200906436

發明專利說明書

（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：97109963

※ 申請日期：97.3.21　　※IPC 分類：A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

新穎用途

NOVEL USES

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

美商史密斯克萊美占公司

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

代表人：（中文/英文）

紀彼得/GIDDINGS, PETER

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國賓州費城郵政信箱 7929 號法蘭克林廣場 1 號

One Franklin Plaza, P O Box 7929, Philadelphia, PA 19101, U.S.A.

國　籍：（中文/英文）

美國/U.S.A.

三、發明人：（共 5 人）

姓　名：（中文/英文）

1.約納克/JONAK, ZDENKA LUDMILA

2.哈庫亞/HASKOVA, ZDENKA

3.史帝分/TRULLI, STEPHEN H

4.圖約翰/TOSO, JOHN F.

5.瑪葛特/WHITACRE, MARGARET N

國　籍：（中文/英文）

1.3.4.5.為美國/U.S.A.

2.為捷克/CZECH REPUBLIC

四、聲明事項：

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

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.美國；西元 2007 年 03 月 23 日；60/896,855

2.美國；西元 2007 年 07 月 26 日；60/952,002

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

此專利申請案係請求2007年3月23日申請之美國專利臨時申請案號60/896855和2007年7月25日提出之案號60/952002的優先權。

【發明所屬之技術領域】

本發明一般係關於IL-18 (亦已知為γ-干擾素誘導因子(IGIF))與表現於癌細胞表面上之單株抗體組合之用途。

【先前技術】

活性人類IL-18含有157個胺基酸殘基。其具有強效生物活性，包括藉由T細胞和脾細胞誘發γ-干擾素的產生、增強NK細胞的殺滅力和促進初始$CD4^+$T細胞分化成Th1細胞。此外，人類IL-18可增加GM-CSF以及降低IL-10的產量。$CD4^+$T細胞為免疫反應的中樞調節元件。其被分成Th1和Th2兩種亞群。各亞群具有不同細胞活素的分泌能力。有趣的是，細胞活素本身為最強效的分化誘導劑。IL-4誘導初始前驅物形成Th2細胞。在發現IL-18、IL-12之前其被認為是主要的Th1誘導細胞活素。

Th1細胞分泌IL-2、γ-干擾素和TNF-β。γ-干擾素、標記Th1細胞活素直接作用於巨噬細胞以增強其殺菌和噬菌活性。因此，被活化巨噬細胞可有效地破壞細胞內病原菌和腫瘤細胞。Th2細胞可產生IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13，其幫助B細胞形成抗體產生細胞。總之，Th1細胞主要負責細胞性免疫反應，同時Th2細胞負責體液性

免疫反應。

根據 IL-18 的廣效免疫刺激性質，其已在各種臨床前腫瘤模式中被研究。IL-18 已在免疫原性的腫瘤中觀察其用作為單一療法的抗腫瘤活性。其最強效抗腫瘤效應被發現於 MOPC-315 漿細胞瘤(高度免疫原性腫瘤)的惡化腫瘤(>100 立方釐米)模式中。在此模式中，鼠每天投予 IL-18(5 毫克/公斤)約 30 天導致可重複性腫瘤消退和痊癒。再以親代腫瘤細胞刺激可產生腫瘤排斥作用而認為可誘發免疫記憶反應。此模式中涉及細胞性免疫的其他證據係來自無法復原之惡化 MOPC-315 腫瘤的重症複合免疫不全鼠(SCID)中利用類似 IL-18 療程所進行的試驗。IL-18 介導細胞性免疫的其他證據亦來自在對照和 IL-18 治療小白鼠的經確定 MOPC-315 腫瘤上所獲得的免疫組織化學結果。已證明經 IL-18 治療動物與對照組比較可增加細胞浸潤液內的 $CD8^+$ T 淋巴球、NK 細胞、活化巨噬細胞和樹突狀細胞。在體外，經 IL-18 處理的動物 PBMCs 或脾臟細胞具有對抗腫瘤的 NK 和 CTL 細胞毒性。此外，完整的 Fas/Fas 配體徑路似乎有利其抗腫瘤反應。

利妥昔單抗(rituximab)係由可辨認融合至人類 IgG1 恒定區之人類 CD20 抗原的鼠抗原結合部位所構成的一種嵌合單株抗體。作為單藥的利妥昔單抗在溫和型 NHL 中具有明顯的活性。在 166 位復發或頑固型溫和 NHL 病人的重要單組臨床試驗中，其整體反應率為 48%以及完全(CR)反應率為 6%。McLaughlin 等人，*J. Clin. Oncol.* 16：2825~2833

(1998)。在先前未治療的溫和型 NHL 病人中，利妥昔單抗具有 64 至 73%的整體反應率以及 15 至 26%的完全反應率。Hainsworth 等人，*Blood* 95：3052~3056(2000)；Colombat 等人，*Blood* 97：101~106(2001)。此外，多重隨機 III 期試驗已顯示習知化療法中加入利妥昔單抗可改善 NHL 病人的存活率。Marcus 等人，*Blood* 105：1417~1423(2005)；Marcus 等人，*Blood* 104：3064~3071(2004)；Hiddemann 等人，*Blood* 106：3725~3732(2005)；Feugier 等人，*J. Clin. Oncol.* 23：4117~4126(2005)。然而，由於化療法的高毒性，因此溫和型淋巴瘤病人仍考慮選擇使用利妥昔單抗的單藥療法。

正進行加強抗腫瘤活性和改善利妥昔單抗效力之機制的研究。許多機制可歸因於利妥昔單抗在體內的效力。利妥昔單抗結合至淋巴瘤細胞表面的 CD20 可觸發細胞內導致細胞凋亡或細胞程序性死亡的信號徑路。Shan 等人，*Blood* 91：1644~1652(1998)；Pedersen 等人，*Blood* 99：1314~1319(2002)。此外，利妥昔單抗可活化補體系而導致補體依賴性細胞溶解。Cragg 等人，*Blood* 101：1045~1052(2003)；Manches 等人，*Blood* 101：949~954(2003)。然而，累積的證據認為 ADCC 在投予利妥昔單抗的腫瘤細胞清除上扮演重要角色。Manches 等人，如上述；Golay 等人，*Haematologica* 88：1002~1012(2003)；Clynes 等人，*Nat. Med.* 6：443~446(2000)。當抗體恒定區(Fc)結合至例如 NK 細胞或單核細胞/巨噬細胞系列之效應細胞(effector)的表面上

Fc 受體時則觸發 ADCC。在人類 B 細胞淋巴瘤的大鼠模式中，缺乏活化 Fc 受體的小白鼠無法發揮利妥昔單抗的效力。具 Fc 受體的效應細胞為此模式中利妥昔單抗效力的關鍵。人類的主要活化 Fc 受體為 CD16(Fcγ RIIIA)，其被表現於 NK 細胞及單核細胞。人類 Fcγ RIIIA 基因在 158 位置(苯丙胺酸對纈胺酸)的多態性已顯示與利妥昔單抗的反應有關。158VV 同質基因型與體外人類 NK 細胞較強 IgG 結合至和觸發 ADCC 有關(Koene 等人，*Blood* 90：1109~1114(1997)；Dall'Ozzo 等人，*Cancer Res.* 64：4664~4669(2004))，以及亦與利妥昔單抗治療後較高反應率有關。Weng 等人，*J. Clin. Oncol.* 21：3940~3947(2003)；Cartron 等人，*Blood* 104：2635~2642(2004)。這些資料支持 NK 細胞介導性 ADCC 影響利妥昔單抗療法對淋巴瘤病人之有效性的假設。

一種改善利妥昔單抗效力的方法為投予能擴增及/或活化具 Fc 受體效應細胞包括 NK 細胞和單核細胞/巨噬細胞系列之細胞的細胞活素。第 I 期臨床試驗已顯示利妥昔單抗可結合 IL-2、IL-12 或 GM-CSF 安全地被投予至淋巴瘤病人。Rossi 等人，*Blood* 106：2760(摘要 2432)(2005)；McLaughlin 等人，*Ann. Oncol.* 16(補充 5)：第 68 卷(摘要 104)(2005)；Ansell 等人，*Blood* 99：67~74(2002)；Eisenbeis 等人，*Clin. Cancer Res.* 10：6101~6110(2004)；Gluck 等人，*Clin. Cancer Res.* 10：2253~2264(2004)；Friedberg 等人，*Br. J. Haematol.* 117：828~834(2002)。這些試驗的整體客

觀反應率為22至79%以及完全反應率為5~45%。此外，例如絕對NK數目和體外ADCC活性的生物指標與反應率有關。大部分這些試驗主要包括患有復發和頑固型疾病以及患有惡性淋巴瘤亞型(DLBCL和被套細胞淋巴瘤)的病人。這些不良病人族群的極高客觀反應率值得在B細胞淋巴瘤中對細胞活素和利妥昔單抗的組合物做進一步的研究。

【發明內容】

發明之摘要

在一態樣中，本發明係關於一種有需要病人治療癌症之用於預防及/或治療腫瘤性疾病的組合物，其含有：(i) 人類IL-18多肽(序列辨識編號：16)；以及(ii) 對抗CD20抗原的抗體(又簡稱為抗-CD20抗體)。

在一態樣中，本發明係關於使用人類IL-18多肽(序列辨識編號：16)和抗-CD20抗體於預防及/或治療腫瘤性疾病(癌症)。

在一態樣中，本發明係關於同時或依序使用(投予)人類IL-18多肽(序列辨識編號：16)和抗-CD20抗體於預防及/或治療腫瘤性疾病(癌症)。

在一態樣中，本發明係關於人類IL-18多肽(序列辨識編號：16)於製造結合抗-CD20抗體之預防及/或治療腫瘤性疾病(癌症)藥物的用途。

在一態樣中，本發明係關於抗-CD20抗體於製造結合人類IL-18多肽(序列辨識編號：16)之預防及/或治療腫瘤

性疾病(癌症)藥物的用途。

在一態樣中，本發明係關於人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和抗-CD20 抗體於製造用於預防及/或治療腫瘤性疾病(癌症)藥物的用途。

在一具體實施例中，於抗-CD20 抗體之前投予人類 IL-18 多肽。

在一具體實施例中，於人類 IL-18 多肽之前投予抗-CD20 抗體。

在本發明的一具體實施例中，該抗-CD20 抗體係單株抗體。

在一具體實施例中，該抗-CD20 抗體具有抗體依賴細胞介導性細胞毒性(ADCC)的效應細胞功能。

在本發明的一具體實施例中，該抗-CD20 抗體係嵌合、人源化或人類單株抗體。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的單株抗體(抗-CD20 抗體)係選自由全長 IgG1 抗體、全長 IgG2 抗體、全長 IgG3 抗體、全長 IgG4 抗體、全長 IgM 抗體、全長 IgA1 抗體、全長 IgA2 抗體、全長 IgA 抗體、全長 IgD 抗體和全長 IgE 抗體構成之群組的全長抗體，其中該抗體被糖化入真核細胞內。

在本發明的一具體實施例中，該抗-CD20 抗體係全長抗體，例如全長 IgG1 抗體。

在本發明的一具體實施例中，該抗-CD20 抗體係一抗體片段，例如 scFv 或 UniBody™(如 WO 2007/059782 中所

述的單價抗體)。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體係結合域免疫球蛋白融合蛋白，其含有(i) 形成序列辨識編號：1 的重鏈可變區或序列辨識編號：2 的輕鏈可變區之融合至免疫球蛋白絞鏈區多肽的結合域多肽；(ii) 融合至該絞鏈區的免疫球蛋白重鏈 CH2 恒定區；以及(iii) 融合至該 CH2 恒定區的免疫球蛋白重鏈 CH3 恒定區。在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體以至少與人類 CD20 相同的親和力結合至突變 P172S CD20(位置 172 的脯胺酸突變成絲胺酸)。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體結合至 CD20 上的抗原決定部位。

(i) 其在位置 172 不含有或需要脯胺酸殘基；

(ii) 其在位置 170 不含有或需要丙胺酸殘基或在位置 172 的脯胺酸；

(iii)其在位置 163 含有或需要天冬胺酸殘基以及在位置 166 的天冬胺酸；

(iv)其在位置 172 不含有或需要脯胺酸殘基，但其在位置 163 含有或需要天冬胺酸殘基以及在位置 166 的天冬胺酸；或

(v) 其在位置 170 不含有或需要丙胺酸殘基或在位置 172 的脯胺酸，但其在位置 163 含有或需要天冬胺酸殘基以及在位置 166 的天冬胺酸。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體結合至人類 CD20 之小胞外第一環肽內的抗原決定部位。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體結合至 CD20 上不連續抗原決定部位。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體結合至 CD20 上不連續抗原決定部位，其中該抗原決定部位含有部分的第一小胞外環肽以及部分的胞外第二環肽。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體結合至 CD20 上不連續抗原決定部位，其中該抗原決定部位具有小胞外第一環肽的 AGIYAP 殘基以及胞外第二環肽的 MESLNFIRAHTPYI 殘基。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體具有一或多個選自下列群組的特徵：

(i) 存在補體之下能誘發表現 CD20 之細胞的補體依賴細胞毒性(CDC)；

(ii) 存在補體之下能誘發表現 CD20 之細胞的補體依賴細胞毒性(CDC)以及高濃度的 CD55 及/或 CD59；

(iii)能誘發表現 CD20 之細胞的細胞凋亡；

(iv)存在效應細胞之下能誘發表現 CD20 之細胞的抗體依賴細胞介導性細胞毒性(ADCC)；

(v) 能誘發表現 CD20 之細胞的同質黏附；

(vi)在結合至 CD20 時能轉位入脂筏(lipid rafts)；

(vii)能耗盡表現 CD20 的細胞；

(viii)能耗盡表現低濃度 CD20 的細胞(低 CD20 細胞)；以及

(ix)能有效地耗盡人類組織內原位 B 細胞。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體含有選自序列辨識編號：5、9 或 11 的 VH CDR3 序列。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體含有序列辨識編號：3 的 VH CDR1、序列辨識編號：4 的 VH CDR2、序列辨識編號：5 的 VH CDR3、序列辨識編號：6 的 VL CDR1、序列辨識編號：7 的 VL CDR2 和序列辨識編號：8 的 VL CDR3。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體含有序列辨識編號：10 的 VH CDR1~VH CDR3 跨膜序列。

在本發明的一具體實施例中，該對抗 CD20 的抗體具有分別含說明於序列辨識編號：1 和序列辨識編號：2 的人類重鏈和人類輕鏈可變區；或分別與說明於序列辨識編號：1 和序列辨識編號：2 之胺基酸序列具有至少 95%同源的胺基酸序列。

在本發明的一具體實施例中，該 CD20 結合分子係選自揭示於 WO 2004/035607 的其一抗-CD20 抗體例如歐法目單抗(ofatumumab)(2F2)、11B8 或 7D8；揭示於 WO 2005/103081 的其一抗體例如 2C6;揭示於 WO 2004/103404 的其一抗體；AME-133(Applied Molecular 公司研發的人化和最佳化抗-CD20 單株抗體)；揭示於 US 2003/0118592 的

其一抗體、TRU-015(CytoxB20G，Trubion 製藥公司研發衍自抗-CD20 抗體上關鍵區的一種小模組免疫醫藥融合蛋白)；揭示於 WO 2003/68821 的其一抗體；IMMU-106(人化抗-CD20 單株抗體)；揭示於 WO 2004/56312 的其一抗體；ocrelizumab(2H7.v16、70769、R-1594)；Bexxar®(托西莫單抗(tositumomab))；以及 Rituxan®/MabThera®(利妥昔單抗)。

此處名詞"CD20"和"CD20 抗原"可互用，以及包括人類 CD20 的變異株、同種型和同系物，其自然表現於細胞或轉染 CD20 基因的細胞。技術中已知的 CD20 同義物包括 B-淋巴細胞表面抗原 B1、Leu-16 和 Bp35。人類 CD20 被 UniProtKB/Swiss-Prot 登錄為 P11836。

此處名詞"免疫球蛋白"指由兩對多肽鏈構成的類似糖蛋白構造，其為全部以雙硫鍵連接的一對低分子量輕鏈(L)和一對重鏈(H)。已充分瞭解免疫球蛋白的構造。請看例如基礎免疫學第七章(Paul, W.編輯，第 2 版，紐約 Raven 出版社(1989))。簡言之，各重鏈通常含有一重鏈可變區(簡稱為 VH)及一重鏈恒定區。該重鏈恒定區 CH 一般含有 CH1、CH2 和 CH3 三個區。各輕鏈一般含有一輕鏈可變區(簡稱為 VL)及一輕鏈恒定區。該輕鏈恒定區一般含有 CL 區。該 VH 和 VL 區可進一步被細分成亦稱為互補決定區(CDRs)的高變異區(或為序列及/或結構上定義環肽型高變異的超變區)，其被點綴稱為骨架區(FRs)的更保守區。

各 VH 和 VL 一般由三個 CDRs 和四個 FRs 所構成，其從胺基端至羧基端以下列順序配置：FR1、CDR1、FR2、

CDR2、FR3、CDR3、FR4(亦請參考 Chothia 和 Lesk，*J. Mol. Biol.* 196：901~917(1987))。藉由 Kabat 等人，重要免疫蛋白的序列第 5 版，麻州 Bethesda 市國家衛生研究院衛生福利部(1991)(如可變區殘基之詞係根據 Kabat 或此處用於重鏈可變區或輕鏈可變區的 Kabat 編號系統進行編碼)所述方法進行此區內的胺基酸編號。利用此編號系統，該胜肽的實際線性胺基酸序列可含有較少或相當於插入可變區 FR 或 CDR 的附加胺基酸。例如，一重鏈可變區在 VH CDR2 的殘基 52 之後可含有單一胺基酸插入物(如根據 Kabat 的殘基 52a)以及在重鏈 FR 殘基 82 之後含有插入殘基(如根據 Kabat 的殘基 82a、82b 和 82c 等)。一已知抗體的 Kabat 殘基編號可藉由該抗體序列之同源區與一"標準"Kabat 編碼序列之間的比對。

此處"抗體"一詞指一免疫球蛋白分子、一免疫球蛋白分子片段或其衍生物，其在一般生理條件下可於一特定期間內專一性地結合至一抗原，例如至少約 30 分鐘、至少約 45 分鐘、至少約 1 小時、至少約 2 小時、至少約 4 小時、至少約 8 小時、至少約 12 小時、約 24 小時或更長、約 48 小時或更長、約 3、4、5、6、7 天或更長等；或任何其他相關的功能性定義期間(例如足夠誘發、促進、加強及/或調節與抗體結合至該抗原及/或抗體足夠匯聚 Fc-介導效應細胞活性之時間有關的一生理反應)。

免疫球蛋白分子之重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原相互作用的結合區。該抗體的恒定區可調節免疫球蛋白至宿

主組織或因子的結合，其包括免疫系統的各種細胞(例如效應細胞)以及補體系統的成分例如 C1q，其為補體活化傳統途徑中的第一種成分。

該抗-CD20 抗體可為單-、雙-或多重專一性。事實上，本發明提供的雙專一性抗體、雙鏈抗體等除了一部分 CD20 之外可結合任何適當的標的物。

如上所述，除非另有明述或與本文有明顯的矛盾，此處"抗體"一詞包括藉由任何已知技術所提供的抗體片段，例如酵素切斷、胜肽合成和可保留專一性結合至抗原之能力的重組技術。已顯示可藉由全長(完整)抗體的片段進行抗體的抗原結合功能。屬於"抗體"定義範圍內之抗原結合片段的實例包括，但不侷限於：(i) Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 功能區構成的單價片段；(ii) F(ab)2 和 F(ab')2 片段，含有兩個 Fab 片段在絞鏈區藉由雙硫鍵連接的雙價片段；(iii) 主要由 VH 和 CH1 功能區構成的 Fd 片段；(iv) 主要由單臂抗體之 VL 和 VH 功能區構成的 Fv 片段；(v) dAb 片段(Ward 等人，*Nature* 341：544~546(1989))，其主要由亦稱為區域抗體(Holt 等人(2003 年 11 月)*Trends Biotechnol.* 21(11)：484~90)的 VH 區所構成；(vi) 駱駝抗體或奈米抗體(Revets 等人(2005 年 1 月)*Expert Opin. Biol. Ther.* 5(1)：111~24)；(vii) 分離互補決定區(CDR)例如 VH CDR3；(viii) UniBody™，揭示於 WO 2007/059782 的一種單價抗體；(ix) 單鏈抗體或單鏈 Fv(scFv)，請參考例如 Bird 等人，*Science* 242：423~426(1988)和 Huston 等人，*PNAS*

USA 85：5879~5883(1988))；(x) 雙鏈抗體(一種 scFv 雙體)，其可為單專一性或雙專一性(請參考例如 *PNAS USA* 90(14)：6444~6448(1993)、EP 404097 或 WO 93/11161 的雙鏈抗體說明)；三鏈抗體或四鏈抗體。此類片段雖然通常包含於抗體的定義範圍內，但是其共同及各別具有本發明的獨特性質、呈現不同生物學性質及實用性。此處將進一步討論本發明內文中的諸如此類有用抗體片段。

應瞭解抗體一詞通常包括單株抗體以及多株抗體。該抗體可為人類、人源化、嵌合、鼠等。可產生任何同種型的抗體。

此處"人類抗體"一詞意指包括具有衍自人類胚系免疫球蛋白序列之可變區和恒定區的抗體。本發明的人類抗體可包含未編碼人類胚系免疫球蛋白序列(例如藉由體外的隨機或特異位點突變或藉由體內的體細胞突變)的胺基酸殘基。然而，此處"人類抗體"一詞不包括其 CDR 序列衍自已被移植入人類骨架序列內的另一哺乳動物品種之胚系例如小白鼠的抗體。

若該抗體係獲得自利用人類免疫球蛋白序列的系統，例如藉由免疫攜帶人類免疫球蛋白基因的轉殖基因小鼠或藉由人類免疫球蛋白基因庫的篩選，則此處人類抗體被稱為"衍自"一特定胚系序列，以及其中該選取的人類抗體與編碼該胚系免疫球蛋白基因的胺基酸序列比較具有例如至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%，或至少 99%的胺基酸序列同一性。通常，衍自一特定人類胚

系序列的人類抗體與編碼該胚系免疫球蛋白基因的胺基酸序列比較將展現不超過 10 個胺基酸的差異度，例如不超過 5 個如不超過 4、3、2 或 1 個胺基酸差異度。就 VH 抗體序列而言，此類比較不包括 VH CDR3 功能區。

"嵌合抗體"一詞指含有來自一抗體的一或多個區以及來自一或多各其他抗體的一或多個區之抗體。"嵌合抗體"一詞包括單價、雙價或多價抗體。一單價嵌合抗體係藉由一嵌合 H 鏈經由雙硫鍵與一嵌合 L 鏈結合所形成的雙體(HL)。一雙價嵌合抗體係藉由兩個 HL 雙體經由至少一個雙硫鍵相結合所形成的四聚體(H2L2)。亦可製造多價嵌合抗體例如藉由利用可組合入具有 2+結合位點之分子(例如從一 IgM H 鏈或 μ 鏈)的 CH 區。通常，一嵌合抗體指一抗體其一部分重鏈及/或輕鏈與衍自一特定品種之抗體內對應序列一致或同源或屬於一特定抗體的群或亞群，同時其餘的鏈與衍自另一品種之抗體內對應序列一致或同源或屬於另一抗體的群或亞群，或具有所欲生物活性之此類抗體的片段(請看例如 US 4,816,567 和 Morrison 等人，*PNAS USA* 81：6851~6855(1984))。藉由重組過程的已知技術製造嵌合抗體(請參考例如 Cabilly 等人，*PNAS USA* 81:3273~3277 (1984)；Morrison 等人，*PNAS USA* 81：6851~6855(1984)；Boulianne 等人，*Nature* 312：643~646(1984)；EP 125023；Neuberger 等人，*Nature* 314：268~270(1985)；EP 171496；EP 173494；WO 96/01533；EP 184187；Sahagan 等人，*J. Immunol.* 137：1066~1074(1986)；WO 87/02671；Liu 等人，

PNAS USA 84：3439~3443(1987)；Sun 等人，*PNAS USA* 84：214~218(1987)；Better 等人，*Science* 240：1041~1043(1988)和 Harlow 等人，*抗體：實驗室手冊*，冷泉港實驗室出版，紐約冷泉港(1988))。

"人源化抗體"一詞指含有最少衍自非人類抗體序列的一種人類抗體。通常，人源化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，例如具有所欲專一性、親和力和效力的小白鼠、大鼠、兔或非人類靈長動物。

此外，人源化抗體可含有未發現於受體抗體或供體抗體內的殘基。這些修飾可進一步增加抗體的性能。一般而言，一人源化抗體將含有實質上全部或至少一及一般為兩個可變區，其中全部或實質上全部相當於非人類免疫球蛋白的超變量環以及全部或實質上全部人類免疫球蛋白序列的 FR 區。人源化抗體視需要亦含有至少一部分的人類免疫球蛋白恒定區。進一步詳細資料請參考 Jones 等人，*Nature* 321：522~525(1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332：323~329(1988)和 Presta，*Curr. Op. Struct. Biol.* 2：593~596(1992)。

此處名詞"單株抗體"或"單株抗體組成物"意指單一分子組成物的抗體分子製劑。一單株抗體組成物對特定抗原決定部位具有單一結合專一性和親和力。因此，"人類單株抗體"一詞指具有衍自人類胚系免疫球蛋白序列之可變和恒定區之展現單一結合專一性的抗體。可藉由雜交瘤產生該人類單株抗體，其包括獲得自轉殖基因或轉染色體之非

人類動物如轉殖基因小鼠的B細胞，其具有融合至一永生化細胞之含有人類重鏈轉殖基因和輕鏈轉殖基因的基因組。

此處"重組人類抗體"一詞包括藉由重組方法製備、表現、產生或分離的全部人類抗體，例如(a) 分離自具有轉殖基因或轉染色體之人類免疫球蛋白基因的動物(例如小白鼠)或製備自其雜交瘤的抗體(將進一步說明)；(b) 分離自轉化至表現該抗體之宿主細胞的抗體，例如從轉染瘤；(c) 分離自重組、組合人類抗體庫的抗體；以及(d) 藉由任何涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪切成其他 DNA 序列之其他方法所製備、表現、產生或分離的抗體。此類重組人類抗體具有衍自人類胚系免疫球蛋白序列的可變和恒定區。然而，在某些具體實施例中，此類重組人類抗體可進行體外的突變(或者當使用人類 Ig 序列的轉殖基因動物時可在體內進行突變)以及因此該重組抗體之 VH 和 VL 區的胺基酸序列可被定序，其雖然衍自及與人類胚系 VH 和 VL 序列有關但非天然存在於體內的人類抗體胚系族群中。

"非人類轉殖基因動物"一詞指具有含一或多個人類重鏈及/或輕鏈轉殖基因或轉染色體之基因組(整合或未整合入該動物的天然基因組 DNA)及能表現全部人類抗體的非人類動物。例如，一轉殖基因小白鼠具有一人類輕鏈轉殖基因及一人類重鏈轉殖基因或人類重鏈轉染色體，因此該小白鼠當以 CD20 抗原及/或表現 CD20 之細胞免疫時可產生人類抗-CD20 抗體。該人類重鏈轉殖基因如同轉殖基因

小白鼠可被整合入該小白鼠的染色體 DNA 內，例如 HCo7 或 HCo12 小白鼠之 HuMAb-Mouse®，或該人類重鏈轉殖基因可如同 WO 02/43478 中所述轉染色體 KM-Mouse®被維持於染色體外。此類轉殖基因和轉染色體小白鼠(此處統稱為"轉殖基因小白鼠")藉由 V-D-J 重組及同種型轉換能產生針對一已知抗原的多重同種型人類單株抗體(例如 IgG、IgA、IgM、IgD 及/或 IgE)。亦可藉由導入編碼此類專一性抗體的基因使用轉殖基因、非人類動物於製造對抗特定抗原的抗體，例如藉由將該基因連接至表現於動物乳汁內的基因。

可被預防及/或治療的腫瘤性疾病(癌症)包括 B 細胞淋巴瘤如非何杰金氏淋巴瘤(NHL)；前驅 B 細胞淋巴母細胞白血病/淋巴瘤以及成熟 B 細胞腫瘤如 B 細胞慢性淋巴性白血病(CLL)/小淋巴球淋巴瘤(SLL)；B 細胞前淋巴球性白血病；淋巴漿細胞樣淋巴瘤；被套細胞淋巴瘤(MCL)；濾泡型淋巴瘤(FL)，包括低度、中度和高度 FL；皮膚濾泡中心細胞淋巴瘤；邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 型、結節和脾臟型)；髮樣細胞白血病；瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤；伯基特淋巴瘤(Burkitt's)；漿細胞瘤；漿細胞骨髓瘤；移殖後淋巴增生性疾病；瓦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's)；間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)；T-細胞非何杰金氏淋巴瘤；以及何杰金氏淋巴瘤。

發明之詳細說明

由於腫瘤通常為非免疫原性，因此臨床前研究著重於IL-18與單株抗體的組合療法。結合兩種各具有不同殺腫瘤機制的不同藥物可產生協同的抗腫瘤活性。下文中將說明IL-18組合療法的實例。

實例1為使用IL-18結合Rituxan®於人類B-細胞淋巴瘤。此試驗的目的為評估IL-18與Rituxan®的組合物在人類B細胞淋巴瘤模式中是否優於單獨IL-18或Rituxan®的單一療法。IL-18與單株抗體例如與IL-18和利妥昔單抗(Rituxan®)的組合物在惡化期腫瘤模式(SCID小白鼠異種移植)中具有協同的抗腫瘤活性。由於利妥昔單抗僅結合至表現CD20的人類腫瘤細胞，因此在SCID小鼠的人類淋巴瘤異種移植模式中測定其抗腫瘤活性。

另一實例係評估IL-18結合其他臨床上有關癌症療法是否具有優於單一療法的強化抗腫瘤活性。我們目前已證實ofatumumab在Ramos人類異種移植模式的組合療法中與IL-18具有協同效應。因此抗-CD20抗體與IL-18的組合優於單獨以IL-18或抗-CD20抗體的單一療法。

結合單株抗體可強化殺死腫瘤的ADCC機制。對抗CD20的抗體在結合mIL-18(序列辨識編號：17)時可增強抗腫瘤活性。許多機制例如Rituxan®可增強其效力；然而，累積的證據認為ADCC在投予Rituxan®之後扮演消滅腫瘤細胞的關鍵角色。當一抗體的恒定區(Fc)結合至效應細胞如天然殺手(NK)細胞或單核細胞/巨噬細胞系列的表面上

Fc 受體時可觸發 ADCC。一項無 Fc 受體的小白鼠試驗顯示未產生 Rituxan®對人類 B 細胞淋巴瘤的效應(Uchida 等人，2004；199(12)：1659)。因此，具有 Fc 受體的效應細胞為 Rituxan®是否發揮效力的關鍵。CD16(Fcγ RIIIA)為人類的重要 Fc 受體，其被表現於 NK 細胞和巨噬細胞。實例 1 的數據證明 NK 細胞介導的 ADCC 對以 Rituxan®治療淋巴瘤病人的效果極為重要。

一項用於改善 Rituxan®效力的有效方法為投予如 IL-18 的細胞活素，其可導致具有 Fc 受體之效應細胞包括 NK 細胞和單核細胞/巨噬細胞系列的擴增及/或活化。實例 1 中以 IL-18 結合 Rituxan®的臨床前小白鼠腫瘤模式試驗顯示其效果優於單一療法。在此模式中，由於需要僅具有 NK 功能細胞之 SCID 免疫缺陷小白鼠內的人類異種移植，因此無法測定 IL-18 的全部效益。實例 1 的數據證明這些 ADCC NK 效應細胞的擴增有利於 IL-18 和 Rituxan®的組合。Rituxan®在單一療法的最高測試劑量時具有活性。然而，當結合 mIL-18(序列辨識編號：17)時以較低的 Rituxan®劑量即可獲得相同程度的活性，此可證明兩種模式均對 Rituxan®機制具有敏感性及藉由 IL-18 可增強其反應。此外，此處(第 9、10 圖)另一種抗-CD20 抗體(ofatumumab，HuMax-CD20)與 IL-18 具有類似的協同效應。因此認為結合 IL-18 與任何其他抗-CD20 抗體將具有相同的協同效應。

實例 3 為評估 IL-18 結合利妥昔單抗於具有 CD20+ B 細胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)病人體內之安全性和生物活

性的第 I 期臨床試驗。此試驗使用利妥昔單抗結合上升 IL-18 劑量的標準治療法以在選定生物指標之下(例如活化 NK 細胞)鑑定產生最大生物效應的安全和可忍受劑量。若作為單一療法的 IL-18 劑量對轉移性黑色素瘤病人具有安全性和忍受性時，則此試驗中的組合物將不會達到其最大耐受劑量(MTD)；然而，此試驗係藉由鑑定非何杰金氏淋巴瘤病人的劑量限制性毒性而定義其 MTD。

實例 1 的數據顯示結合抗腫瘤劑與 IL-18 具有臨床上的效益，其原因為該組合物可提供兩種不同的作用機制：其一為對腫瘤細胞的直接效應，同時 IL-18 可強化病人的免疫細胞。由於 IL-18 可產生免疫記憶反應，因此該兩種機制可互補而產生長效而極佳的抗腫瘤活性。整體而言，實例 1 證明 IL-18 與 CD20 抗體的組合可產生協同的極佳活性。

人類 IL-18 多肽揭示於 EP0692536A2、EP0712931A2、EP 0767178A1 和 WO 97/2441。初始人類 IL-18(hIL-18)的胺基酸序列說明於序列辨識編號：16。人類 IL-18 多肽係干擾素-γ-誘導多肽。其在細胞性免疫的誘導上扮演重要角色，包括誘導 T 細胞和脾臟細胞產生干擾素-γ、加強 NK 細胞的殺滅活性，以及促進初始 CD4+ T 細胞分化成 Th1 細胞。

IL-18 多肽

可藉由已知方法從重組細胞培養收獲及純化本發明的

IL-18 多肽，包括硫酸氨或乙醇沈澱法、酸萃取法、陰離子或陽離子交換層析法、磷酸纖維素層析法、疏水性交互層析法、親和性層析法、羥基磷灰石層析法、植物血凝素(lectin)層析法和高效液態層析法。處理細胞內合成、分離及/或純化過程中的變性多肽時可利用蛋白復性的已知技術再形成活性構型。純化和產生人類 IL-18 的方法說明於 WO 01/098455。

本發明亦提供含有人類 IL-18 多肽(序列辨識編號:16)的醫藥組成物。此類組成物含有治療有效量的化合物以及進一步含有醫藥上可接受載劑、稀釋劑或賦形劑。此類醫藥載劑可為滅菌液體例如含有石油、動物、植物或合成的水和油如大豆油、礦油、芝麻油等。當靜脈投予該醫藥組成物時可利用水作為載劑。食鹽溶液、含水葡萄糖和甘油溶液亦可被用作為例如注射用的液體載劑。適合的醫藥賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽糖、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化鈉、乾脫脂乳、甘油、丙二醇、水、乙醇等。需要時該組成物亦可含有微量的濕潤劑、乳化劑或 pH 緩衝劑。這些組成物的型態可為溶液、懸浮液、乳液、錠劑、藥丸、膠囊、粉末、緩釋配製物等。該組成物可利用習知黏合劑和載劑如三酸甘油脂被配製成栓劑。口服配製物含有標準化載劑例如醫藥級的甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。適當醫藥載劑的實例已述於 E.W. Martin 的*雷明登製藥科學*。此類組成物含有通常為純

化之治療有效量的化合物以及適量的載劑而可形成適合投予至病人的劑型。該配製物必需配合其投藥模式。

在本發明的一具體實施例中，根據適合用於靜脈投予至人類之醫藥組成物的例行途徑配製該組成物。通常，用於靜脈投藥的組成物為滅菌等張水性緩衝液內的溶液。適當時該組成物亦可含有助溶劑及例如利都卡因(lignocaine)的局部麻醉劑以減輕注射部位的疼痛。通常，其成分可分開施予或被混合成單一劑型例如置於註明活性劑含量之密封容器如安瓿瓶或藥包內的冷凍乾燥粉末或無水濃縮物。當利用滴注法投予該組成物時，其可被分散於含有滅菌醫藥級水或食鹽水的滴注瓶內。當藉由注射投予該組成物時，可提供用於注射的安瓿滅菌水或食鹽水而在投藥前混合各種成分。

因此，該多肽可被用於製造一藥物。本發明的醫藥組成物可被配製成用於腸道外投予的溶液或冷凍乾燥粉末。在使用前可加入適當的稀釋劑或其他醫藥上可接受載劑而重構該粉末。液體配製物可為經緩衝等張含水溶液。適當稀釋劑的實例為生理等張食鹽溶液、水或緩衝醋酸鈉或氨溶液內的標準化 5%葡萄糖。此類配製物特別適合用於腸道外投藥，但亦可被用於口服或被置入計量吸入器或用於灌氣的噴霧器內。此類醫藥組成物較佳為加入賦形劑例如聚乙烯吡咯啶酮、明膠、羥基纖維素、阿拉伯膠、聚乙二醇、甘露糖醇、氯化鈉或檸檬酸鈉。

或者，該多肽可被製成用於口服投予的膠囊、錠劑或

乳液或糖漿。可加入醫藥上可接受固體或液體載劑以增強或穩定該組成物，或便於製備該組成物。固體載劑包括澱粉、乳糖、二水硫酸鈣、石膏粉、硬脂酸鎂或硬脂酸、滑石粉、果膠、阿拉伯膠、瓊脂或明膠。液體載劑包括糖漿、花生油、橄欖油、食鹽水和水。該載劑亦可含有一遲釋型材料例如單獨的單硬脂酸甘油酯或雙硬脂酸甘油酯或混合石蠟。固體載劑有不同的含量，但每劑量單位通常介於約20毫克至約1克之間。根據習知製藥技術配製該醫藥製劑其包括利用研磨、混合、顆粒化和擠壓製成錠劑；或研磨、混合和充填製成凝膠硬膠囊。當使用液體載劑時，其將被製成糖漿、酏劑、乳液，或含水或不含水懸浮液。此類液體配製物可直接經口(口服)被投藥，或被充填入凝膠軟膠囊內。

人類IL-18多肽可被製成含有效量多肽之醫藥上可接受載劑內之活性成分的醫藥組成物。在本發明的組成物中，可使用含有該經緩衝成生理pH之注射即用型多肽的含水懸浮液或溶液。該用於腸道外投藥的組成物通常含有本發明多肽的溶液或其溶解於醫藥可接受載劑如含水載劑的混合物。可使用各種的含水載劑例如0.4%食鹽水、0.3%甘胺酸等。這些溶液通常經過滅菌並且不含有雜質。可藉由習知的滅菌技術(例如過濾)進行這些溶液的滅菌。該組成物含有使其接近生理條件所需的輔助物質例如pH調節劑和緩衝劑等。本發明之多肽在此類醫藥配製物內有極寬廣的範圍濃度，即從低於約0.5%，通常在或至少約1%至

15 或 20%重量比以及主要根據液體容積、黏度等，或選擇特定的投藥模式。

因此，製成之用於肌肉注射的本發明醫藥組成物可含有 1 毫升的滅菌緩衝液以及介於約 1 奈克至約 100 毫克的本發明多肽，例如約 50 奈克至約 30 毫克，或從約 5 毫克至約 25 毫克。同樣，製備用於靜脈注射的本發明醫藥組成物可含有約 250 毫升的林格氏液以及約 1 毫克至約 30 毫克或從約 5 毫克至約 25 毫克的本發明多肽。已習知腸道外投藥組成物的製備方法或為本領域技術人員所顯而易見以及更詳細說明於例如*雷明登製藥科學*第 15 版，Mack 出版公司，賓州 Easton 市。

本發明多肽當被製成醫藥製劑時可為單位劑型。本領域技術人員可輕易地測定其適當的治療有效劑量。醫生可在反應期的適當間隔時間投與此劑型。此外，可選擇性地利用體外檢測法鑑定其最適當的劑量範圍。正確的配製物使用劑量亦將視投藥途徑及疾病或障礙的嚴重程度而定，以及取決於醫生的判斷和各別病人的狀況。可從體外劑量反應曲線或動物模式測定系統推論其有效劑量。

被投予至一病人之多肽的劑量一般為 0.1 毫克/公斤至 100 毫克/公斤的病人體重。投予至一病人的劑量可介於 0.1 毫克/公斤和 20 毫克/公斤病人體重之間，或者在 1 毫克/公斤至 10 毫克/公斤病人體重之間。通常，由於對抗外來多肽的免疫反應，人類多肽在病人體內比來自其他品種的多肽有較長的壽命。因此，可投予較低劑量的人類多肽及

較少的投藥頻率。此外，藉由舉例如脂化的改良可提高多肽的吸收和組織穿透力(例如，進入腦內)而降低本發明多肽的劑量和投藥頻率。

本發明亦提供含有充填一或多種本發明醫藥組成物之成分的一或多個容器之包裝或套組。此類容器視需要可標示政府機關管理藥物或生物產品之製造、使用或銷售的有關許可資料。在本發明的另一具體實施例中，一套組提供用於治療一特定適應症所需劑量之適當數目的容器。

在另一具體實施例中，該化合物或組成物可在特別指脂質體的微泡(vesicle)內被傳遞(請參考 Langer，Science 249：1527~1533(1990)；Treat 等人，*脂質體於傳染性疾病和癌症的治療*，Lopez-Berestein 和 Fidler(編輯)Liss，紐約第 353~365 頁(1989)；Lopez-Berestein，同書，第 317~327 頁；通常見於同書)。

在又另一具體實施例中，該化合物或組成物可在控釋系統內被傳遞。在一具體實施例中，可利用一泵浦(請參考 Langer，如上；Sefton，*CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14：201(1987)；Buchwald 等人，*Surgery* 88：507(1980)；Saudek 等人，*N. Engl. J. Med.* 321：574(1989))。在另一具體實施例中，可利用聚合材料(*控釋劑型的醫學應用*，Langer 和 Wise(編輯)，CRC 出版社，佛州 Boca Raton 市(1974)；*控釋藥生物可利用率、藥物產品設計和性能*，Smolen 和 Ball(編輯)，Wiley 紐約(1984)；Ranger 等人，*J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23：61(1983)；亦請看 Levy 等

人，*Science* 228：190(1985)；During 等人，*Ann. Neurol.* 25：351(1989)；Howard 等人，*J. Neurosurg.* 71：105(1989))。在又另一具體實施例中，控釋系統可被置於治療標靶即腦部附近而使其僅需使用部分全身劑量(請參考例如 Goodson 於*控釋劑型的醫學應用*，如上，第 2 卷第 115~138 頁(1984))。其他控釋系統被討論於 Langer 的綜述(*Science* 249：1527~1533(1990))。

可藉由任何適當內部途徑投予人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)，以及需要時可被重複投予例如每天一至三次於一天至約三週至每週一次或每兩週一次。或者，可改變該胜肽以降低電荷密度而因此提高口服生物可利用率。治療的劑量和期間與本發明分子在人類循環內的時間有關，以及本領域技術人員可視被治療的疾病和該病人的一般身體狀況而調整。

本發明藉由將有效量之含有人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)的本發明化合物或醫藥組成物投予至一人類病人而提供治療、抑制和預防的方法。在本發明的一具體實施例中，該化合物為實質上純化(例如，實質上無限制其效應或產生不良副作用的物質)。投予的配製物和方法可利用含有上述多肽的化合物；其他投予的適當配製物和途徑可選自下文中所述者。

已知各種的傳遞系統以及可被用於投予本發明的化合物，例如被膠囊化入脂質體、微顆粒、微膠囊、能表現該化合物的重組細胞、受體介導胞吞作用(請參考例如 Wu 等

人，*J. Biol. Chem.* 262：4429~4432(1987))、構建核酸成為逆轉錄病毒或其他載體的一部分等。導入的方法包括，但不侷限於皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內、皮下、鼻腔內、硬脊膜外，以及口服途徑。可藉由任何習知的途徑投予該化合物或組成物，例如藉由輸注或點滴注射、藉由通過上皮或黏膜與皮膚內層的吸收(例如，口腔黏膜、直腸和腸黏膜等)以及可與其他生物活性劑共同被投予。該投藥可為全身性或局部性。此外，較佳為藉由任何適當途徑將本發明的醫藥化合物或組成物導入中樞神經系統，包括腦室內和鞘內注射；腦室內注射可利用例如連接至一容器的腦室內導管，例如 Ommaya 裝置。亦可利用肺內投藥法，例如藉由吸入器或噴霧器，以及含有霧化劑的配製物。

抗-CD20 抗體

熟習本領域一般技藝的醫生或獸醫可輕易地測定和開出含有抗-CD20 抗體之醫藥組成物的有效劑量。例如，醫生或獸醫可先使用低於所欲治療效應之本發明醫藥組成物內化合物的劑量然後逐漸增加劑量直至達到所欲效果為止。通常，本發明化合物的適當每日劑量為可產生治療效應的最低化合物有效劑量。較佳的給藥方法為經由靜脈內、肌肉內、腹腔內，或皮下。需要時，該治療組成物的每日有效劑量可被分成於當日適當間隔時間投予 2、3、4、5、6 或更多次之單位劑型的次劑量。抗-CD20 抗體雖然可被單獨投藥，但是其較佳為以醫藥配製物(組成物)的化合

物型式被投藥。

在一具體實施例中，藉由 10 至 2000 毫克/平方米的每週滴注劑量投予根據本發明的人類單株抗體，通常為 10 至 500 毫克/平方米，例如 200 至 400 毫克/平方米如 375 毫克/平方米。此類給藥可被重複例如 1 至 8 次，如 3 至 5 次。該給藥可藉由從 2 至 24 小時的連續滴注時間，例如從 2 至 12 小時。

在另一具體實施例中，為降低毒性的副作用該抗體可在例如超過 24 小時的一段較長時間藉由緩慢連續滴注法被投藥。

在又另一具體實施例中，該抗體的給藥為使用從 250 至 2000 毫克的每週劑量，舉例如 300、500、700、1000、1500 或 2000 毫克分成高至 8 次例如從 4 至 6 次被投藥。該投藥可藉由連續滴注從 2 至 24 小時，例如從 2 至 12 小時的一段時間。需要時此類方法可被重複一或多次，例如在 6 或 12 個月之後。可藉由投予生物樣本內利用靶向該抗-CD20 抗體的抗特異性抗體測定循環抗-CD20 抗體的數量以評估或調整該劑量。

在又另一具體實施例中，藉由維持療法投予該抗體，舉例如每週一次達 6 個月或更長的時間。

本發明亦可為其他具體的特定劑型而不偏離其精神或基本屬性，以及因此本發明的範圍必需參照申請專利範圍附件而非上述的說明或其實例。

辭彙解釋

提供下列的定義以助於瞭解經常用於上文中的某些名詞。

此處“抗體依賴細胞介導性細胞毒性(ADCC)”和“抗體依賴細胞介導性細胞毒性(ADCC)效應細胞功能”均指細胞介導性免疫的機制，因此免疫系統的一效應細胞可溶解已被專一性抗體結合的一標靶細胞。ADCC 為體液免疫反應的機制之一，經由此抗體可限制和包含感染物。典型 ADCC 係被天然殺手細胞(NK)所介導，但一另類 ADCC 被嗜酸性白血球用於殺死習稱為蠕蟲的某些寄生蠕蟲。由於 ADCC 依賴先前的抗體反應因此係適應性免疫反應的一部分。

典型 ADCC 涉及 NK 細胞的活化以及藉由 NK 細胞表面的 Fc 受體辨識抗體包覆感染細胞。該 Fc 受體辨識結合至抗原感染標的細胞表面之抗體如 IgG 的 Fc(恒定)部分。存在於 NK 細胞表面的 Fc 受體被稱為 CD16 或 FcγRIII。IgG 一旦被結合至 Fc 受體，該天然細胞可釋出例如 IFN-γ 的細胞活素及例如穿孔素(perforin)和顆粒酶(granzyme)的細胞毒素而可進入該標靶細胞及藉由觸發細胞凋亡加速細胞的死亡。此 ADCC 效應細胞功能類似但獨立於藉由細胞毒素 T 細胞(CTLs)的反應。

此處”載劑”一詞指與治療劑被共同投藥的稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

“分離”意指”藉由人工”從其原始環境的天然狀態中被改變或取出。例如，天然存在於活生物體內的多核苷酸或

多肽稱為未"分離"，但是分離自天然狀態之至少其一共存細胞材料的相同多核苷酸或多肽則為被"分離"。此外，藉由轉殖、基因操作或任何其他重組方法被導入一生物的多核苷酸或多肽即使其仍存在於該生物中仍被稱為"分離"，該生物可為存活或死亡。

此處"醫藥上"一詞指本發明可應用於包括獸醫的領域。此處"治療有效劑量"指可用於緩解一選定疾病之治療劑的數量。

此處"醫藥上可接受"一詞指被聯邦或州政府的管理機關所核准或被列於適用於特別指人類之動物的美國藥典或其他一般被認可之藥典內。

"多肽"指含有二或多個藉由肽鍵或經修飾肽鍵相互連接之胺基酸，即肽同電異構物的任何多肽。"多肽"指通常稱為胜肽、寡肽或低聚物的短鏈以及通常稱為蛋白質的長鏈。多肽含有除了20個基因編碼胺基酸之外的胺基酸。"多肽"包括藉由天然方法例如轉譯後程序或技術中習知化學修飾法被修飾的胺基酸序列。此類修飾已被詳述於基礎參考書和專題論文以及大量的研究文獻中。修飾可發生於多肽內的任何位置，包括肽主鏈、胺基酸側鏈和胺基或羧基端。將瞭解可發生相同或不同程度的相同類型修飾作用於一已知多肽的許多位點。同樣，一已知多肽可具有許多類型的修飾作用。多肽可為泛蛋白化(ubiquitination)造成的分枝，以及其可為有或無分枝的環狀。環狀、分枝和分枝環狀多肽可導因於轉譯後自然過程或可藉由合成法被製造。

修飾作用包括乙醯化、醯化、ADP-核糖化、醯胺化、生物素化、核黃素的共價鍵連接、原血紅素基團的共價鍵連接、核苷酸或核苷酸衍生物的共價鍵連接、脂質或脂質衍生物的共價鍵連接、磷脂醯肌醇的共價鍵連接、交聯、環化、雙硫鍵形成、去甲基化、形成共價鍵交聯、形成胱胺酸、形成焦麩胺酸鹽、甲醯化、γ-羧基化、糖基化、形成 GPI 錨定、羥基化、碘化、甲基化、肉荳蔻酸化、氧化、蛋白質融解作用、磷酸化、戊二烯基化、外消旋化、硒基化、硫化、胺基酸至蛋白質的轉-RNA 介導加入如精胺醯基化，以及泛蛋白化(請參考例如*蛋白構造及分子性質*，第二版，T.E. Creighton，W.H. Freeman 公司，紐約，1993；Wold, F.，*轉譯後的蛋白質修飾作用：透視和展望*，1~12，於*蛋白的轉譯後共價修飾作用*，B.C. Johnson 編輯，校園出版社，紐約，1983；Seifter 等人，*Meth. Enzymol.* 182：626~646，1990；Rattan 等人，*Ann. NY Acad. Sci.* 663：48~62(1992))。

【實施方式】

<u>生物學方法/實例</u>

實例 1：鼠人類 B-細胞淋巴瘤模式中 IL-18 與 Rituxan® 組合療法的試驗計畫

人類 IL-18(序列辨識編號：16)係一種表現於大腸桿菌非病原株的重組成熟型人類白介素-18。IL-18 為具有主要構造極接近 IL-1 三葉肽子族的一種未糖基化 18Kd 單聚體。鼠和人 IL-18 cDNA 編碼由 192 和 193 個胺基酸構成

的前驅蛋白(分別為序列辨識編號：17 和 16)。Pro-IL-18 為調節其生物活性必需被凋亡蛋白酵素(caspases)處理成生物活性鼠蛋白(157 個胺基酸)。人和鼠 IL-18 之間的相似度為 65%。在下述的臨床前試驗中為了提供可分析 IL-18 的完全免疫潛力的體內協同系統而使用鼠 IL-18(序列辨識編號：17)。

在缺乏 T 和 B 細胞的遠親雌性同質 SCID 小白鼠(ICR-Prkdc^{scid})中進行此試驗。此非近交品系優於近交系的理由為不產生滲漏(即使於 10~12 月齡小白鼠)。

小白鼠被注射取自患有伯基特淋巴瘤的 3 歲病人之人類 Ramos B-細胞淋巴瘤株(ATCC 目錄，CRL 1596)。將 1：10 腫瘤均質液以每隻 0.5 毫升的劑量接種入 6~8 週齡小白鼠。每週測量 2~3 次的腫瘤體積，以及將小白鼠隨機分配至各治療組而使各種具有相同的腫瘤體積分佈。當每組的中數腫瘤體積到達 80~150 立方毫米時(在接種腫瘤後第 12 天)開始進行治療。此外，試驗排除腫瘤體積超出設定範圍的小白鼠。

在第一項試驗中，該治療組(數目=6)包括對照組(未治療)、三種 Rituxan®劑量靜脈單一治療組(分別為 12.5、25 和 50 微克每週兩次)、鼠 IL-18 皮下單一治療組(每天 100 微克/隻)，以及各接受每天 100 微克/隻 IL-18 皮下及分別加上 12.5、25 或 50 微克/隻 Rituxan®靜脈的三隻組合治療組。

在第二項試驗中，該投藥係每天一次的 100 微克/隻

mIL-18(序列辨識編號：17)以及每天 4/3 的 25 和 12.5 微克 Rituxan®。為提高統計顯著性意義，動物數目增加至 n=12。每週利用游標卡尺測量腫瘤體積二至三次。

人類 B-細胞淋巴瘤模式中證明 IL-18 和 Rituxan®的組合療法較優於單獨 IL-18 或 Rituxan®的單一療法。下述兩種試驗的詳細資料顯示組合療法在此模式中具有統計學上的顯著性差異。

第一項試驗的第 3 圖中，Rituxan®(100 微克/劑)的高劑量單藥療法具有強效抗腫瘤活性，而較低劑量 Rituxan®(12.5 微克/劑)則不具活性。鼠 IL-18(序列辨識編號：17)以單藥劑(100 微克/劑)時不具有活性。然而，較低劑量的 Rituxan®與 IL-18(序列辨識編號：17)的組合則具有加成/協同活性(12.5 微克/劑的 Rituxan®結合 100 微克的 mIL-18(序列辨識編號：17)。第 4 和 5 圖為利用 GraphPad Prism® 軟體繪圖和分析資料的統計學顯著性。在第 4 圖的圖 1 中，在植入後第 19 天比較其腫瘤體積。統計分析顯示與未治療對照組比較全部治療組均明顯縮小腫瘤的生長體積(*p< 0.05，**p<0.01，***P<0.001)。第 5 圖的圖 2 中，顯示組合治療較單一療法更為有效(統計顯著性，*p<0.05，**p<0.01)。

在第二項試驗中，動物數目從 n=6 增加至 n=12 以測定對組合療法之加成/協同抗腫瘤活性反應的統計顯著性。第 6A 和 6B 圖為中數和平均腫瘤生長體積。第 7 和 8 圖為植入後第 27 天之腫瘤體積的統計分析。該資料可證明

與單獨 Rituxan®(25 微克/隻)或單獨 mIL-18(序列辨識編號：17)的單一療法(100 微克/隻)比較以組合療法(25/100 微克/隻)治療之小白鼠可明顯減少其在統計學上的腫瘤體積。

此前臨床資料證明 IL-18 與利妥昔單抗的組合具有協同抗腫瘤活性。作為單一療法的利妥昔單抗在高測試劑量時具有活性。然而，當利妥昔單抗結合鼠 IL-18 時可使用較低的劑量獲得相同程度的活性而顯示此模式對利妥昔單抗具有敏感性並且可利用 IL-18 增強其活性。推測鼠 IL-18 增強利妥昔單抗活性的原因為 NK 細胞的 ADCC 活性被增強。由於 SCID 小白鼠缺乏 B 和 T-細胞反應，因此可經由 NK-細胞的活化而增強 IL-18 的抗腫瘤反應。

實例 2：人類淋巴瘤異種移植模式中 IL-18 與 ofatumumab 的組合療法

我們的目標為測定以 IL-18(鼠)與 ofatumumab 的組合療法在治療皮下人類 Ramos 淋巴瘤(異種移植於 SCID 小白鼠)時是否具有協同抗腫瘤活性。

背景和方法

- 在常用的 Ramos 人類淋巴瘤異種移植模式(亦稱為"實質瘤"模式，或"皮下腫瘤"模式)中測定 ofatumumab 單株抗體的劑量-反應關係。
- 將 Ramos 淋巴瘤均質液(0.5 毫升來自 SCID 雌小鼠供體的 1：8 均質液)在第 0 天皮下注射至 SCID(ICR 背景，

Taconic 公司)。觀察小白鼠以及利用測徑器每週測定兩次腫瘤體積。利用下列公式計算腫瘤體積：$(0.5xL)xW^2$(L=腫瘤長度，W=腫瘤寬度)。

- 在植入後第 17 天當大部分腫瘤體積到達約 100~150 立方毫米時將小白鼠隨機分配至治療組(試驗中排除較大/較小體積的小鼠)。每週靜脈投予兩次 ofatumumab，以及每天靜脈投予一次 IL-18 細胞活素。治療組列於表 1(如下)。此試驗中每組使用 6 隻小鼠。
- 從該模式中讀取測量腫瘤體積以及治癒/消退/未治癒腫瘤的%。
- 連續三次測量腫瘤體積<10 立方毫米定義為被治癒小鼠。連續三次測量時其腫瘤體積<初始體積的 50%定義為部分消退小鼠。腫瘤體積未改善(如上所述)的小鼠定義為未治癒小鼠。

表 1

組別	小鼠數	每天 IL-18 皮下(微克)	每週兩次 ofatumumab 靜脈(微克)
1	6	0	5
2	6	0	25
3	6	0	50
4	6	100	5
5	6	100	25
6	6	100	50
7	6	100	0
8(載劑)	6	0	0

第 9 圖顯示 ofatumumab(Humax-CD20®)單一療法或結合 IL-18 對 SCID 小白鼠皮下 Ramos 人類淋巴瘤生長的效

力(n=6 隻/組；平均和偏準偏差)。此外，亦顯示%治癒、%消退和%未治癒小白鼠的資料。其定義已說明於(上述)方法中。

第 9 圖由於無法收集雙因子變異數分析(ANOVA)所需要的全部組在全部時間點的全部數據，因此無法被統計分析。其原因為由於安樂死(腫瘤體積達到預定基準)或自然死亡所造成小白鼠耗損(而因此喪失資料點)的腫瘤試驗性質。因此，在選定時間點統計分析腫瘤體積資料：在試驗的第 28 天。選擇此時間點的原因為來自全部治療組的腫瘤體積資料為該試驗的最後時間點(此時由於人道的理由(腫瘤過大)將載劑組安樂死)。

第 10 圖顯示 Ramos 人類淋巴瘤模式中利用皮下注射 ofatumumab 的單一療法或結合 IL-18 在接種後第 28 天對 SCID 小鼠的效應(n=6 隻/組；平均±標準偏差)。對數轉換資料通過參數檢驗程序的全部標準。

結 論(對數轉換資料的參數分析)

獲得的資料證明以 ofatumumab 單株抗體(mAb)的單一療法對 Ramos 淋巴瘤的生長產生可察覺的抑制效應，但是此生物效應不具統計學上顯著性。然而，當結合細胞活素 IL-18 進行治療時可被明顯強化。ofatumumab 單株抗體與 IL-18 的組合治療在全部投藥組中的腫瘤生長明顯被延遲，其中以最高劑量(50 微克/隻 ofatumumab+100 微克/隻 IL-18)的治療組最為明顯($p<0.001$)。最高劑量混合組(50/

100)亦明顯比全部 ofatumumab 單一治療組和 IL-18 單一治療組有較佳的結果。

簡言之，ofatumumab 與 IL-18 的組合療法在 Romos 人類異種移植模式中具有協同作用。資料顯示劑量依賴的抗腫瘤活性，以 IL-18 與利妥昔單抗的組合療法對異種移植腫瘤具有類似的治療效應。

實例 3：IL-18 結合利妥昔單抗的第 I 期臨床試驗計畫

第 I 期為 IL-18 結合標準利妥昔單抗療法之 12 週上升劑量人類 IL-18(1 至 100 微克/公斤)對 CD20+ B 細胞 NHL 病人之安全性和忍受性調查的開放標簽、劑量遞增試驗。交錯式投予利妥昔單抗和人類 IL-18。因此，患者在 1 至 4 週的第 1 天每週靜脈滴注利妥昔單抗(375 毫克/平方米)。在 1 至 4 週的第 2 天及在 5 至 12 週的第 2 天(±1 天)每週靜脈滴注人類 IL-18。人類 IL-18 的初始劑量為 1 微克/公斤，以及將劑量逐漸增加至 100 微克/公斤的額定最高劑量。

各組群中一病人的第一劑量以第 1 天投予利妥昔單抗和第 2 天投予人類 IL-18 的方法被交錯投藥然後在院內至少觀察 24 小時。若未發生安全或容忍性問題時，該組內下一位病人在至少 24 小時後被投藥以及在其人類 IL-18 第一劑量之後亦在院內觀察 24 小時。在其後數週(第 2 至 12 週)，病人在投予人類 IL-18 後被觀察 6 小時然後離開診所。全部病人的投藥至少相隔 2 小時。任何組群中病人的投藥每天不超過兩位。

以第一劑量濃度(1微克/公斤/週)治療三位病人。若完成該組群投藥之後(即，全部三位病人已完成第1至6週的試驗)未產生大於"疑似"或"可能"與試驗藥物有關的第2級毒性，則以下列劑量濃度治療各其後組群中的三位病人：3微克/公斤/週、10微克/公斤/週、20微克/公斤/週、30微克/公斤/週，和100微克/公斤/週。

就利妥昔單抗的滴注而言，從開始至結束滴注的完成劑量傳遞時間必需不超過4小時。在2小時的過程中完成人類IL-18的滴注。

此試驗的目標為測定人類IL-18結合標準利妥昔單抗用於治療CD20+ B細胞淋巴瘤病人時該人類IL-18在安全上的最高生物有效劑量。為評估在先前第I期試驗中為鐘形的人類IL-18劑量-反應關係，將使用1至100微克/公斤的劑量範圍以測定對CD20+ B細胞淋巴瘤病人之生物活性範圍的較低(低限)和較高(中或高限)劑量。

該利妥昔單抗劑量為核准用於CD20+ B細胞NHL病人的標準推薦劑量。根據先前第I期的安全性、藥物動力學、藥效學資料從腎細胞癌和轉移性黑色素瘤病人的試驗選擇人類IL-18的劑量。Robertson等人，*J. Clin. Oncol.* 22：176s(摘要2553)(2004)；Robertson等人，*J. Clin. Oncol.* 23：169s(摘要2513)(2005)；Koch等人，*J. Clin. Oncol.* 23：174s(摘要2535)(2005)；Koch等人，*Eur. J. Cancer* 4(12)：86(270)(2006)。在最高劑量試驗中，每週投予2000微克/公斤高達24週時不造成明顯的毒性而無法確認其最大容

忍劑量；因此，此試驗利用其藥效學資料選擇其劑量範圍的上限。

SEQ ID：1	2F2 V_H	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGL EWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT ISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTA LYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID：2	2F2 V_L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPI TFGQGTRLEIK
SEQ ID：3	2F2 V_H CDR1	DYAMH
SEQ ID：4	2F2 V_H CDR2	TISWNSGSIGYADSVKG
SEQ ID：5	2F2 V_H CDR3	DIQYGNYYYGMDV
SEQ ID：6	2F2 V_L CDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID：7	2F2 V_L CDR2	DASNRAT
SEQ ID：8	2F2 V_L CDR3	QQRSNWPIT
SEQ ID：9	11B8 V_H CDR3	DYYGAGSFYDGLYGMDV
SEQ ID：10	2F2 V_H CDR1~CDR3	DYAMHWVRQAPGKGLEWVSTIS WNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DIQYGNYYYGMDV
SEQ ID：11	2C6 V_H CDR3	DNQYGSGSTYGLGV
SEQ ID：12	人類 V_H DP-44 /D3-10/JH6b 胚系序列	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCA GSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE WVSAIGTGGGTYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAV YYCARDYYGSGSYYYYYYGMDV WGQGTTVTVSS
SEQ ID：13	人類 V_L L6/JK4 胚系序列	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPL TFGGGTKVEIK
SEQ ID：14	人類 V_H 3-09/D4-	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA

	11/JH6b 胚系序列	ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDIDYYYYYYGMDVWG QGTTVTVSS
SEQ ID：15	人類 V_LL6/JK5 胚系序列	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPI TFGQGTRLEIK

【圖式簡單說明】

第 1 圖為初始人類 IL-18(序列辨識編號：16)的胺基酸序列；

第 2 圖為鼠 IL-18(序列辨識編號：17)的胺基酸序列；

第 3 圖為 mIL-18(序列辨識編號：2)結合 Rituxan®於人類 B-細胞淋巴瘤大鼠模式內的抗腫瘤活性。CR 代表完全恢復；

第 4 圖為第 3 圖之 GraphPad Prism®繪圖和分析資料的統計顯著性。明確而言，此圖為在移植後第 19 天比較腫瘤體積。

第 5 圖為鼠 IL-18(序列辨識編號：17)/Rituxan®組合物於人類 B-細胞淋巴瘤模式內在移植後第 25 天的腫瘤體積。

第 6A 和 6B 圖為鼠 IL-18(序列辨識編號：17)/Rituxan®組合物於人類 B-細胞淋巴瘤模式內的中數和平均腫瘤生長體積。

第 7 和 8 圖為鼠 IL-18(序列辨識編號：17)/Rituxan®組合物比較各別單獨藥物於人類 B-細胞淋巴瘤模式內在

移植後第 27 天的腫瘤體積。

第 9 圖為 ofatumumab(Humax-CD20®)單一療法或結合鼠 IL-18(序列辨識編號：17)對 SCID 小白鼠(數目=6 隻/每組；平均±標準偏差)體內皮下 Ramos 人類淋巴瘤生長的效應。(Humax 指 ofatumumab)。

第 10 圖為 ofatumumab(Humax-CD20®)單一療法或結合鼠 IL-18(序列辨識編號：17)對 SCID 小白鼠(數目=6 隻/每組；平均±標準偏差)體內皮下 Ramos 人類淋巴瘤模式中在接種後第 28 天的效應。(Humax 指 ofatumumab)。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明通常係關於人類 IL-18 組合物於治療癌症的用途。明確而言，本發明係關於人類 IL-18 和抗-CD20 抗體的組合物。

六、英文發明摘要：

The present invention relates generally to the use of human IL-18 combinations in the treatment of cancers. In particular, the present invention relates to combination of human IL-18 and an anti-CD20 antibody.

十、申請專利範圍：

1. 一種治療或預防癌症病人的組合物，其含有：(i) 人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)；以及(ii) 抗 CD 抗體。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組合物，其中該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和該抗體係被同時投藥。

3. 如申請專利範圍第 1 項之組合物，其中該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和該抗體係依序被投藥，其中先投予該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)。

4. 如申請專利範圍第 1 項之組合物，其中該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和該抗體係依序被投藥，其中先投予該抗體。

5. 如申請專利範圍第 1 項之組合物，其中該抗體係選自利妥昔單抗(rituximab)或歐法目單抗(ofatumumab)。

6. 如申請專利範圍第 1 項之組合物，其中該癌症係選自由非何杰金氏淋巴瘤(NHL)；B 細胞淋巴母細胞白血病/淋巴瘤；成熟 B 細胞腫瘤、B 細胞慢性淋巴性白血病(CLL)/小淋巴球淋巴瘤(SLL)；B 細胞前淋巴球性白血病；淋巴漿細胞樣淋巴瘤；被套細胞淋巴瘤(MCL)；濾泡型淋巴瘤(FL)包括低度、中度和高度 FL；皮膚濾泡中心細胞淋巴瘤；邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 型、結節和脾臟型)；髮樣細胞白血病；瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤；伯基特淋巴瘤；漿細胞瘤；漿細胞骨髓瘤；移殖後淋巴增生性疾病；瓦氏巨球蛋白血症；間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)；以及 T-細胞非何杰

金氏淋巴瘤構成的群組。

7. 一種(i)人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)結合(ii)抗 CD 抗體於製造治療或預防癌症病人的藥物之用途。

8. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和該抗體係被同時投藥。

9. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和該抗體係依序被投藥，其中先投予該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)。

10. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該人類 IL-18 多肽(序列辨識編號：16)和該抗體係依序被投藥，其中先投予該抗體。

11. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該抗體係選自利妥昔單抗或歐法目單抗。

12. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該癌症係選自由非何杰金氏淋巴瘤(NHL)；B 細胞淋巴母細胞白血病/淋巴瘤；成熟 B 細胞腫瘤、B 細胞慢性淋巴性白血病(CLL)/小淋巴球淋巴瘤(SLL)；B 細胞前淋巴球性白血病；淋巴漿細胞樣淋巴瘤；被套細胞淋巴瘤(MCL)；濾泡型淋巴瘤(FL)包括低度、中度和高度 FL；皮膚濾泡中心細胞淋巴瘤；邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 型、結節和脾臟型)；髮樣細胞白血病；瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤；伯基特淋巴瘤；漿細胞瘤；漿細胞骨髓瘤；移殖後淋巴增生性疾病；瓦氏巨球蛋白血症；間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)；以及 T-細胞

非何杰金氏淋巴瘤構成的群組。

十一、圖式：

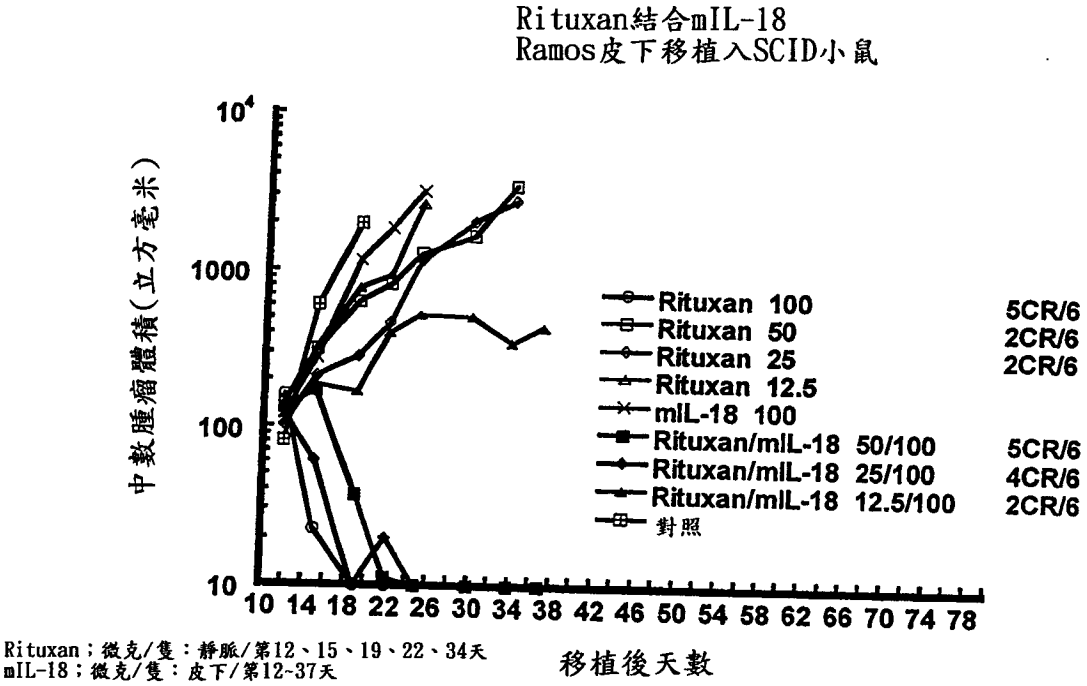
第1圖

```
YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDCRD NAPRT IFIIS   50
MYKDS QPRGM AVTIS VKCEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII  100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM  150
FTVQN ED   157
```

第2圖

```
NFGRL HCTTA VIRNI NDQVL FVDKR QPVFE DMTDI DQSAS EPQTR LIIYM  50
YKDSE VRGLA VTLSV KDSKM STLSC KNKII SFEEM DPPEN IDDIQ SDLIF 100
FQKRV PGHNK MEFES SLYEG HFLAC QKEDD AFKLI LKKKD ENGDK SVMFT 150
LTNLH QS  157
```

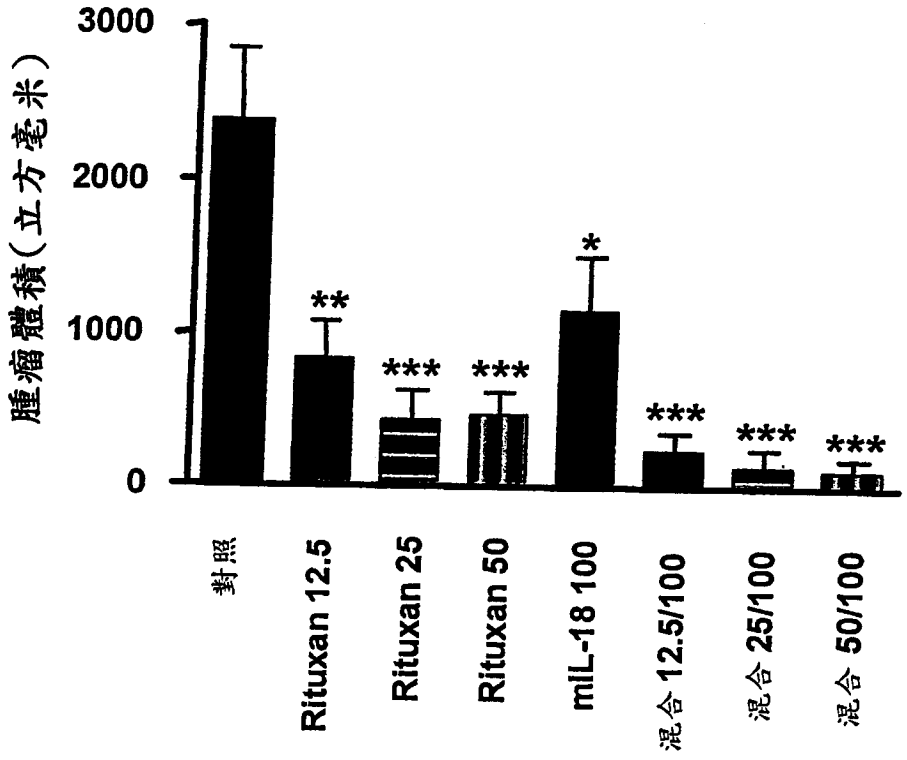
第3圖


Rituxan結合mIL-18
Ramos皮下移植入SCID小鼠
中數腫瘤體積(立方毫米)
10⁴
1000
100
10
10 14 18 22 26 30 34 38 42 46 50 54 58 62 66 70 74 78
移植後天數
Rituxan 100 5CR/6
Rituxan 50 2CR/6
Rituxan 25 2CR/6
Rituxan 12.5
mIL-18 100
Rituxan/mIL-18 50/100 5CR/6
Rituxan/mIL-18 25/100 4CR/6
Rituxan/mIL-18 12.5/100 2CR/6
對照
Rituxan；微克/隻：靜脈/第12、15、19、22、34天
mIL-18；微克/隻：皮下/第12-37天

第4圖

移植後第19天腫瘤體積(n=6)

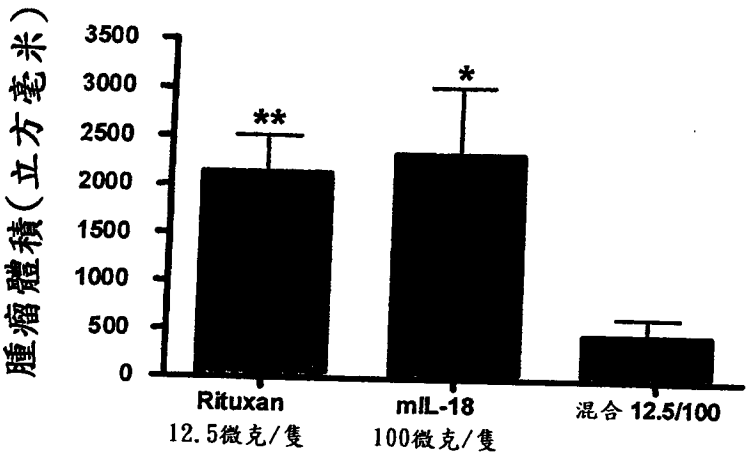
以平均±標準偏差表示資料(Ramj04)



與未治療組比較全部治療組統計學上明顯降低腫瘤的生長(*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001；單因子ANOVA接著藉由Bonferroni多重比較法分析)

第5圖

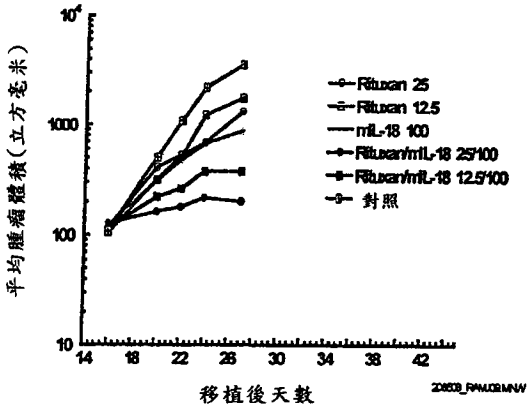
移植後第25天腫瘤體積(n=6)
以平均±標準偏差表示資料(Ramj04)



與以Rituxan($p<0.01$)或mIL-18(*$p<0.05$)的單一療法比較該組合療法在統計學上可明顯阻止腫瘤的生長；單方t-檢定法

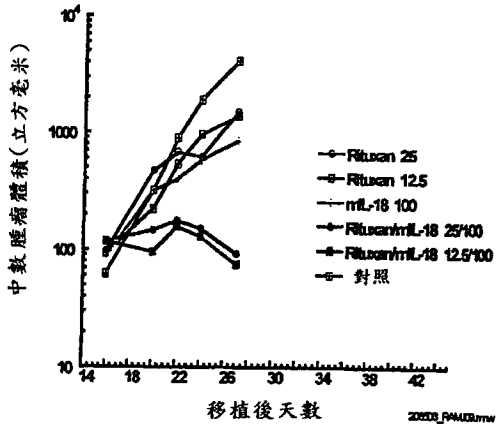
第6A和6B圖

A



人：微克；隻/靜脈；第16,20,23,27天
mIL-18：微克/隻；皮下；第16天

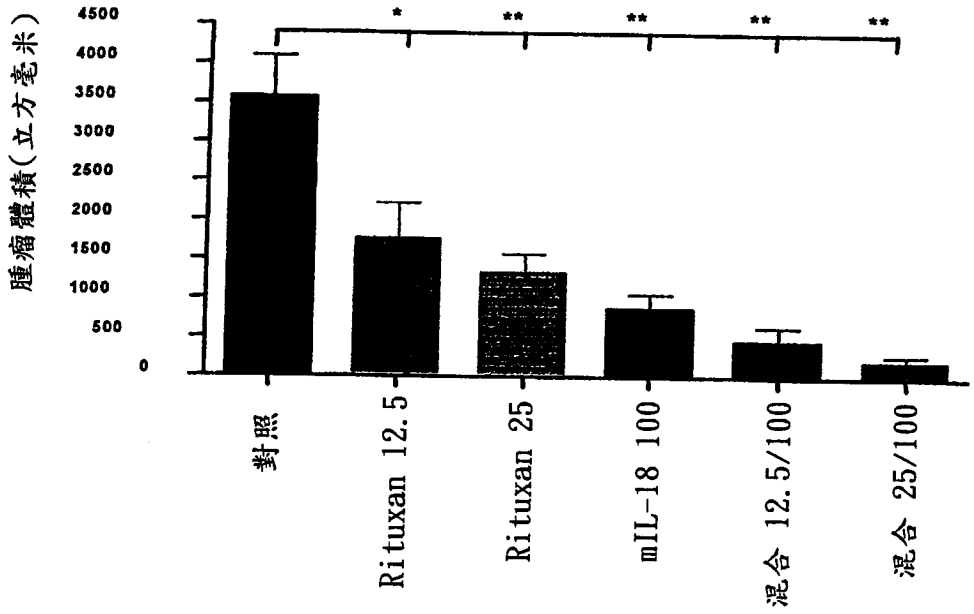
B



人：微克；隻/靜脈；第16,20,23,27天
mIL-18：微克/隻；皮下；第16天

第7圖

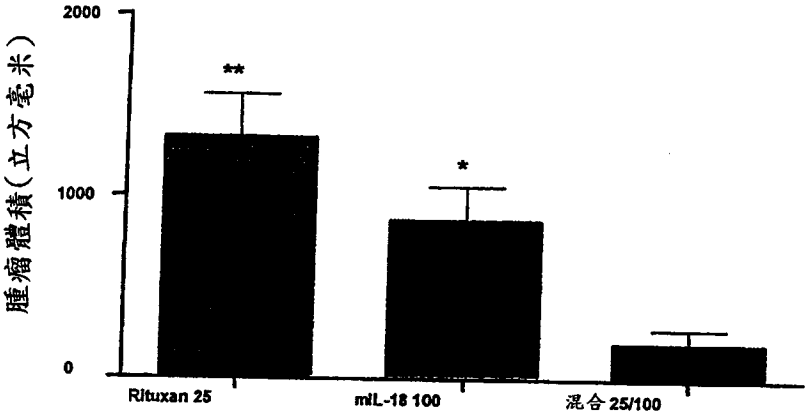
移植後第27天腫瘤體積(n=12)
以平均±標準偏差表示資料(Ramj09)



此圖顯示與對照組比較(Bonferroni多重比較法的單因子變異數分析)全部治療組具有統計學上顯著性差異(*p<0.01；**p<0.001)

第8圖

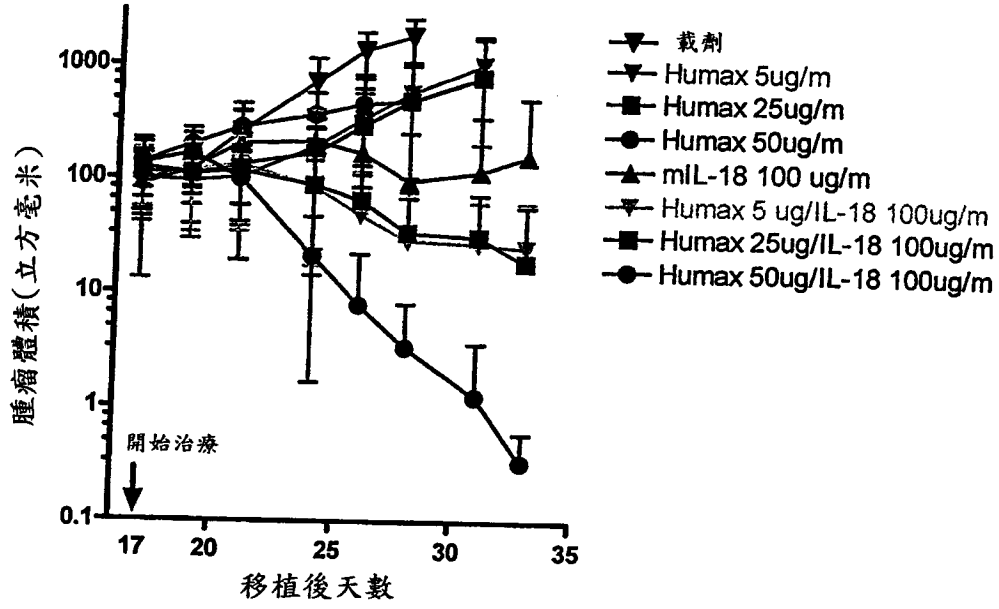
移植後第27天腫瘤體積(n=12)
以平均±標準偏差表示資料(Ramj09)



單藥治療組與組合治療組之間具有統計學上的顯著性差異(*p<0.05, **p<0.001；單因子變異數分析接著藉由Tukey's測後分析)

第9圖

HuMax-CD20作為單一治療劑或結合IL-18對SCID小鼠內皮下Ramos人類淋巴瘤之生長的效應(n=6隻/組；平均±標準偏差)

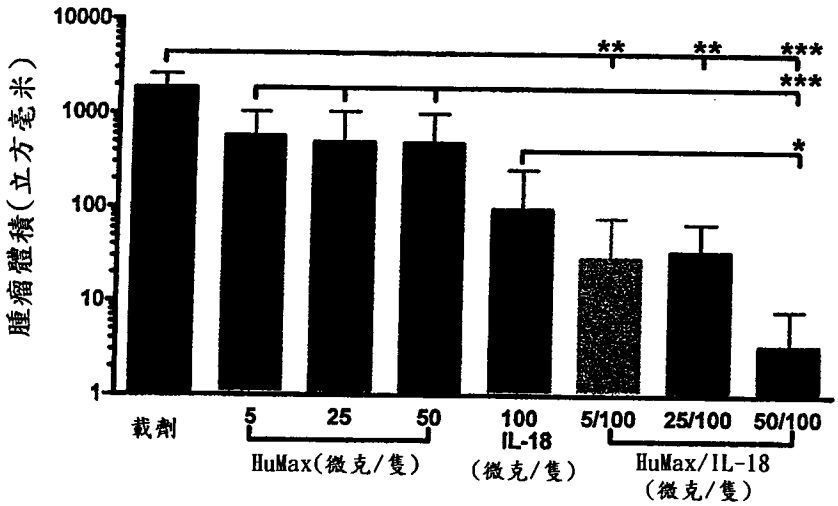


注意：劑量以每隻小鼠微克表示(微克/隻)

第10圖

HuMax-CD20 mAb作為單一治療劑或結合IL-18於接種第28天後對SCID小鼠內皮下Ramos人類淋巴瘤模式的效應

(n=6隻/組；平均±標準偏差)



以Bonnferroni多重比較法的單因子變異數分析顯示全部HuMax和IL-18混合治療組與載劑組比較具有統計上顯著性(**p<0.01, ***p<0.001)，及比較HuMax單一治療組和載劑(***p<0.001)以及IL-18單一治療和50/100組合治療組(*p<0.05)

七、指定代表圖：

（一）本案指定代表圖為：第（3）圖。

（二）本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無