動物細胞培養、嗜甲醇酵母菌或昆蟲細胞系)獲得。較佳地，親代抗體係在哺乳動物細胞培養物中產生。親代抗體可為FDA批准或正處於研發中。實例性親代抗體包

含但不限於利妥昔單抗、奧法木單抗、托西莫單抗、歐力珠單抗 (Ocrelizumab)、11B8或7D8 (揭示於W02004/035607中)、揭示於WO 2005/103081中之抗CD20抗體(例如C6)、揭示於W02003/68821中之抗CD抗體(例如IMMU-106 (來自Immunomedics))、揭示於W02004/103404中之抗CD20抗體(例如AME-133 (來自Applied Molecular Evolution/Lilly))及揭示於US 2003/0118592中之抗CD20抗體(例如TRU-015 (來自Trubion Pharmaceuticals公司))、90Y標記之2B8鼠類抗體(指定為「Y2B8」, ZEVALIN®) (Biogen-Idec公司) (例如Anderson等人之美國專利第5,736,137號; ATCC寄存號: HB11388); 鼠類及嵌合2H7抗體(例如Robinson等人之美國專利第5,677,180號); 人類化2H7抗體(例如rhuMAb2H7及其他形式(Genentech公司)) (例如Adams等人之WO 2004/056312及下文所述之其他參考文獻); 針對CD20之人類單株抗體(GenMab A/S/Medarex公司) (例如Teeling等人之WO 2004/035607及WO 2005/103081); 結合CD20之細胞外表位之嵌合或人類化單株抗體(Biomedics公司) (例如Numazaki等人之WO 2006/106959); 人類化LL2及類似抗體(Immunomedics公司) (例如Hansen之美國專利第7,151,164號及US 2005/0106108); A20抗體(Immunomedics公司), 例如嵌合A20 (cA20)或人類化A20抗體(hA20, IMMUN-106T, 維妥珠單抗(veltuzumab)) (例如Hansen等人之US 2003/0219433); 針對CD20之全人類抗體(Amgen/AstraZeneca) (例如Gazit等人之WO 2006/130458); 針對CD20之抗體(Avestha Gengraine Technologies Pvt有限公司) (例如Morawala之WO 2006/126069); 及CD20之嵌合或人類化B-Ly1抗體(Roche/GlycArt Biotechnology AG), 例如GA101 (例如WO 2005/044859; US 2005/0123546; US 2004/0072290; 及Umana等人之US 2003/0175884)。

在一些實施例中, 本文所闡述之實例性抗CD20 GAb包括具有

SEQ ID NO: 1中所陳述胺基酸序列之重鏈及具有SEQ ID NO: 2中所陳述胺基酸序列之輕鏈。在一較佳實施例中，抗CD20 GAb包括利妥昔單抗之輕鏈序列及重鏈序列。

下表1展示利妥昔單抗之重鏈及輕鏈序列

表1
利妥昔單抗 登錄編號：DB00073 來源： http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073
>利妥昔單抗重鏈 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGA IYPGNGDTSY NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNW GAGTTVTVS AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID:2) >利妥昔單抗輕鏈 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYFQQKPGSSPKPWIYATSNLA SGVPVR FSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPS

DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID:1)

在一些實施例中，N-聚醣連接至Fc區之Asn-297。

本發明之N-聚醣具有 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 之共有五醣核心，其亦稱為「三甘露醣核心」或「五醣核心」，其中「Man」係指甘露醣，「Glc」係指葡萄糖，「NAc」係指N-乙醯基，且 GlcNAc 係指N-乙醯基葡萄糖胺。

在一些實施例中，N-聚醣具有二分枝結構。

本文所闡述之N-聚醣可具有鏈內取代，包括「二等分」 GlcNAc 。在聚醣於三甘露醣核心上包括二等分 GlcNAc 時，該結構表示為 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$ 。在聚醣包括連接至三甘露醣核心之核心岩藻醣時，該結構表示為 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{F})$ 。N-聚醣可包括一或多種末端唾液酸(例如N-乙醯基神經胺酸)。表示為「Sia」之結構係指末端唾液酸。唾液酸化可發生於二分枝結構之 $\alpha 1-3$ 或 $\alpha 1-6$ 臂上。

在一些實施例中，本文所闡述之N-聚醣包括至少一個 $\alpha 2-6$ 末端唾液酸。在某些實施例中，N-聚醣包括一個 $\alpha 2-6$ 末端唾液酸。在一較佳實施例中，N-聚醣包括兩個 $\alpha 2-6$ 末端唾液酸。

在一些實施例中，本文所闡述之N-聚醣包括至少一個 $\alpha 2-3$ 末端唾液酸。在某些實施例中，N-聚醣包括一個 $\alpha 2-3$ 末端唾液酸。在一較佳實施例中，N-聚醣包括兩個 $\alpha 2-3$ 末端唾液酸。

在一些實施例中，本文所闡述之N-聚醣包括至少一種半乳糖。在某些實施例中，N-聚醣包括一種半乳糖。在一較佳實施例中，N-聚醣包括兩種半乳糖。

抗CD20單株抗體(「親代抗體」)由Fc醣改造產生。較佳地，單株抗體係治療性單株抗體。Fc醣改造可以酶方式或以化學酶方式實施。在一較佳實施例中，親代抗體係利妥昔單抗。

本發明醣抗體中之N-聚醣較佳地經去岩藻醣基化。

N-聚醣之去岩藻醣基化係去除Fc結構域之N-聚醣中之核心岩藻醣的過程。可以酶方式採用去岩藻醣基化。因N-聚醣埋入兩個Fc結構域之間，酶去岩藻醣基化效率因空間阻礙(亦即，岩藻醣苷酶至岩藻醣殘基之接近由Fc結構域之位置阻斷)而極低。

業內已知許多 α -岩藻醣苷酶。實例包含來自角蝟螺(*Turbo cornutus*)、白法螺(*Charonia lampas*)、類炭疽桿菌(*Bacillus fulminans*)、黑麴黴(*Aspergillus niger*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、牛腎(Glyko)、雞肝之 α -岩藻醣苷酶(Tyagarajan等人，1996, *Glycobiology* 6:83-93)及來自木薯單孢萎蔫病(*Xanthomonas manihotis*)之 α -岩藻醣苷酶II (Glyko, PROzyme)。許多種類之岩藻醣苷酶亦市面有售(尤其係Glyko, Novato, Calif.; PROzyme, San Leandro, Calif.; Calbiochem-Novabiochem公司，San Diego, Calif.)。然而，已知並無 α -岩藻醣苷酶自N-連接聚醣有效去除核心岩藻醣。

WO 2013/12066揭示藉由來自牛腎之 α -岩藻醣苷酶對(Fucal ,6)GlcNAc-利妥昔單抗實施去岩藻醣基化。如WO 2013/12066中所闡述，將(Fuc al, 6)GlcNAc-利妥昔單抗之反應混合物與來自牛腎之 α -岩藻醣苷酶(自Prozyme購得)在37℃下一起培育20天以完全去除(Fucal ,6)GlcNAc-利妥昔單抗中之岩藻醣。

已報導免疫球蛋白之熱不穩定性(Vermeer等人，*Biophys J.* Jan 78: 394-404 (2000))。Fab片段對熱處理最敏感，而Fc片段對降低之pH最敏感。為檢驗抗體之熱穩定性及功能活性，實施與WO 2013/12066中所闡述相同之實驗，且發現在37℃下熱處理3天之後抗體損失對

CD20之約10%之結合親和力。另外,發現在37℃下熱處理7天之後,抗體損失對CD20之約20%之結合親和力。預計在延長熱處理(例如在37℃下20天)之後,抗體顯著損失對CD20之結合親和力,如WO 2013/12066中所闡述。

在試圖合成具有改良治療價值之醣抗體時,意外發現能夠自N-連接聚醣有效去除岩藻醣殘基之脆弱類桿菌(*Bacteroides fragilis*) α -岩藻醣苷酶(GenBank登錄編號: YP_212855.1)。已使用特異性酶成功達成有效去岩藻醣基化。重要的是,已藉由使用產生N-聚醣之簡易去岩藻醣基化之特異性 α -岩藻醣苷酶來有益地改良製備本發明醣抗體之效率,如圖1中所圖解說明。

因此,本發明提供 α -岩藻醣苷酶之組合物及使用 α -岩藻醣苷酶去除N-聚醣之核心岩藻醣之改良方法。 α -岩藻醣苷酶包括胺基酸序列與SEQ ID NO: 5之序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%一致性之多肽或其變體。去岩藻醣基化之改良方法包括使抗體與 α -岩藻醣苷酶接觸,且其中 α -岩藻醣苷酶包括胺基酸序列與SEQ ID NO: 5之序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%一致性之多肽、變體或其片段。

本文所闡述者包含製備抗CD20醣抗體之改良方法,該方法包括以下步驟:(a)使抗CD20單株抗體與 α -岩藻醣苷酶及至少一種醣苷內切酶接觸,由此得到具有單一N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)之去岩藻醣基化抗體,及(b)在適宜條件下向GlcNAc中添加碳水化合物部分。

在一些實施例中,本發明方法之抗CD20單株抗體係利妥昔單抗。

使用醣苷內切酶修剪N-聚醣中之寡醣之可變部分。本文所用之醣苷內切酶之實例包含但不限於EndoA、EndoF、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH、EndoM、EndoS、EndoS2及其變體。

本發明方法之 α -岩藻醣苷酶包括胺基酸序列與SEQ ID NO: 5之序列具有至少85%一致性之多肽、其功能變體。

在一些實施例中， α -岩藻醣苷酶包括胺基酸序列與SEQ ID NO: 5之序列具有至少90%或95%一致性之多肽、其變體或片段。

在某些實施例中， α -岩藻醣苷酶係重組類桿菌 α -岩藻醣苷酶。

表5
QQKYQPTEANLKARSEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWT MTNNNLNYKEYAKLAGGFYPSKFDADKWVAAIKASGAKYICFTTRHHEG FSMFDTKYSDY NIVKATPFKRDVVKELADACAKHGIKLHFYYSHIDWYREDAPQGRTGRRT GRPNPKGDWK SYYQFMNNQLTELLTNYGPIGAIWFDGWWDQDINPDFDWELPEQYALIHR LQPACLVGNN HHQTPFAGEDIQIFERDLPGENTAGLSGQSVSHLPLETCETMNGMWGYKIT DQNYKSTKT LIHYLVKAAGKDANLLMNIGPQPDGELPEVAVQRLKEVGEWMSKYGETIY GTRGGLVAPH DWGVTTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPIVDKKVKKAVVFADKTPVRFTK NKEGIVLELAK VPTDVDYVVELTID (SEQ ID: 5)

本發明方法中之步驟(a)得到具有單一N-乙醯基葡醣胺(GlcNAc)之去岩藻醣基化抗體。隨後使用轉醣苷酶實施酶調介醣基化以向GlcNAc中添加指定碳水化合物部分且延長醣鏈。可由此產生醣抗體之均質群體。如本文所闡述之轉醣苷酶之實例包含但不限於EndoA、EndoF、EndoF1、EndoF2、Endo F3、EndoH、EndoM、EndoS、EndoS2及其變體。

在一些實施例中，本發明方法之碳水化合物部分係選自由以下

組成之群： $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 及 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 。

在較佳實施例中，碳水化合物部分係選自由以下組成之群：

$\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 及 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 。

Sia(α 2-6)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α 2-3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α 2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α 2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂及Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂。

本發明方法中之步驟(b)引起醣鏈延伸。醣鏈延伸之一種方法係經由酶催化醣基化反應。業內眾所周知，使用醣噁唑啉作為酶催化醣基化反應中之醣供體進行醣基化可用於合成寡醣，此乃因醣基化反應係加成反應且其進行並不伴隨酸、水或諸如此類之任何消除。(Fujita 等人，*Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1528, 9-14)

在一些實施例中，碳水化合物部分係醣噁唑啉。

適宜條件亦包含將反應混合物培育至少20分鐘、30分鐘、40分鐘、50分鐘、60分鐘、70分鐘、80分鐘、90分鐘或100分鐘、較佳地小於60分鐘。培育較佳地發生於室溫下、更佳地在大約20℃、25℃、30℃、35℃、40℃或45℃下及最佳地在大約37℃下。

應理解，本發明之 α -岩藻醣苷酶之多肽可進行衍生或改質以有助於其分離或純化。因此，在本發明之一實施例中，藉由添加能夠直接及特異性結合分離構件之配體來衍生或改質用於本發明之多肽。另一選擇為，藉由添加結合對之一個成員來衍生或改質多肽且分離構件包括藉由添加結合對之另一成員來衍生或改質之試劑。可使用任何適宜結合對。在藉由添加結合對之一個成員來衍生或改質用於本發明之多肽之一較佳實施例中，多肽較佳地加組胺酸標籤或加生物素標籤。通常，在基因層面上包含組胺酸或生物素標籤之胺基酸編碼序列且蛋白質重組表現於大腸桿菌(*E. coli.*)中。組胺酸或生物素標籤通常存在於多肽之一端(在N-末端或C-末端處)。組胺酸標籤通常係由6個組胺酸殘基組成，但其可長於此長度(通常長達7、8、9、10或20個胺基酸)或較短(例如5、4、3、2或1個胺基酸)。另外，組胺酸標籤可含有一

或多種胺基酸取代、較佳地如上文所定義之保守取代。

如本文所闡述之變體多肽係彼等胺基酸序列自SEQ ID NO: 5中之胺基酸序列有所變化者，但與包括具有SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之多肽之酶展現相同或類似功能。

如本文中所使用，關於序列之序列一致性百分比(%)定義為在比對序列且引入間隙(若需要)以達成最大百分比序列之後，候選多肽序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基相同之胺基酸殘基之一致性百分比。出於確定序列一致性百分比之目的，比對可以熟習此項技術者所熟知之多種方式來達成，例如使用可公開獲得之電腦軟體，例如BLAST、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。彼等熟習此項技術者可測定用於量測比對之適當參數，包含在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需要之任何演算法。

本發明之一些較佳實施例顯示於實例中。

用於人類化非人類抗體之方法為業內所熟知。通常，人類化抗體具有自非人類來源引入至其中之一或多個胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基經常稱為「引入」殘基，其通常取自「引入」可變結構域。基本上可遵循 Winter 及合作者之方法(Jones 等人，Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等人，Science, 239:1534-1536(1988))藉由用齧齒類動物之CDR序列取代人類抗體之對應序列來實施人類化。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)，其中實質上少於一個完好人類可變結構域已由來自非人類物種之對應序列所取代。實際上，人類化抗體通常為人類抗體，其中一些CDR殘基及可能一些FR殘基由來自齧齒類動物抗體中類似位點之殘基所取代。

擬用於製備人類化抗體之人類可變結構域(輕及重)之選擇對於減小抗原性極為重要。根據所謂的「最佳擬合」方法，針對已知人類可

變結構域序列之整個文庫來篩選齧齒類動物抗體之可變結構域之序列。然後將最接近齧齒類動物之人類序列視為用於人類化抗體之人類框架(FR) (Sims等人, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia等人, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一方法使用衍生自輕鏈或重鏈之特定子組之所有人類抗體之共有序列的特定框架。相同框架可用於若干不同人類化抗體 (Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

另外重要的是，人類化抗體應保留對抗原之高親和力及其他有利之生物性質。為達成此目標，根據較佳方法可藉由使用親代與人類化序列之三維模型分析親代序列及各種概念性人類化產物之方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常係市面有售且為彼等熟習此項技術者所熟知。可使用電腦程式，該等電腦程式可闡釋並顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能的三維構型結構。藉由觀察該等顯示內容可分析殘基在候選免疫球蛋白序列功能行使中之可能作用，亦即分析可影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自接受者序列及引入序列中選擇FR殘基併合併以達成期望抗體特性，例如對靶抗原之親和力增加。一般而言，CDR殘基直接且最為實質性地參與影響抗原結合。

另一選擇為，目前可產生轉基因動物(例如小鼠)，該等轉基因動物在免疫後能夠在不產生內源性免疫球蛋白之情況下產生完整人類抗體譜。舉例而言，已闡述在嵌合及種系突變體小鼠中抗體重鏈接合區(JH)基因之純合缺失導致內源性抗體產生之完全抑制。將人類種系免疫球蛋白基因陣列轉入該等種系突變體小鼠中可在受到抗原攻擊後引起人類抗體的產生。例如參見Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等人, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann等人, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)。人類抗體亦可衍生

自噬菌體展示文庫(Hoogenboom等人，J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks等人，J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))。

醫藥調配物

包括本發明抗體之治療調配物係藉由混合具有期望純度之該抗體與生理上可接受之可選載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A.編輯(1980))以水溶液、凍乾或其他乾燥調配物形式製得以用於儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包含緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其他有機酸；抗氧化劑，包含抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；氯苄烷銨；氯化苯銨松寧(benzethonium chloride)；苯酚；丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烷基吡咯啉酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露醣或糊精；螯合劑，例如EDTA；醣，例如蔗糖、甘露醣醇、海藻醣或山梨醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文調配物亦可視需要含有一種以上用於所治療特定適應症之活性化合物，包含但不限於彼等具有相互間不會產生不利影響之補充活性者。該等分子適於以對預定目的有效之量以組合形式存在。

活性成份亦可分別裝入藉由(例如)凝聚技術或藉由界面聚合製得之微膠囊(例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中、膠質藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、

奈米顆粒及奈米膠囊)或粗滴乳液中。該等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A.編輯(1980)中。

用於活體內投與之調配物必須無菌。此易於藉由過濾經由無菌過濾膜達成。

可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適宜實例包含含有本發明免疫球蛋白之固體疏水性聚合物之半滲透性基質，該等基質呈成型物件形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放型基質之實例包含聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ -乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)構成之可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸等聚合物使得能夠釋放分子100天以上，但某些水凝膠釋放蛋白質較短時間段。在經囊封免疫球蛋白長時間保留於身體中時，其可因在37°C下暴露於水分而發生變性或聚集，從而使得損失生物活性且可能改變免疫原性。端視所涉及機制，可設計合理策略以達成穩定化。舉例而言，若發現聚集機制係經由硫代二硫化物互換形成分子間S-S鍵，則穩定化可藉由改質巰基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加劑及產生特定聚合物基質組合物來達成。

考慮期望劑量體積、投與模式等來確定預凍乾調配物中之抗體量。在所選蛋白質係完整抗體(全長抗體)之情形下，約2 mg/mL至約50 mg/mL、較佳地約5 mg/mL至約40 mg/mL及最佳地約20-30 mg/mL係實例性起始蛋白質濃度。蛋白質通常存在於溶液中。舉例而言，蛋白質可存在於pH為約4-8及較佳地約5-7之pH緩衝溶液中。實例性緩衝劑包含組胺酸、磷酸鹽、Tris、檸檬酸鹽、琥珀酸鹽及其他有機酸。

緩衝劑濃度可為約1 mM至約20 mM或約3 mM至約15 mM，此端視(例如)緩衝劑及調配物(例如復原調配物)之期望等滲性而定。較佳緩衝劑係組胺酸，其中如下文所顯示此可具有凍乾保護性質。經證實，琥珀酸鹽為另一有用緩衝劑。

將凍乾保護劑添加至預凍乾調配物中。在較佳實施例中，凍乾保護劑係非還原醣，例如蔗糖或海藻醣。預凍乾調配物中凍乾保護劑之量通常應使得在復原後所得調配物等滲。然而，高滲復原調配物亦可適宜。此外，凍乾保護劑之量不應過低而使蛋白質在凍乾後發生不可接受之程度的降解/聚集。在凍乾保護劑係醣(例如蔗糖或海藻醣)且蛋白質係抗體之情形下，預凍乾調配物中之實例性凍乾保護劑濃度為約10 mM至約400 mM及較佳地約30 mM至約300 mM及最佳地約50 mM至約100 mM。

選擇用於每一蛋白質及凍乾保護劑之蛋白質對凍乾保護劑之組合比率。在使用抗體作為所選蛋白質且使用醣(例如蔗糖或海藻醣)作為凍乾保護劑以用於生成具有高蛋白質濃度之等滲復原調配物之情形下，凍乾保護劑對抗體之莫耳比率可為約100莫耳至約1500莫耳凍乾保護劑對1莫耳抗體及較佳地約200莫耳至約1000莫耳凍乾保護劑對1莫耳抗體、例如約200莫耳至約600莫耳凍乾保護劑對1莫耳抗體。

在本發明之較佳實施例中，已發現期望將表面活性劑添加至預凍乾調配物中。另一選擇為，或此外，可將表面活性劑添加至凍乾調配物及/或復原調配物中。實例性表面活性劑包含非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188)；曲拉通(Triton)；十二烷基硫酸鈉(SDS)；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基-、肉豆蔻基-、亞麻油基-或硬脂醯基-磺基甜菜鹼；月桂基-、肉豆蔻基-、亞麻油基-或硬脂醯基-肌胺酸；亞麻油基-、肉豆蔻基-或鯨蠟基-甜菜鹼；月桂醯胺基丙基-、椰子醯

胺基丙基-、亞麻油醯胺基丙基-、肉豆蔻醯胺基丙基-、棕櫚油醯胺基丙基-或異硬脂醯胺基丙基-甜菜鹼(例如月桂醯胺基丙基)；肉豆蔻醯胺基丙基-、棕櫚油醯胺基丙基-或異硬脂醯胺基丙基-二甲胺；甲基椰油基牛黃酸鈉或甲基油基牛磺酸二鈉；及MONAQUAT系列(Mona Industries公司，Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇及乙二醇與丙二醇之共聚物(例如Pluronic、PF68等)。所添加表面活性劑之量應可減少復原蛋白質之聚集並使在復原後微粒之形成最小化。舉例而言，表面活性劑可以約0.001-0.5%及較佳地約0.005-0.05%之量存在於預凍乾調配物中。

在本發明之某些實施例中，在製備預凍乾調配物時使用凍乾保護劑(例如蔗糖或海藻醣)及增積劑(例如甘露醇或甘胺酸)之混合物。增積劑可使得產生均勻凍乾餅狀物且其中並無過量氣穴等。

其他醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(例如彼等闡述於Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編輯(1980)中者)可包含於預凍乾調配物(及/或凍乾調配物及/或復原調配物)中，前提係其不會不利地影響調配物之期望特性。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒且包含：額外緩衝劑；防腐劑；共溶劑；抗氧化劑，包含抗壞血酸及甲硫胺酸；螯合劑，例如EDTA；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；生物可降解聚合物，例如聚酯；及/或成鹽抗衡離子，例如鈉。

本文所闡述之醫藥組合物及調配物較佳地較為穩定。「穩定」調配物/組合物係以下物質：其中抗體在儲存後基本上保持其物理及化學穩定性及完整性。用於量測蛋白質穩定性之各種分析技術在業內可獲得且綜述於Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee編輯，Marcel Dekker公司，New York, N.Y., Pubs.(1991)及Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)中。可於所選時間段之所

選溫度下量測穩定性。

用於活體內投與之調配物必須無菌。此易於藉由過濾經由無菌過濾膜在凍乾及復原之前或之後達成。另一選擇為，舉例而言，可藉由在約120℃下對除蛋白質外之成份實施高壓滅菌約30分鐘來達成整個混合物之無菌性。

在將蛋白質、凍乾保護劑及其他可選組份混合至一起之後，將調配物凍乾。許多不同凍乾劑可用於此目的，例如Hull50® (Hull, USA)或GT20® (Leybold-Heraeus, Germany)凍乾劑。冷凍-乾燥係藉由冷凍調配物且隨後使來自冷凍內容物之冰在適於初級乾燥之溫度下昇華來達成。在此條件下，產物溫度低於調配物之共熔點或陷縮溫度。通常，在通常介於約50毫托至250毫托之間之適宜壓力下，用於初級乾燥之擱板溫度將介於約-30℃至25℃之間(前提係產物在初級乾燥期間保持冷凍)。容納試樣之容器(例如玻璃小瓶)之調配物、大小及類型以及液體體積主要取決於乾燥所需之時間，其可介於幾小時至數天(例如40-60 hr)之間。二級乾燥階段可在約0-40℃下實施，其主要取決於容器之類型及大小及所採用蛋白質之類型。然而，在本文中發現，二級乾燥步驟可能未必需要。舉例而言，凍乾之整個除水期中之擱板溫度可介於約15℃-30℃ (例如約20℃)之間。二級乾燥所需之時間及壓力將使得產生適宜凍乾餅狀物，此端視(例如)溫度及其他參數而定。二級乾燥時間取決於產物中之期望殘餘水分含量，且通常持續至少約5小時(例如10-15小時)。壓力可與初級乾燥步驟期間所採用之壓力相同。冷凍-乾燥條件可端視調配物及小瓶大小而變化。

在一些情況下，可期望在容器中凍乾蛋白質調配物，其中復原蛋白質以避免轉移步驟。此情況下之容器可為(例如) 3、5、10、20、50或100 cc小瓶。作為一般主張，凍乾將得到凍乾調配物，其中其水分含量小於約5%及較佳地小於約3%。

在期望階段、通常在向患者投與蛋白質時，可使用稀釋劑復原凍乾調配物，從而復原調配物中之蛋白質濃度為至少50 mg/mL、例如約50 mg/mL至約400 mg/mL、更佳地約80 mg/mL至約300 mg/mL及最佳地約90 mg/mL至約150 mg/mL。復原調配物中之該等高蛋白質濃度可視為尤其可用於預期皮下遞送復原調配物之情形。然而，對於其他投與途徑(例如靜脈內投與)而言，可能期望復原調配物中之蛋白質濃度較低(例如在復原調配物中約5-50 mg/mL或約10-40 mg/mL蛋白質)。在某些實施例中，復原調配物中之蛋白質濃度顯著高於預凍乾調配物。舉例而言，復原調配物中之蛋白質濃度可為預凍乾調配物之約2-40倍、較佳地3-10倍及最佳地3-6倍(例如至少三倍或至少四倍)。

復原通常係在約25℃之溫度進行以確保完全水合，儘管可視需要採用其他溫度。復原所需之時間將視例如稀釋劑之類型、賦形劑及蛋白質之量而定。稀釋劑實例包含無菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝鹽水)、無菌鹽水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。稀釋劑視情況含有防腐劑。防腐劑實例已在上文中闡述，芳族醇(諸如苧醇或酚醇)為較佳防腐劑。藉由評估不同防腐劑濃度與蛋白質及防腐劑功效測試之相容性來決定所採用防腐劑之量。舉例而言，若防腐劑係芳族醇(例如苧醇)，則其可以約0.1%-2.0%及較佳約0.5%-1.5%但最佳約1.0%-1.2%之量存在。較佳地，復原調配物具有小於6000個顆粒/小瓶，該等顆粒之大小>10 μm。

治療應用

本文所述之醣抗體可用於治療患有癌症之患者。治療方法包括向患者投與有效量之本文所述之醣抗體或醫藥組合物。癌症之實例包含(但不限於)B細胞淋巴瘤、NHL、前體B細胞淋巴母細胞白血病/淋巴瘤及成熟B細胞贅瘤、B細胞慢性淋巴細胞性白血病(CLL)/小淋巴

細胞性淋巴瘤(SLL)、B細胞前淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤(MCL)，濾泡性淋巴瘤(FL)、低度、中度及高度(FL)，皮膚濾泡中心淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、MALT型邊緣區B細胞淋巴瘤、結節邊緣區B細胞淋巴瘤、脾臟型邊緣區B細胞淋巴瘤、多毛細胞白血病、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、漿細胞瘤、漿細胞骨髓瘤、移植後淋巴增生性病變、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症及間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)。

在某些實施例中，癌症係B細胞淋巴瘤，例如非何傑金氏淋巴瘤。

另外，本文所闡述之醣抗體可用於治療患有自體免疫或發炎性疾病之患者。治療方法包括向患者投與有效量之本文所闡述之醣抗體或醫藥組合物。自體免疫或發炎性疾病之實例包含但不限於包含但不限於類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、韋格納氏病、發炎性腸疾病、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、自體免疫性血小板減少症、多發性硬化、牛皮癬、IgA腎病變、IgM多發性神經病變、重症肌無力、血管炎、糖尿病、雷諾氏症候群、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、胃炎、橋本氏甲狀腺炎、強直性脊柱炎、C型肝炎相關冷球蛋白血症性血管炎、慢性局灶性腦炎、大疱性類天皰瘡、血友病A、膜性增殖性腎小球腎炎、成人及幼年型皮肌炎、成人型多肌炎、慢性蕁麻疹、原發性膽汁性肝硬變、視神經脊髓炎、格雷夫氏甲狀腺機能障礙性疾病、大疱性類天皰瘡、膜性增殖性腎小球腎炎、丘-施二氏症候群、哮喘、牛皮癬性關節炎、皮炎、呼吸下窘迫症候群、腦膜炎、腦炎、葡萄膜炎、濕疹、動脈粥樣硬化、白血球黏附缺陷、幼年發病型糖尿病、萊特爾氏病、貝切特氏病、溶血性貧血、特應性皮炎、韋格納氏肉芽腫病、歐門氏症候群、慢性腎衰竭、急性感染性單核白血球增多

症、HIV及皰疹相關疾病、全身性硬化、薛格連氏症候群及腎小球腎炎、皮肌炎、ANCA、再生障礙性貧血、自體免疫溶血性貧血(AIHA)、因子VIII缺陷、血友病A、自體免疫嗜中性白血球減少症、卡斯爾曼氏症候群、古德巴斯德症候群、實體器官移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)、自體免疫肝炎、淋巴樣間質性肺炎(HIV)、閉塞性細支氣管炎(非移植)、格-巴二氏症候群、大血管血管炎、巨細胞(高安氏)動脈炎、中血管血管炎、川崎氏病及結節性多動脈炎。

在某些實施例中，自體免疫或發炎性疾病係類風濕性關節炎。

在該等治療方法中，抗CD20醣抗體可單獨或連同第二治療劑(例如第二抗體或化學治療劑或免疫抑制劑)投與。第二抗體可為結合CD20或不同B細胞抗原或NK或T細胞抗原者。

本發明抗體(及額外治療劑)可藉由任何適宜方式投與，包含非經腸、皮下、腹膜腔內、肺內及鼻內以及(若期望用於局部治療)病灶內投與。非經腸輸注包含肌內、靜脈內、動脈內、腹膜腔內或皮下投與。此外，適宜地，藉由脈衝輸注、尤其使用降低劑量之抗體來投與抗體。可藉由任一適宜途徑、例如藉由注射、例如靜脈內或皮下注射投藥，此部分取決於投與係短期投與抑或長期投與。

在抗體之製備及投與中可考慮本發明抗體之結合靶之位置。在結合靶係分子內分子時，本發明之某些實施例提供擬引入結合靶位於其中之細胞中之抗體或其抗原結合片段。

在另一實施例中，提供內在化抗體。抗體可擁有某些增進抗體至細胞之遞送之特性，或可經改質以擁有該等特性。業內已知用於達成此之技術。舉例而言，抗體之陽離子化已知會促進其至細胞之攝取(例如參見美國專利第6,703,019號)。亦可使用脂轉染或脂質體將抗體遞送至細胞中。在使用抗體片段之情形下，特異性結合至靶蛋白之結合結構域之最小抑制片段通常較為有利。舉例而言，基於抗體之可變

區序列，可設計保留結合靶蛋白序列之能力之肽分子。該等肽可以化學方式合成及/或藉由重組DNA技術產生。例如參見Marasco等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993)。

可藉由業內已知方法增進調變劑多肽至靶細胞之進入。舉例而言，某些序列(例如彼等衍生自HIV Tat或果蠅觸角基因同源結構域蛋白)能夠引導異源蛋白穿過細胞膜之有效攝取。例如參見Chen等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96:4325-4329。

在結合靶位於腦中時，本發明之某些實施例提供跨越血液-腦障壁之抗體或其抗原結合片段。某些神經退化性疾病與血液-腦障壁之滲透性增加，從而抗體或抗原結合片段可易於引入腦中。在血液-腦障壁保持完整時，存在若干使分子輸送穿過血液-腦障壁之業內已知方式，包含但不限於物理方法、基於脂質之方法及基於受體及通道之方法。

使抗體或抗原結合片段輸送穿過血液-腦障壁之物理方法包含但不限於完全規避血液-腦障壁或藉由在血液-腦障壁中產生開口。規避方法包含但不限於直接注射至腦中(例如參見Papanastassiou等人，*Gene Therapy* 9: 398-406 (2002))、間質輸注/對流增進之遞送(例如參見Bobo等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994))及將遞送裝置植入腦中(例如參見Gill等人，*Nature Med.* 9: 589-595 (2003)；及Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical)。在障壁中產生開口之方法包含但不限於超音波(例如參見美國專利公開案第2002/0038086號)、滲透壓(例如藉由投與高滲甘露醇(Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, 第1及2卷，Plenum Press, N.Y. (1989)))、藉由(例如)緩激肽或滲透劑A-7滲透化(例如參見美國專利第5,112,596號、第5,268,164號、第5,506,206號及第5,686,416號)及使用含有編碼抗體或抗原結合片段之基因之載體轉染

騎跨血液-腦障壁之神經元(例如參見美國專利公開案第2003/0083299號)。

使抗體或抗原結合片段輸送穿過血液-腦障壁之基於脂質之方法包含但不限於將抗體或抗原結合片段囊封於偶合至抗體結合片段(其結合至血液-腦障壁之血管內皮上之受體)之脂質體中(例如參見美國專利申請公開案第20020025313號)及使用低密度脂蛋白顆粒(例如參見美國專利申請公開案第20040204354號)或載脂蛋白E (例如參見美國專利申請公開案第20040131692號)塗覆抗體或抗原結合片段。

使抗體或抗原結合片段輸送穿過血液-腦障壁之基於受體及通道之方法包含但不限於使用甾皮質激素阻斷劑增加血液-腦障壁之滲透性(例如參見美國專利申請公開案第2002/0065259號、第2003/0162695號及第2005/0124533號)、活化鉀通道(例如參見美國專利申請公開案第2005/0089473號)、抑制ABC藥物轉運蛋白(例如參見美國專利申請公開案第2003/0073713號)、使用轉鐵蛋白塗覆抗體及調變一或多種轉鐵蛋白受體之活性(例如參見美國專利申請公開案第2003/0129186號)及對抗體實施陽離子化(例如參見美國專利第5,004,697號)。

以與良好醫學實踐一致之方式來調配、投用及投與本發明之抗體組合物。此背景下之考慮因素包含所治療特定病症、所治療特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症病因、藥劑之遞送位點、投與方法、投與時間表及醫護人員已知之其他因素。抗體無需但視情況與一或多種當前用於預防或治療所論述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量取決於調配物中所存在本發明抗體之量、病症或治療之類型及上文所論述之其他因素。該等藥劑通常係以相同劑量及使用如本文所闡述之投與途徑或約1%至99%之本文所闡述之劑量或以任一劑量及藉由任一在經驗上/臨床上確定為適當之途徑來使用。

為預防或治療疾病，本發明抗體之適當劑量(在單獨或與諸如化

學治療劑等其他藥劑組合使用時)將取決於以下因素：擬治療疾病之類型、抗體類型、疾病之嚴重程度及病程、投與抗體係用於預防性或治療性目的、先前療法、患者臨床史及抗體反應及主治醫師之判斷。將抗體適宜地一次性或經一系列治療投與患者。端視疾病之類型及嚴重程度，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)抗體可為投與患者之初始候選劑量，不論(例如)係藉由一或多個單獨投與抑或藉由連續輸注。端視上述因素，一種典型日劑量可介於約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或更高之間。對於經若干天或更長時間重複投與而言，端視病狀而定，治療通常持續至對疾病症狀之期望阻抑出現為止。抗體之一種實例性劑量介於約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 之間。因此，可向患者投與一或多個約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任一組合)之劑量。該等劑量可間歇性投與，例如每週或每三週(例如，應使得患者接受約二至約二十或(例如)約六個劑量之抗體)。可在開始時投與較高負荷劑量，隨後投與一或多個較低劑量。實例性投藥方案包括投與約4 mg/kg 抗體之初始負荷劑量，隨後投與約2 mg/kg 抗體之週維持劑量。然而，可使用其他劑量方案。此療法之進展可容易地藉由習用技術及分析來監測。

製品

在本發明另一態樣中，提供含有可用於治療、預防及/或診斷上述病症之材料的製品。該製品包括容器及位於該容器上或與該容器相連之標記或包裝插頁。適宜容器包含(例如)瓶、小瓶、注射器等。該等容器可自多種材料(例如玻璃或塑膠)形成。容器容納自身或在與另一組合物組合時有效治療、預防及/或診斷病狀之組合物，且可具有無菌存取通道(舉例而言，該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該組合物中至少一種活性劑係本發明抗體。標記或包裝插頁指示該組合物用於治療選定病狀。另外，該製品

可包括(a)含有組合物之第一容器，其中該組合物包括本發明抗體；及(b)含有組合物之第二容器，其中該組合物包括另一細胞毒性劑或治療劑。本發明此實施例中之製品可進一步包括指示組合物可用於治療特定病狀之包裝插頁。另一選擇為或另外，該製品可進一步包括第二(或第三)容器，該容器包括醫藥上可接受之緩衝劑，例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包含自商業及使用者角度來看期望之其他材料，包含其他緩衝劑、稀釋劑、濾膜、針及注射器。

抗CD20 GAb調配物及穩定性

需要調配包括適用於治療應用之抗體之剪切及溫度穩定性醫藥調配物。

在一實施例中，本發明係關於包括治療有效量之抗CD20抗體之抗CD20抗體調配物，其中該調配物進一步包括10 mM至100 mM乙酸鈉、25 mM至100 mM氯化鈉、0.5%至5%精胺酸游離鹼、0.02 mM至0.2 mM EDTA、0.01%至0.2%聚山梨醇酯80且調節至pH 5.0至7.0。

在另一實施例中，本發明係關於以20-300 mg/mL之濃度範圍包括抗CD20抗體之抗CD20抗體調配物，其中該調配物進一步包括50 mM乙酸鈉、51 mM氯化鈉、1%精胺酸游離鹼、0.05 mM EDTA、0.02%聚山梨醇酯80且調節至pH 5.5。

在一實施例中，本發明係關於包括治療有效量之醣抗體之抗CD20醣抗體調配物，其中該調配物進一步包括10 mM至100 mM乙酸鈉、25 mM至100 mM氯化鈉、0.5%至5%精胺酸游離鹼、0.02 mM至0.2 mM EDTA、0.01%至0.2%聚山梨醇酯80且調節至pH 5.0至7.0。

在一實施例中，本發明係關於之以20-300 mg/mL之濃度範圍包括醣抗體醣抗體調配物，其中該調配物進一步包括50 mM乙酸鈉、51 mM氯化鈉、1%精胺酸游離鹼、0.05 mM EDTA、0.02%聚山梨醇酯80

且調節至pH 5.5。

在又一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中調配物可穩定至少2年。在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中該調配物在高達至少55℃之溫度下較為穩定。在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中調配物在約5℃之溫度下可穩定至少2年。。在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中調配物在約25℃之溫度下可穩定至少3個月。在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中調配物在約40℃之溫度下可穩定至少1個月。在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中調配物在約55℃之溫度下可穩定至少1天。

在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中該抗體係以約20-300 mg/mL、50-300 mg/mL、100-300 mg/mL、150-300 mg/mL、200-300 mg/mL或250-300 mg/mL之量存在。

在另一實施例中，本發明係關於抗CD20抗體調配物，其中聚山梨醇酯80係以約0.02%、0.015%或0.025%之量存在。在其他實施例中，聚山梨醇酯80可以之量0.01-0.2%、0.01-0.15%、0.02-0.2%、0.02-0.15%、0.01-0.25%或0.01-0.05%存在。

本發明一或多個實施例之詳細內容陳述於下文說明書中。根據下列圖式及若干實施例之詳細說明亦及隨附申請專利範圍，本發明之其他特徵或優點將顯而易見。

本發明包含下列實例以證明本發明之較佳實施例。彼等熟習此項技術者應瞭解，下列實例中揭示之技術代表本發明者發現在實踐本發明中運行良好之技術，且因此可認為構成其實踐之較佳方式。然而，彼等熟習此項技術者借助於本揭示內容應瞭解，可對所揭示特定實施例作出多種改變且仍獲得相同或類似結果，此並不背離本發明之精神及範圍。

實例

實例1：用於分析抗CD20抗體之N-醯基化之一般程序

研發質譜方法以藉由施加至醯肽前體之碰撞誘導解離(CID)能量監測寡醯源片段離子(水合氫離子)之產率。水合氫離子之多反應監測(MRM)方法可達成對未來生物類似治療劑之常規品質控制分析之規章性要求。

將5 ug利妥昔單抗(購自Genentech)溶於25 ul 2M 胍-HCl中，且添加二硫蘇醯醇(DTT)至最終濃度為5 mM。在110℃培育10分鐘之後，將經還原半胱胺酸殘基在37℃下於10 mM 碘乙醯胺(IAA)中實施烷基化1小時。添加5 mM DTT以在室溫下淬滅過量IAA 10分鐘。將產物在50 mM碳酸氫銨中稀釋15次，然後使用旋轉管柱進行微量離心(10kDa蛋白質截留MW)。使用1: 25 (w/w)之酶:蛋白質比率在37℃下實施胰蛋白酶消化4小時。將試樣在-20℃下冷凍以用於LC-MS/MS分析。

儀器

藉由m/z 204水合氫離子(HexNAc)監測使用具有Aglient 1200 HPLC系統之4000 QTrap三相四極柱質譜儀(AB Sciex)實施醯肽量化。為相對量化醯肽微異質性，在電腦上獲得前體離子m/z，其涵蓋所有可能聚醯組合物，且監測每一前體離子之單一定量轉變(Q3 m/z=204)。

MS數據分析

使用Analyst 1.5 (AB Sciex)處理所獲取原始數據。將每一轉變之質量層析圖且藉由峰面積進行量化。針對所有組合組份之總和來計算每一組份之百分比組成。

N-聚醯組合物之分析揭示，在利妥昔單抗中存在50種以上醯型。結果展示，二分枝複合型聚醯係主要N-聚醯。大於90%之N-聚醯

經岩藻醣基化。

實例2：抗CD20 GAb之生成

抗CD20 GAb301

藉助PNGase F自利妥昔單抗(Rituxan)之Fc區完全去除Asn²⁹⁷處之N-連接聚醣，且使用4-12% Bis-Tris NeuPAGE及來自經改質及未改質IgG之胰蛋白酶醣肽之LC-MS/MS分析進行評估。胰蛋白酶醣肽之分子量有助於測定每一門冬醯胺酸處之N-連接醣基化之潛在位點且有助於闡明主要聚醣之物質。

抗CD20 GAb200

使用商業或自製異質mAb作為起始材料且使用所選醣苷酶進行改質。在Fc N-連接醣基化位點處施加醣苷內切酶(Endo F2、Endo F3或Endo H)可得到GlcNAc-Fuc之均質二醣mAb (GAbs200)。隨後，可藉由施加岩藻醣苷酶來獲得均質單醣mAb；或亦可使用Endo F3及岩藻醣苷酶之組合在一個步驟中獲得單醣物質，如使用利妥昔單抗所展示。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR (SEQ ID No)及EEQYNSTYR (SEQ ID No)以證實GAbs200之醣基化模式。

抗CD20 GAb201

將存於磷酸鈉緩衝劑(50 mM, pH 7.0, 1.25 mL)中之利妥昔單抗(2.5 mg)與Endo S (125 µg)及BfFucH (2.5 mg)在37°C下一起培育22 h。LC-MS及SDS-PAGE分析顯示重鏈上之N-聚醣完全裂解。在使用磷酸鈉緩衝劑(20 mM, pH 7.0)預平衡之蛋白質A-瓊脂樹脂(1 mL)之管柱上對反應混合物實施親和層析法。使用磷酸鈉緩衝劑(20 mM, pH 7.0, 10 mL)洗滌管柱。使用甘胺酸-HCl (50 mM, pH 3.0, 10 mL)釋放結合之IgG，且立即使用Tris-Cl緩衝劑(1.0 M, pH 8.3)中和洗脫部分。合併含有Fc片段之部分且藉由離心過濾(Amicon Ultra離心過濾器，Millipore,

Billerica, MA)濃縮以得到抗CD20 GAb201 (1.93 mg)。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GA b201之醣基化模式。

抗CD20 GAb101

根據公開方法自雞蛋黃分離唾液酸醣肽(SGP)。簡言之，離心雞蛋黃之酚提取物，過濾，且藉由層析管柱(包括Sephadex G-50、Sephadex G-25、DEAE-Toyoperarl 650M、CM-Sephadex C-25及Sephadex G-25)純化。將存於磷酸鈉緩衝劑(50 mM, pH 6.0, 5mM)中之唾液酸醣肽(SGP) (52 mg)之溶液與Endo M (53 µg)在37°C下一起培育。在7小時之後，在藉由水洗脫之Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析。合併含有產物之部分且凍乾，以得到白色粉末產物(聚醣-101) (30 mg，產率為82%)。

將存於水(593 µL)中之聚醣-101 (Sia₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 µL)之溶液在4°C下攪拌1 h。在藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫之Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-101)且凍乾以得到白色粉末(26 mg，產率為87.4%)。

將聚醣噁唑啉-101添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GA b201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb101。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GA b101之醣基化模式。

抗CD20 GAb102

以與上文所闡述製備聚醣-101之製程類似之方式來製備聚醣-102 (SiaGal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc)。將存於水中之聚醣-102

(SiaGal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4℃下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-102)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-102添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb102。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb102之醣基化模式。

抗CD20 GAb103

將存於水(593 μL)中之聚醣-103 (SiaGalGlcNAc₂Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4℃下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-103)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-103添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb103。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb103之醣基化模式。

抗CD20 GAb104

將存於水中之聚醣-104 (Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液

在4℃下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-104)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-104添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb104。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb104之醣基化模式。

抗CD20 GAb 105

將存於水中之偶合聚醣-105 (GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4℃下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-105)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-105添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物GAb105。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb105之醣基化模式。

抗CD20 GAb 106

將存於水(593 μL)中之偶合聚醣-106 (GalGlcNAcMan₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4℃下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分

(聚醣噁唑啉-106)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-106添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb106。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb106之醣基化模式。

抗CD20 GAb107

將存於水中之偶合聚醣-107 (GlcNAc₃Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4°C下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-107)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-107添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb107。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb107之醣基化模式。

抗CD20 GAb 108

將存於水中之偶合聚醣-108 (GlcNAc₂Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4°C下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-108)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-108添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣

昔內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb108。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb108之醣基化模式。

抗CD20 GAb109

將存於水中之偶合聚醣-109 (GlcNAcMan₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4 °C下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-109)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-109添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣昔內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb109。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb109之醣基化模式。

抗CD20 GAb110

將存於水中之偶合聚醣-110 (GlcNAcMan₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 μL)之溶液在4 °C下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-110)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-110添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣昔內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化

以收集期望產物抗CD20 GAb110。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb110之醣基化模式。

抗CD20 GAb111

將存於水中之偶合聚醣-110 (Man₃GlcNAc) (30 mg)、2-氯-1,3-二甲基咪唑啉鎘氯化物(DMC) (62.7 mg)及Et₃N (89 µL)之溶液在4℃下攪拌1 h。在Sephadex G-25管柱上對反應混合物實施凝膠過濾層析且藉由0.05% Et₃N水溶液洗脫。合併含有產物之部分(聚醣噁唑啉-111)且凍乾以得到白色粉末。

將聚醣噁唑啉-111添加至存於50 mM Tris緩衝劑(pH 7.8)中之醣苷內切酶及GAb201之混合物中且在室溫下培育一小時。使用蛋白質A親和力管柱純化反應混合物，隨後使用陰離子交換管柱capto Q純化以收集期望產物抗CD20 GAb111。該產物經過胰蛋白酶處理，且使用奈米噴霧LC/MS分析醣肽TKPREEQYNSTYR及EEQYNSTYR以證實GAb111之醣基化模式。

實例3：GAb301之表徵

使用B淋巴瘤Ramos細胞測試抗CD20 GAb301之抗原結合及誘導功能。無醣利妥昔單抗變體在CD20結合活性及細胞凋亡誘導方面保留完整強度，且與利妥昔單抗之最大值相比保留35%之CDC效應；然而，GAb301幾乎完全損失ADCC效應。該等結果指示，碳水化合物之存在對於誘導ADCC至關重要；CDC活性大大受損。

實例4：GAb200及GAb201之表徵

使用Ramos細胞評估抗原結合及誘導之細胞凋亡、CDC及ADCC效應。抗原結合或細胞凋亡效應皆不受醣苷內切酶及/或岩藻醣苷酶之酶消化影響，此乃因GAb200及GAb201與利妥昔單抗展現大致相同之生物活性。然而，使用單醣變體GAb201大大損害誘導之CDC效

應，而二醣變體 GAb200 能夠保留約 50% 之利妥昔單抗之最大活性。對於使用 PBMC 作為效應物細胞之 ADCC 而言，單醣及二醣變體分別保留約 60% 及 80% 之利妥昔單抗之最大效應。與單醣變體 (GA b201) 相比，二醣變體 (GA b200) 在 CDC 及 ADCC 中具有較佳性能。

實例 5：抗 CD20 GAb 之表徵

藉由 SDS-PAGE 證實經純化抗 CD20 GAb 101、102、104、105、106、107、108、109、110、111 及 201 (圖 2)，且藉由 MS 證實抗 CD20 GAb101 之 IgG 分子之分子量。藉由胰蛋白酶消化實施 N-聚醣特徵分析，且藉由奈米噴霧 LC/MS 基於裂解醣肽 TKPREEQYNSTYR 進行分析。抗 CD20 GAb 101、102、104、105、106、107、108、109、110 及 111 之 N-聚醣特徵分析結果展示於圖 3 中。

實例 6：與 B 淋巴瘤細胞之結合

檢驗實例性 GAb GAb101、GA b117 及 GAb104 與 Ramos 細胞、SKW6.4、Raji 及 SU-DHL4 細胞之結合活性，且結果展示，其與利妥昔單抗具有類似結合活性(圖 4)。

實例 7：B 淋巴瘤細胞之細胞凋亡

亦檢驗藉由 GAb101 及 GAb104 誘導之對 Ramos 細胞(圖 5，左圖)及 SKW6.4 細胞(圖 5，右圖)之細胞凋亡效應，且結果展示，其與利妥昔單抗具有類似細胞凋亡效應。

實例 8：B 淋巴瘤細胞之 CDC

使用 Ramos 細胞測試 GAb101、GA b104、GA b108 及 GAb117 之 CDC 效應。圖 6A 中之結果展示，GA b101 與利妥昔單抗誘導類似 CDC 效應，而 GAb 117 顯示略低活性。此指示，2,6 唾液酸鏈接醣抗體在誘導 CDC 方面較 2,3 唾液酸鏈接醣抗體更為強力。

亦使用 GAb 檢驗半乳糖殘基對 CDC 誘導之作用。與末端半乳糖可正性影響 CDC 活性之先前報導一致，GA b101 及 GAb104 展示優於

GAb108 (其係G0變體)之 EC_{50} 。應注意，藉由GAb101及GAb104誘導之相當CDC表明，末端對稱唾液酸之存在並不影響「半乳糖」依賴性補體依賴性細胞毒性。

實例9：離體ADCC活性

對去岩藻糖基化及均質再糖基化之最顯著效應出現於ADCC誘導中。使用來自三種不同供體(FcRIII同種異型未測定)之效應物PBMC細胞評估GAb對Ramos及SKW6.4細胞之ADCC活性。如圖7 (A~C)中所展示，藉由GAb101、GAb117及GAb104誘導之ADCC效應較利妥昔單抗更為強力，其係藉由 EC_{50} 及最大殺死%所估計。一般而言，GAb101、GAb117及GAb104需要10至100倍較濃度來達成利妥昔單抗之最大殺死效應。顯而易見，在所有情形下，GAb101、GAb117及GAb104可在超低濃度(低於1.0 ng/mL)下誘導顯著ADCC效應(細胞裂解高於背景10-20%)，而使用利妥昔單抗觀察到較小效應。

在SKW6.4細胞中觀察到類似結果。儘管在抗CD20治療之後最大ADCC並不如Ramos一般高(圖7B及7C)，但相對於利妥昔單抗藉由GAb達成之增進亦較為明顯且估計為100至1000倍。總而言之，藉由GAb101、GAb117及GAb104ADCC誘導之Ramos及SKW6.4細胞中之效應比利妥昔單抗高約10至1000倍。

實例10：人類B細胞之消耗

使用自人類血液新製之人類PBMC細胞實施人類B細胞之消耗。將存於RPMI 1640-5%FBS中且培養於微量板上之 2×10^6 個細胞與不同濃度之抗CD20 GAb 101、102、105、106、107、108、109、110、111、201及利妥昔單抗在不存在或存在15%自體血漿下於37°C下一起培育4 hr。使用抗CD2-PE及抗CD19-FITC將洗滌之後之細胞在冰上染色5 min。在FACS上基於CD19⁺ CD2⁻ B細胞分析B細胞消耗。(圖8)

實例11：抗CD20 GAb與FcγRIIIA之結合親和力

將FcγRIIIA轉染至HEK-293細胞系中以表現重組蛋白。純化所分泌FcγRIIIA重組蛋白且然後在HBS-EP緩衝劑中稀釋至連續濃度(200 nM、100 nM、50 nM、25 nM及12.5 nM)。將抗CD20 GAb 101、102、104、105、106、107、108、109、110及111中之每一者在HBS-EP緩衝劑中稀釋至濃度為10 ug/ml，且然後捕獲至預固定抗人類Fab結構域抗體之CM5晶片上。注射FcγRIIIA之連續滴定液且以30 ml/min之流速結合。使用Biacore T200評估軟體將單一循環動力學數據擬合至1:1結合模型以量測平衡常數(K_a/K_d)。結果展示於表4中。抗CD20 GAb與利妥昔單抗相比展現較強FcγRIIIA結合親和力。

實例12：藉由GAb101之腫瘤阻抑

在具有Ramos淋巴瘤之SCID小鼠中評估抗CD20醣抗體之抗腫瘤活性。使用GAb101作為此研究中之實例性Ab。與PBS組中之腫瘤之積極生長相比，每週兩次經總共7個注射以1 mg/kg及10 mg/kg投與之GAb101有效阻抑腫瘤生長($p<0.01$) (圖9)。

材料及方法

實例性一般程序

方法A：藉由硫代-聚醣供體之醣基化

為活化用於醣基化之分子篩MS-4Å，將其連結至真空系統並加熱1小時。在將經活化分子篩冷卻至室溫之後，將其添加至含有供體(1.5~2.0當量，對於一位置醣基化)及受體(1.0當量)之燒瓶。向混合物中添加二氯甲烷，且然後將溶液在室溫下攪拌3 h。在-78℃下向溶液中添加*N*-碘琥珀醯亞胺(NIS，1.7~2.2當量)及三氟甲烷磺酸三甲基矽烷基酯(TMSOTf，0.1當量)，且然後在-20℃下攪拌溶液。藉由薄層層析(TLC)分析監測反應，該分析係在玻璃背襯矽膠板(Merck DC Kieselgel 60F₂₅₄)上實施且藉由UV光(254 nm)及酸性鉬酸銨銻觀察。在受體完全消耗之後，使用飽和NaHCO₃(水溶液)及20% Na₂S₂O₃終止反

應，且然後經由矽藻土墊過濾混合物。在使用兩份二氯甲烷萃取水層之後，使用鹽水洗滌合併之有機層，藉由 MgSO_4 乾燥，並濃縮。藉由矽膠管柱層析(使用甲苯/乙酸乙酯作為洗脫系統)純化粗製物以得到產物(產率展示於反應圖中)。

方法B：藉由氟化物-聚醚供體之醚基化

將存於無水甲苯中之三氟甲磺酸銀(5當量)、雙(環戊二烯基)二氯化鉛(3.5當量)及4Å經活化分子篩之混合物在室溫下攪拌1 h。然後將反應混合物冷卻至 -50°C ，添加存於甲苯中之受體(1.0當量)及供體(1.2~1.5當量)之溶液。將混合物在 -10°C 下攪拌2-8 h。在TLC指示受體完全消耗之後，使用 Et_3N 終止反應，使用 EtOAc 稀釋並經由矽藻土過濾。使用 NaHCO_3 水溶液及鹽水溶液洗滌濾液。藉由 Na_2SO_4 乾燥有機層並在真空中濃縮。藉由矽膠管柱層析(使用甲苯/乙酸乙酯作為洗脫系統)純化粗製物以得到產物(產率展示於反應圖中)。

方法C：O-乙醯基之去保護

將 NaOMe (0.25當量)添加至存於THF/甲醇(2/3)中之起始材料(1.0當量)之溶液中。在室溫下攪拌反應液並藉由TLC分析監測。在乙醯基完全去保護之後，藉由IR-120中和溶液，過濾，並濃縮。藉由矽膠管柱層析(使用己烷/乙酸乙酯作為洗脫系統)純化粗製物以得到產物(產率展示於反應圖中)。

方法D：O-Troc之去保護

將 Zn 粉(20當量)及乙酸(0.2當量)添加至存於THF中之起始材料(1.0當量)之溶液中。在室溫下攪拌反應液並藉由薄層層析(TLC)分析監測。在Troc基團完全去保護之後，過濾溶液，並濃縮。藉由矽膠管柱層析(使用己烷/乙酸乙酯作為洗脫系統)純化粗製物以得到產物(產率展示於反應圖中)。

方法E：亞苺基之去保護

將對甲苯磺酸(*pTSA*，1.5 當量)添加至存於ACN/MeOH (2/1)中之起始材料(1.0 當量)之溶液中。在室溫下攪拌反應液並藉由薄層層析(TLC)分析監測。在亞苄基完全去除之後，藉由三甲胺終止反應且然後濃縮。藉由矽膠管柱層析(使用己烷/乙酸乙酯作為洗脫系統)純化粗製物以得到產物(產率展示於反應圖中)。

方法F：整體去保護

將經保護寡醣(50 mmol)及10 mL乙二胺：*n*BuOH (1/4)之混合物在90℃下攪拌過夜。蒸發揮發物，且使粗製物與10 mL Ac₂O/吡啶(1/2)反應過夜。使用高真空去除溶劑，且藉由急驟管柱層析(使用丙酮/甲苯作為洗脫系統)純化產物。使用甲醇鈉在MeOH (10 mL)中對產物實施去乙醯基化過夜。藉由使用IR-120中和反應液，然後過濾並在真空中濃縮。藉由急驟管柱層析(使用丙酮/甲苯作為洗脫系統)純化殘餘物。將產物溶於10 mL MeOH : H₂O : HCOOH (6/3/1)中，添加Pd(OH)₂ (50重量%)，且將反應液實施氫化過夜。經由矽藻土過濾反應混合物並在真空中濃縮。藉由G-15凝膠管柱層析使用水作為洗脫劑純化殘餘物。凍乾產物以得到白色粉末(產率展示於反應圖中)。

方法G：酶(2,6)-唾液酸化

將起始材料(5 μmol)、CTP (1 μmol)、Neu5Ac (9.5 μmol)、PEP (10 μmol)、α-2,6唾液酸轉移酶(200 μL，估計濃度為2 mg/L)、CMK (80單位)、PK (40單位)及PPA (40單位)溶於50 μmol含有1% BSA之二甲基胍酸鈉(pH 7.4) (130 μL)中。將反應液在37℃及輕微攪動下培育2d。藉由使用G-15凝膠層析(洗脫劑為H₂O)純化產物以在凍乾之後提供白色固體形式之期望產物。

結構單元：

分析。將微量板上之細胞(存於RPMI 1640-10%FBS培養基中， 5×10^4 /孔)在37℃下與不同濃度之所關注抗體一起培育24 hr。在交聯劑山羊F(ab')₂抗hIgG-Fcγ (其濃度與抗體成1:1比率)存在下誘導細胞凋亡。洗滌細胞且在暗處與膜聯蛋白V-FITC/PI試劑一起培育5 min。在FACS上分析所檢測細胞凋亡。

B淋巴瘤細胞之補體依賴性細胞毒性(CDC)。在CD20⁺ B淋巴瘤細胞系(Ramos及SKW6.4)中探究藉由抗體誘導之CDC效應且在流式細胞儀上進行分析。將微量板上之細胞(存於RPMI 1640培養基中， 2.0×10^5 /孔)在冰上與不同濃度之所關注抗體一起培育30 min。洗滌細胞且在37℃下與存於RPMI 1640中之10%人類血清一起培育30 min。洗滌細胞且在暗處與PI試劑一起培育5 min。在FACS上分析CDC之細胞死亡。

B淋巴瘤細胞之抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)。在含有CD20之B淋巴瘤細胞系(Ramos及SKW6.4)中使用新製人類PBMC作為效應物細胞探究醣抗體之ADCC效應誘導，且在流式細胞儀上分析結果。首先使用CFSE將存於PBS-0.1%BSA中之靶B細胞在37℃下標記5 min。在洗滌之後，將存於RPMI 1640培養基中之CFSE標記細胞在37℃下於微量板上與不同濃度之所關注抗體及PBMC效應物細胞一起培育4 hr。將靶細胞對效應物細胞之比率設定於25:1。使用PI試劑將所得混合物在暗處染色5 min。在FACS上分析ADDC之細胞死亡。

人類B細胞之消耗。使用自人類血液新製之人類PBMC細胞實施人類B細胞之消耗。將存於RPMI 1640-5%FBS中且培養於微量板上之 2×10^6 個細胞在不存在或存在15%自體血漿下於37℃下與不同濃度之所關注抗體一起培育4 hr。使用抗CD2-PE及抗CD19-FITC將洗滌之後之細胞在冰上染色5 min。在FACS上基於CD19⁺ CD2⁻ B細胞分析B細胞消耗。

淋巴瘤異種移植模型。在 Southern Research Institute's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)處且根據由其批准之程序實施B淋巴瘤小鼠異種移植研究。簡言之，向6至8週齡雌性C.B-17嚴重聯合免疫缺陷(SCID)小鼠(BioLASCO Taiwan公司)經皮下植入 5×10^6 個Ramos淋巴瘤細胞。在腫瘤生長至平均大約為 60 mm^3 時，將小鼠隨機置入三個組($n = 6$ 隻/組)且開始抗體治療。在腫瘤細胞植入後第9天，每週兩次經7個注射向小鼠經靜脈內注射1或10 mg/kg GAb101或PBS。每週兩次使用卡尺量測可觸知腫瘤；腫瘤體積計算為(長度×寬度²) / 2。

【符號說明】

無

I670078

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

抗CD20醣抗體及其用途

ANTI-CD20 GLYCOANTIBODIES AND USES THEREOF

【中文】

本揭示係關於新穎種類之抗CD20單株抗體，其包括在每一Fc上具有相同N-聚醣之抗CD20 IgG分子之均質群體。本發明抗體可自抗CD20單株抗體由Fc醣改造產生。重要的是與未經醣改造之相應單株抗體相比，本發明抗體具有改良之治療價值與增加之ADCC活性及增加之Fc受體結合親和力。

【英文】

The present disclosure relates to a novel class of anti-CD20 monoclonal antibodies comprising a homogeneous population of anti-CD20 IgG molecules having the same N-glycan on each of Fc. The antibodies of the invention can be produced from anti-CD20 monoclonal antibodies by Fc glycoengineering. Importantly, the antibodies of the invention have improved therapeutic values with increased ADCC activity and increased Fc receptor binding affinity compared to the corresponding monoclonal antibodies that have not been glycoengineered.

【代表圖】

【本案指定代表圖】： 無

【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

申請專利範圍

1. 一種抗CD20醣抗體或抗CD20結合片段之組合物，其包括在每一Fc區上具有相同N-聚醣之抗CD20 IgG分子之分離均質群體；

其中該 N-聚醣係選自由以下組成之群：Sia₂(α2-

6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-

6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-

3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-

3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-3/α2-

6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-

3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-3/α2-

6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia₂(α2-6/α2-

3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-

6)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-

3)Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-

6)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-

3)Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-

6) GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、

Sia(α 2-3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α 2-

6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Sia(α2-

3) GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ 、 Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 、

GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂及Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂。

2. 如請求項1之組合物，其中該抗CD20 IgG分子包括具有SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈及具有SEQ ID NO: 2中所述胺基酸序列之輕鏈。
3. 如請求項1之組合物，其中該抗CD20 IgG分子包括利妥昔單抗

(Rituximab)之輕鏈序列及重鏈序列。

4. 如請求項1之組合物，其中該等抗CD20醣抗體具有比利妥昔單抗改良之ADCC活性。
5. 如請求項4之組合物，其中該ADCC改良至少約10倍。
6. 如請求項1之組合物，其中該等抗CD20醣抗體展現比利妥昔單抗改良之Fc γ RIIIA結合性。
7. 如請求項1之組合物，其中該N-聚醣連接至該Fc區之Asn-297。
8. 如請求項1之組合物，其中該N-聚醣不含岩藻醣。
9. 如請求項1之組合物，其中該N-聚醣包括至少一個 α 2-6唾液酸。
10. 如請求項9之組合物，其中該N-聚醣包括兩個 α 2-6唾液酸。
11. 一種醫藥調配物，其包括如請求項1至10中任一項之抗CD20醣抗體或其抗原結合片段之實質上純群體及醫藥上可接受之載劑。
12. 一種如請求項11之醫藥調配物之用途，其係用於製備治療癌症之藥物。
13. 如請求項12之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：B細胞淋巴瘤、NHL、前體B細胞淋巴母細胞白血病/淋巴瘤及成熟B細胞贅瘤、B細胞慢性淋巴細胞性白血病(CLL)/小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、B細胞前淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤(MCL)，濾泡性淋巴瘤(FL)、低度(low-grade)、中度及高度(FL)，皮膚濾泡中心淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、MALT型邊緣區B細胞淋巴瘤、結節邊緣區B細胞淋巴瘤、脾臟型邊緣區B細胞淋巴瘤、多毛細胞白血病、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、漿細胞瘤、漿細胞骨髓瘤、移植後淋巴增生性病徵、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)及間變性大細胞(anaplastic large-cell)淋巴瘤(ALCL)。

14. 如請求項12之用途，其中該藥物進一步包括治療劑或係與治療劑組合投與。
15. 如請求項14之用途，其中該治療劑包括利妥昔單抗。
16. 一種如請求項11之醫藥調配物之用途，其係用於製備改良基於B細胞消耗(depletion)之疾病治療之藥物。
17. 如請求項16之用途，其中該藥物係共同投與或共同調配。
18. 一種製備如請求項1之抗CD20醣抗體或抗原結合片段之方法，該方法包括：

(a)使抗CD20單株抗體與 α -岩藻醣苷酶及至少一種醣苷內切酶接觸，由此得到具有單一N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)之去岩藻醣基化抗體，及

(b)在適宜條件下向GlcNAc中添加碳水化合物部分。

19. 如請求項18之方法，其中該抗CD20單株抗體係利妥昔單抗。
20. 如請求項18之方法，該等抗CD20醣抗體係在活體外產生。
21. 如請求項18之方法，該等抗CD20醣抗體係自細胞培養獲得之抗體以酶改造。
22. 如請求項18之方法，其中該碳水化合物部分係選自由以下組成之群： $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3$

GlcNAc₂、Sia(α2-3)GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-6)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Sia(α2-3)GalGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂、Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂、GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂ 及 Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂。

23. 如請求項18之方法，其中步驟(b)中之添加法係使用轉糖苷酶進行。
24. 如請求項18之方法，其中該糖苷內切酶係EndoS、Endo S2、EndoH、EndoA、EndoM、EndoF、EndoF1、EndoF2或EndoF3。
25. 如請求項18之方法，其中該α-岩藻糖苷酶包括具有與SEQ ID NO: 5至少90%一致之胺基酸序列之多肽。
26. 如請求項18之方法，其中該α-岩藻糖苷酶係重組類桿菌(*Bacteroides*) α-L-岩藻糖苷酶。