



- (21) 申請案號：104111019 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 02 日
- (51) Int. Cl. : *C07K14/735 (2006.01)* *C12N15/85 (2006.01)*  
*A61K38/17 (2006.01)* *A61P11/06 (2006.01)*  
*A61P37/08 (2006.01)*
- (30) 優先權：2014/04/02 美國 14/243,750  
 2015/01/14 美國 62/103,495
- (71) 申請人：杜尼塔治療公司 (美國) TUNITAS THERAPEUTICS, INC. (US)  
 美國
- (72) 發明人：西葛 諾蘭 SIGAL, NOLAN (US)；史畢瑞迪 吉任堤 SPERINDE, GIZETTE (US)
- (74) 代理人：陳長文
- 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：10 共 50 頁

## (54) 名稱

E P S I G A M 融合蛋白質

EPSIGAM FUSION PROTEIN

## (57) 摘要

epsi-gam 提供一種新穎融合蛋白質，其能夠使 FcεRI 或 FcεRII 細胞表面受體中之任一者與 FcγRIIb 細胞表面受體交聯以便阻斷 IgE 介導之生物反應。

Epsi-gam provides a novel fusion protein with the ability to cross-link either of the FcεRI or FcεRII cell surface receptors with an FcγRIIb cell surface receptor in order to block IgE-mediated biological responses.

指定代表圖：

構築體	總蛋白質 (mg/L)	單體 (%)	聚集體 (%)	最終效價 (mg/L)
epsi-gam	1893	94	6	1779
E2G	0.085	N/A	極高	N/A
GE2	162.4	71.9	28.1	117
GE2-lys	86	73.5	26.5	63
GE2-鉸鏈	166.1	70.6	29.4	117

圖1

201623328

## 發明摘要

※ 申請案號：104111019

※ 申請日：104.4.2

※IPC 分類：

C07K14/35 (2006.01)

C12N15/85 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61P11/06 (2006.01)

A61P37/08 (2006.01)

## 【發明名稱】

EPSIGAM融合蛋白質

EPSIGAM FUSION PROTEIN

## 【中文】

epsi-gam提供一種新穎融合蛋白質，其能夠使FcεRI或FcεRII細胞表面受體中之任一者與FcγRIIb細胞表面受體交聯以便阻斷IgE介導之生物反應。

## 【英文】

Epsi-gam provides a novel fusion protein with the ability to cross-link either of the FcεRI or FcεRII cell surface receptors with an FcγRIIb cell surface receptor in order to block IgE-mediated biological responses.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（1）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

（無）

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

EPSIGAM融合蛋白質

EPSIGAM FUSION PROTEIN

## 交叉參考

本申請案主張2014年4月2日申請之美國非臨時申請案第14/243,750號(現美國專利第8,961,992號)及2015年1月14日申請之美國臨時申請案第62/103,495號之權利，兩者均以全文引用之方式併入本文中。

## 關於聯邦贊助之研究之申明

epsi-gam在政府支持下在由美國國家衛生研究院(National Institutes of Health)授與之授權號AI092914下進行。政府在本發明中具有某些權利。

## 序列表

本申請案含有序列表，其已呈ASCII格式經EFS-Web提交且以全文引用的方式併入本文中。該ASCII複本於2014年3月24日創建，名為36249701201SEQ.txt且大小為7,463位元組。

## 【技術領域】

融合蛋白質epsi-gam藉由使FcεRI或FcεRII受體與FcγRIIb受體交聯來提供一種用於管理IgE介導之過敏性疾及其他經由IgE受體介導之病症之改良方法。

## 【先前技術】

哮喘為一種與免疫球蛋白E (IgE)及IgE細胞表面受體有關之疾病。世界衛生組織(World Health Organization)估計全世界有235百萬

人罹患哮喘疾病。輕度至中度哮喘通常用現有吸入劑及皮質類固醇療法治療，但更嚴重的哮喘當前無法用現有療法模態良好治療。

過敏性疾病與IgE及IgE細胞表面受體有關。一般而言，過敏性疾病在全世界廣泛流行且正在增加。過敏性疾病通常藉由疫苗接種或以連續較小劑量曝露於過敏原來治療。然而，此療法為昂貴的、費時的且在一些情況下為危險的。

### 【發明內容】

epsi-gam為一種新穎融合蛋白質，其經組態以使FcεRI或FcεRII (CD23)細胞表面受體中之任一者與FcγRIIb細胞表面受體交聯。

FcεRI及FcγRIIb細胞表面受體在例如嗜鹼性血球及肥大細胞中共同表現。FcεRI及FcγRIIb受體之交聯向此等細胞傳遞抑制信號，其抑制其組織胺之釋放且可提供針對諸如哮喘及過敏性疾病之疾病之治療效應。

嗜鹼性血球及肥大細胞為釋放引起哮喘及過敏性疾病之介體的細胞類型，且藉由epsi-gam在例如嗜鹼性血球及肥大細胞上之FcεRI及FcγRIIb之交聯抑制組織胺及負責哮喘及過敏性疾病之疾病表現之其他介體的釋放。epsi-gam藉由FcεRI及FcγRIIb之交聯且藉此抑制引起哮喘及過敏性疾病之介體的釋放來提供一種用於哮喘及過敏性疾病之療法。

FcεRII及FcγRIIb在例如B淋巴細胞(B細胞)上共同表現，且藉由epsi-gam在B細胞上之FcεRII及FcγRIIb細胞表面受體之交聯抑制由B細胞釋放之某些類型免疫球蛋白(諸如IgE)的產生，藉此降低循環中之IgE濃度。

epsi-gam藉由FcεRII及FcγRIIb之交聯且藉此抑制由B細胞釋放之與哮喘及過敏性疾病有關的免疫球蛋白(諸如IgE)之產生來進一步治療諸如哮喘及過敏性疾病之疾病。

在一個態樣中，**epsi-gam**為經分離之融合蛋白質，其包含在其羧基端處與Fc $\gamma$ 1片段功能上連接之Fc $\epsilon$ 片段。

在另一實施例中，**epsi-gam**為包含多肽序列CH $\epsilon$ 2-CH $\epsilon$ 3-CH $\epsilon$ 4- $\gamma$  銜鏈-CH $\gamma$ 2CH $\gamma$ 3之融合蛋白質。

在另一實施例中，**epsi-gam**為包含多肽序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。

在另一實施例中，**epsi-gam**實質上經核苷酸序列SEQ ID NO:1編碼。

在又一實施例中，**epsi-gam**包含兩種連接多肽之均二聚體，兩種多肽均包含序列SEQ ID NO:2。

在又一實施例中，**epsi-gam**包含兩種聯結多肽之雜二聚體，其中連接多肽中之一者包含序列SEQ ID NO:2。

本文中描述一種用於製造治療融合蛋白質**epsi-gam**之方法，其包含合成編碼**epsi-gam**之聚核苷酸，將聚核苷酸整合入表現載體中，用表現載體轉染真核細胞，且分離包含**epsi-gam**之融合蛋白質。

本文中描述一種用於治療或預防個體之過敏性反應發展之方法，其包含向個體投與0.01 mg/kg融合蛋白質**epsi-gam**，其中**epsi-gam**包含序列SEQ ID: 1。在一個實施例中，一種用於治療或預防個體之過敏性反應發展之方法包含向個體投與0.1 mg/kg融合蛋白質**epsi-gam**，其中**epsi-gam**包含序列SEQ ID: 1。在一個實施例中，一種用於治療或預防個體之過敏性反應發展之方法包含向個體投與0.3 mg/kg融合蛋白質**epsi-gam**，其中**epsi-gam**包含序列SEQ ID: 1。在一個實施例中，一種用於治療或預防個體之過敏性反應發展之方法包含向個體投與1.0 mg/kg融合蛋白質**epsi-gam**，其中**epsi-gam**包含序列SEQ ID: 1。在一個實施例中，一種用於治療或預防個體體內過敏性反應發展之方法包含向個體投與3.0 mg/kg融合蛋白質**epsi-gam**，其中**epsi-gam**包含

序列SEQ ID: 1。在一個實施例中，一種用於治療或預防個體體內過敏性反應發展之方法包含向個體投與10.0 mg/kg融合蛋白質epsi-gam，其中epsi-gam包含序列SEQ ID: 1。

本文中描述一種用於治療或預防個體之肥大細胞活化症候群發展之方法，該方法包含向該個體投與包含序列SEQ ID: 1之融合蛋白質。在一個實施例中，肥大細胞活化症候群包含皮膚肥大細胞增多症、全身肥大細胞增多症或侵襲性全身性肥大細胞增多症。

本文中描述一種向個體投與緊急免疫療法預防 (rush immunotherapy prophylaxis) 之方法，該方法包含在該緊急免疫療法預防之該投與時間向該個體投與包含序列SEQ ID: 1之融合蛋白質。在一個實施例中，融合蛋白質在緊急免疫療法預防投與之前、期間或之後，或在一個以上此等時間段期間向個體投與。在一個實施例中，融合蛋白質每月投與，且個體在該緊急免疫療法預防之該投與之前接受至少一次該融合蛋白質之給藥。

在參考以下【實施方式】及隨附圖式後，此等及其他態樣將變更顯而易見。

### 【圖式簡單說明】

epsi-gam之新穎特徵將在隨附申請專利範圍中具體闡述。參考以下闡述例示性實施例(其中採用epsi-gam之原理)之【實施方式】及其隨附圖式，將獲得對epsi-gam之特徵及優勢之更好理解：

圖1為藉由所描述之製造方法產生之epsi-gam及類似融合蛋白質之產量的資料表。

圖2為類似於藉由所描述之製造方法產生之epsi-gam之經表現融合蛋白質之蛋白質A親和層析分析之典型結果之實例。

圖3為藉由所描述之製造方法產生之經表現epsi-gam之蛋白質A親和層析分析之典型結果之實例。

圖4為融合蛋白質epsi-gam之胺基酸序列(SEQ ID NO:2)。

圖5為展示epsi-gam在阻斷不同肥大細胞類型之組織胺釋放中之功效之典型結果圖表之實例。

圖6為實質上編碼融合蛋白質epsi-gam之核苷酸之核苷酸序列之實例(SEQ ID NO:1)。

圖7展示在過敏性哮喘模型中向恆河猴(rhesus macaques)投與3 mg kg之epsi-gam之實驗的結果。

圖8展示在過敏性哮喘模型中向恆河猴投與3 mg/kg或10 mg/kg之epsi-gam之實驗的結果。

圖9展示在過敏性哮喘模型中向恆河猴投與3 mg/kg之epsi-gam之後量測甲膽鹼敏感性之實驗的結果。

圖10展示epsi-gam抑制IgE轉錄物在人類B細胞中之相對表現的實驗結果。

### 【實施方式】

除非另外定義，否則本文中所使用之技術及科學術語具有與熟習此項技術者通常所理解相同之含義。

### I. 問題解析

類似於epsi-gam之融合蛋白質已在早期療法研究階段中展示治療哮喘及過敏性疾病之前景，然而，此等融合分子無法以足以提供實際臨床治療方案之數量產生。不能產生大量融合蛋白質分子或規模化(scale-up)此等分子為阻礙將此等融合蛋白質轉譯成臨床療法之問題。已證實類似於epsi-gam之融合蛋白質極易於聚集，其對人類臨床療法造成風險。然而，epsi-gam產生引起極少蛋白質聚集體。

epsi-gam與類似融合蛋白質分子之不同之處在於epsi-gam可經極有效地規模化，且因此可行地轉譯成可行的臨床療法。epsi-gam之格外規模化為意外結果，其使得epsi-gam轉譯成臨床療法。無法規模化

之其他類似融合分子無法可行地轉譯成可行的臨床療法。

療法研發通常以在實驗室中創造及測試新穎分子開始，且隨後通常為規模化程序之研發及最佳化。分子之規模化為產生足以適用於分子應用(諸如用作臨床療法)之數量之分子。規模化程序之研發涉及許多參數，諸如適合表現載體、細胞株及純化方法之選擇。舉例而言，所關注蛋白質之一級序列可經修飾以便賦予規模化所需之特性，諸如高產量及低聚集。

規模化程序之研發為複雜過程，且在大多數情況下，特定融合蛋白質之規模化因不可預見且不可變的規模化問題而證明為不可行的。因此，不可預見的規模化問題阻礙分子轉譯成用於治療患者之療法，且規模化設計中之步驟尤其涉及設計將產生高產量及低聚集物含量之融合蛋白質。

在新穎蛋白質療法研發中常見之規模化問題包括例如蛋白質在組織培養物中之高聚集率以及低產生率。

蛋白質聚集為治療蛋白質產生中之相對常見問題。然而，一些蛋白質聚集之程度不僅可能使其難以製造，且亦顯現臨床安全風險。若蛋白質聚集體在儲存或在向患者投與之後出現，則可引起免疫原性，其為可引起藥物去活化或其他不利臨床現象之抗藥物反應。

治療重組型蛋白質之低產量可使製造在經濟上或在物理上不可行。

當規模化時，在早期研發階段展示前景之融合蛋白質可能不可預見地具有高聚集程度、低產量產生，或高聚集程度及低產量產生兩者，使得該等融合蛋白質無法轉譯成臨床療法。

在療法研發初期，已證實某些融合蛋白質為抑制與哮喘及過敏性疾病有關的IgE介導之生物反應之有效手段，但此等分子因高聚集率與低產量產生而未能規模化至足夠數量。

一種此類蛋白質(如 *epsi-gam*，融合IgE之Fc部分與IgG之Fc部分)為E2G，描述於US 7488804中。另一種此類分子為GE2，其與相關分子一起描述於US 7265208中。

由於規模化期間之極大量聚集以及治療蛋白質之低產量，E2G、GE2及相關分子之大規模製造被認為不可行的。此等規模化問題阻礙E2G、GE2及相關分子之GMP製造。

然而，*epsi-gam*不同於E2G、GE2及相關分子之處在於*epsi-gam*在規模化時產生極高產量且具有極低聚集程度。

規模化期間*epsi-gam*之格外高產量為意外結果，其使得*epsi-gam*轉譯成臨床療法，而無法規模化之其他類似融合分子無法可行地轉譯成可行的臨床療法。

圖1為展示E2G、GE2及GE2家族中之兩種其他融合蛋白質之典型產量的資料表之實例，所有蛋白質藉由與產生高產量之*epsi-gam*實質上相同且本文中所描述之製造方法產生。當比較*epsi-gam*之產量與GE2及GE2家族中兩種其他融合蛋白質之產量時，*epsi-gam*之產量通常高約22倍。當比較*epsi-gam*之產量與E2G之產量時，*epsi-gam*之產量通常顯著地高約22,000倍。GE2及兩種GE2相關分子之聚集程度為*epsi-gam*之聚集程度之4-5倍，且E2G以實質上較高程度聚集，估計多達*epsi-gam*聚集程度之10倍。

圖2展示GE2之蛋白質A親和層析分析之典型結果，GE2為類似於藉由所描述之製造方法產生之*epsi-gam*之經表現融合蛋白質。如層析結果所證明，GE2之總聚集率為約28%，其為類似於*epsi-gam*之融合蛋白質之典型結果。然而，應注意視諸如所使用細胞、培養基類型及其他相關因素之製造因素而定，GE2及類似蛋白質之聚集物形成百分比之更典型值可在30%聚集率至60%聚集率範圍內。

圖3展示由所描述之製造方法產生之經表現*epsi-gam*之蛋白質A親

和層析分析的典型結果。如層析結果所證明，**epsi-gam**之總聚集率約為極低的6%，其對於經由所描述方法製造之**epsi-gam**為典型的。自聚集立場來看，約6%之典型聚集率使得**epsi-gam**能成為經由所描述製造方法大批量生產及商業化之高度有利候選物。鑒於規模化中之類似融合蛋白質之不可行的高聚集結果，**epsi-gam**之極低聚集為經由所描述製造方法生產**epsi-gam**之意外有利結果。

當與四種其他類似融合蛋白質(包括類似的E2G)相比時，**epsi-gam**之實質上較高產量及相對低聚集率不僅為實質性結果，且亦為意外結果。在治療哮喘及過敏性疾病中展示前景之五種融合分子中，僅**epsi-gam**產生實質上足夠產量以及足夠低的聚集率以允許新穎**epsi-gam**融合蛋白質轉譯成可行的臨床療法。

## II. 定義

術語「IgG抑制受體」用於定義現已知或下文中發現之抑制受體超家族(IRS)中之一員，且包括IgG受體FcγRIIb。與FcεRI或FcεRII受體交聯之FcγRIIb受體能夠抑制FcεR介導之反應，無論反應係經由藉助於高親和力IgE受體(諸如FcεRI)或低親和力IgE受體(諸如FcεRII)起作用之IgE或由另一種機制(諸如針對FcεRI之自體抗體)介導。

術語「FcγRIIb」用以指任何物種之FcγRIIb受體，包括自然界中存在之任何哺乳動物物種。在一個實施例中，哺乳動物為人類。

FcγRIIb為含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)之低親和力IgG受體FcγRII之同功異型物。FcγRIIb受體發現於例如嗜鹼性血球、肥大細胞、B細胞及樹突狀細胞上。FcγRIIb具有三種交替剪接形式，稱為FcγRIIb1、FcγRIIb1'及FcγRIIb2，其僅在其細胞質域序列方面不同。所有三種交替剪接同功異構物在其細胞質尾部內含有兩個細胞外Ig樣環及單個保守ITIM基元，且其尤其包括於FcγRIIb之定義以及可能在未來發現之其他剪接變異體內。

術語「FcεRI」係指任何物種之FcεRI受體，包括自然界中存在之任何哺乳動物物種。FcεRI為細胞表面受體之多重次單元免疫反應受體(MIRR)家族中之一員。細胞表面受體之MIRR家族中之受體通常能夠經由與細胞質酪胺酸激酶相關聯而轉導細胞內信號。

術語「FcεRII」及「CD23」可互換使用，且係指任何物種之FcεRII受體，包括自然界中存在之任何哺乳動物物種。

術語「免疫球蛋白」(Ig)用以指血清之球蛋白之免疫賦予部分及其他醣蛋白，其可能在自然界中不存在，但具有相同功能性特徵。術語「免疫球蛋白」或「Ig」尤其包括「抗體」(Abs)。雖然抗體展現對於特定抗原之結合特異性，但免疫球蛋白包括抗體與缺乏抗原特異性之其他抗體樣蛋白質。天然免疫球蛋白由稱為漿細胞之分化B細胞分泌，且不具有任何已知抗原特異性之免疫球蛋白以較低含量由免疫系統產生且以增加的含量由骨髓瘤產生。如本文中所使用，術語「免疫球蛋白」、「Ig」及其語法變體用於包括抗體及不具有已知抗原特異性或不具有抗原結合區之Ig蛋白質。

一些主要人類抗體或免疫球蛋白類別被進一步分成子類，諸如IgG、IgA，其不為吾所知之M或E之子類。已知IgG具有四個已知的同型子類：IgG<sub>1</sub> (γ<sub>1</sub>)、IgG<sub>2</sub> (γ<sub>2</sub>)、IgG<sub>3</sub> (γ<sub>3</sub>)及IgG<sub>4</sub> (γ<sub>4</sub>)。

免疫球蛋白重鏈之恆定區進一步分成球狀，結構上分散區域，其包括重鏈恆定域。舉例而言，IgG<sub>1</sub>免疫球蛋白重鏈之恆定區包含三個恆定域(CH1、CH2及CH3)及CH1域與CH2域之間的鉸鏈區。IgE免疫球蛋白重鏈包含四個恆定域：CH1、CH2、CH3及CH4且不具有鉸鏈區。

術語「Fcγ1」係指任何物種之Fcγ1序列，包括自然界中存在之任何哺乳動物物種。在一個實施例中，動物為人類。

胺基酸由其常見之一字母或三字母代碼表示，如按照此項技術

中之慣例。因此，二十種天然存在之胺基酸之名稱如下：丙胺酸=Ala (A)；精胺酸=Arg (R)；天冬胺酸=Asp (D)；天冬醯胺=Asn (N)；半胱胺酸=Cys (C)；麩胺酸=Glu (E)；麩醯胺酸=Gln (O)；甘胺酸=Gly (G)；組胺酸=His (H)；異白胺酸=Ile (I)；白胺酸=Leu (L)；離胺酸=Lys (K)；甲硫胺酸=Met (M)；苯丙胺酸=Phe (F)；脯胺酸=Pro (P)；絲胺酸=Ser (S)；蘇胺酸=Thr (T)；色胺酸=Trp (W)；酪胺酸=Tyr (Y)；纈胺酸=Val (V)。本文中之多肽包括所有L-胺基酸、所有D-胺基酸或其混合物。完全包含D-胺基酸之多肽為有利的，因為預期其對天然發現於人體內之蛋白酶具有抵抗性，且可具有較長半衰期。

聚核苷酸載體可呈若干形式中之任一者，包括(但不限於)封裝於反轉錄病毒外殼中之RNA、DNA、RNA；封裝於腺病毒外殼中之DNA；封裝於另一病毒或病毒樣形式(諸如單純疱疹及腺結合病毒(AAV))中之DNA；封裝於脂質體中之DNA；與聚離胺酸複合、與合成聚陽離子蛋白質複合、與轉鐵蛋白結合、與諸如聚乙二醇(PEG)之化合物複合以免疫性「遮蔽」蛋白質及/或增加半衰期或結合於非病毒蛋白質之DNA。在一個實施例中，聚核苷酸為DNA。如本文中所使用，「DNA」不僅包括鹼基A、T、C及G，且亦包括其類似物或此等鹼基之經修飾形式中之任一者，諸如甲基化核苷酸；核苷酸間修飾物，諸如不帶電鍵及硫代磷醯酯(thioate)糖類似物之用途；及經修飾及/或替代性主鏈結構，諸如聚醯胺。

術語「IgE介導之生物反應」用以指特徵為經由IgE受體信號轉導之病狀或疾病，包括高親和力IgE受體FcεRI及低親和力IgE受體FcεRII。定義包括(但不限於)與過敏性超敏反應及異位性過敏有關之病狀，諸如哮喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、部分食物過敏、慢性風疹及血管性水腫，以及通常由蜂螫針、嚴重食物過敏(例如對花生之反應)或諸如青黴素之藥物引起之過敏性休克之嚴重生理病狀。

術語「治療(treat/treatment)」係指治療性治療與預防性或防治性措施，其中目標為預防或減緩(減輕)非所需生理變化或病症。需要治療者包括已患有病狀或病症以及易於患有病狀或病症或待預防病狀或病症之個體。

術語「患者」係指任何動物，且在一個實施例中為哺乳動物，亦即檢查、治療、分析測試或診斷之個體。在一個實施例中，人類為個體。個體或患者可具有或可不具有疾病或其他病理病狀。

術語「疾病」係指正常身體功能之任何破壞，或任何類型病變之出現。

### III. epsi-gam

圖4為融合蛋白質epsi-gam之胺基酸序列。epsi-gam為一種新穎融合蛋白質，其經組態以使Fc $\gamma$ RIIb細胞表面受體與Fc $\epsilon$ RI或Fc $\epsilon$ RII細胞表面受體交聯，以便阻斷某些IgE介導生物反應。

IgE在諸多急性及慢性過敏性反應中發揮重要作用，包括例如哮喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、嚴重食物過敏、慢性風疹及血管性水腫，以及例如由食物過敏、蜂螫針或青黴素過敏引起之過敏性休克之嚴重生理病狀。人類IgE之Fc部分能夠在諸如嗜鹼性血球、肥大細胞、樹突狀細胞及B淋巴細胞(B細胞)之各種細胞類型上與Fc $\epsilon$ RI或Fc $\epsilon$ RII細胞表面受體結合。當抗原與在例如嗜鹼性血球及肥大細胞上結合於某些細胞表面受體之IgE結合時，IgE結合致使此等細胞釋放血管活性及促發炎介體，包括組織胺。在抗原結合IgE結合某些細胞表面受體時釋放之介體顯著有助於哮喘以及急性及遲發性過敏反應。

已知與人類IgE結合之一種細胞表面受體為高親和力細胞表面受體，稱為Fc $\epsilon$ RI。Fc $\epsilon$ RI位於包括嗜鹼性血球及肥大細胞之細胞類型上。抗原與已在細胞表面上結合於Fc $\epsilon$ RI之IgE的結合可使引起介體自細胞釋放之級聯活化。釋放之介體與例如某些過敏性疾病及哮喘有

關。

已知與人類IgE結合之另一細胞表面受體為發現於例如B細胞上之低親和力FcεRII受體。IgE與B細胞表面受體之結合在測定藉由B細胞產生之免疫球蛋白之類型中起作用。

已知人類IgG之Fc部分與含有稱為FcγRIIb之受體之免疫受體酪胺酸類抑制基元(ITIM)結合。FcγRIIb發現於例如嗜鹼性血球、肥大細胞、樹突狀細胞及B細胞上。細胞表面受體FcγRIIb與FcεRI受體之交聯可抑制與某些過敏性疾​​病及哮喘有關之介體的釋放。

epsi-gam為包含IgE之Fc部分及IgG之Fc部分之融合蛋白質。epsi-gam經組態以使FcεRI及FcεRII受體中之任一者與抑制性FcγRIIb受體交聯。

已發現FcγRIIb受體與兩種IgE特定受體中之任一者在各種細胞上之交聯對彼等細胞具有整體抑制作用。當FcγRIIb與FcεRI在嗜鹼性血球或肥大細胞之細胞表面上交聯時，交聯導致FcεRI介導活化之抑制以及組織胺及其他介體之分泌。當FcγRIIb在B細胞上與IgE特定受體交聯時，交聯可抑制類別轉換及抗原特定IgE產生。

在某些細胞(諸如肥大細胞、嗜鹼性血球及B細胞)上表現之抑制受體(諸如FcγRIIb)與高親和力IgE受體(諸如FcεRI)或低親和力IgE受體(諸如FcεRII)之交聯可抑制FcεR介導之生物反應。該等生物反應包括過敏性反應或經由FcεR之自體免疫反應。生物反應類型包括(但不限於)與IgE介導之反應有關之病狀，諸如哮喘、過敏性鼻炎、食物過敏、慢性風疹及血管性水腫、對膜翅目昆蟲(例如蜂及小黃蜂)螫針或諸如青黴素之藥物之過敏性反應，且包括過敏性休克之嚴重生理反應。

圖5為展示epsi-gam在阻斷不同肥大細胞類型之組織胺釋放中之功效之典型結果之圖表的實例。來源於人類肺、臍帶血及皮膚之肥大

細胞分別在培養物中經分離且經刺激以釋放組織胺。如圖表所展示，經 $\epsilon$ si-gam處理之細胞釋放之組織胺比對照少得多。與對照相比，用 $\epsilon$ si-gam處理肥大細胞在抑制其經刺激組織胺釋放中有效。亦請參見下文實例1。

$\epsilon$ si-gam為包含Fc $\epsilon$ 片段序列之多肽，該Fc $\epsilon$ 片段序列包括在其C端處連接至IgG<sub>1</sub>重鏈恆定區之N端之IgE重鏈恆定區的CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>及CH<sub>4</sub>域(CH $\epsilon$ <sub>2</sub>-CH $\epsilon$ <sub>3</sub>-CH $\epsilon$ <sub>4</sub>序列)，該IgG<sub>1</sub>重鏈恆定區包括功能活性鉸鏈、CH<sub>2</sub>及CH<sub>3</sub>域( $\gamma$ 鉸鏈-CH $\gamma$ <sub>2</sub>-CH $\gamma$ <sub>3</sub>序列)。

形成 $\epsilon$ si-gam之兩種多肽序列功能上連接，意謂兩者保持結合於其各別天然受體之能力。與 $\epsilon$ si-gam結合之受體包括例如天然IgG抑制受體，諸如低親和力Fc $\gamma$ RIIb受體，及天然高親和力IgE受體(諸如Fc $\epsilon$ RI)或低親和力IgE受體(諸如Fc $\epsilon$ RII)。因此，包含功能上彼此連接之Fc $\epsilon$ 片段及Fc $\gamma$ 片段之 $\epsilon$ si-gam融合蛋白質能夠使各別天然受體Fc $\gamma$ RIIb與Fc $\epsilon$ RI交聯，或Fc $\gamma$ RIIb與Fc $\epsilon$ RII交聯。

為在 $\epsilon$ si-gam融合蛋白質內達成兩種結合序列之間的功能性連接，較佳地，結合序列保持以類似於彼受體之天然免疫球蛋白配位體之結合親和力結合於其各別相應受體之能力。已識別天然IgG及IgE重鏈恆定區序列內之受體結合域，且已報導IgG Fc域之CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>介面含有針對多種Fc受體(包括Fc $\gamma$ RIIb低親和力受體)之結合位點。基於Fc $\epsilon$ RI結合研究，定位於三個環(C-D、E-F及F-G)中之六種胺基酸殘基(Arg-408、Ser-411、Lys-415、Glu-452、Arg-465及Met-469)在人類IgE重鏈CH<sub>3</sub>域之大部分曝露側形成外脊，且涉及主要因靜電相互作用而結合於高親和力受體Fc $\epsilon$ RI。IgE蛋白質中之高親和力受體結合位點包括IgE重鏈之CH<sub>3</sub>域內的Pro343-Ser353肽序列，但亦需要此核心肽之N端或C端處之序列以提供用於維持受體結合構形之結構骨架。特定言之，在 $\epsilon$ 鏈之C端區中包括His為維持IgE與Fc $\epsilon$ RI之間的高親和

力相互作用做出重要貢獻。 **epsi-gam**融合蛋白質內之Fcε及Fcγ1多肽序列經設計以結合於該等結合區內之殘基。

**epsi-gam**通常產生為及充當均二聚體或雜二聚體，包含上文所描述之彼此共價連接之兩種融合蛋白質。

在一個實施例中，形成均二聚體或雜二聚體之兩種融合蛋白質之共價連接係經由一或多個二硫鍵達成。舉例而言，**epsi-gam**蛋白質可產生為包含藉由鏈間二硫鍵彼此連接之兩個CH<sub>ε</sub>2-CH<sub>ε</sub>3-CH<sub>ε</sub>4-γ<sub>1</sub>鉸鏈-CH<sub>γ</sub>12-CH<sub>γ</sub>13-鏈之均二聚體以提供免疫球蛋白樣結構。**epsi-gam**亦可產生為雜二聚體，其中兩種不同融合蛋白質藉由一或多個共價鍵(諸如單個或多個二硫鍵)彼此連接。

圖6為實質上編碼融合蛋白質**epsi-gam**之核苷酸之核苷酸序列實例。**epsi-gam**包含552個胺基酸長之核苷酸序列。

**epsi-gam**胺基酸序列與E2G之胺基酸序列之不同之處在於兩個胺基酸。不存在於**epsi-gam**但存在於E2G之多肽序列中之胺基酸為分別位於E2G多肽序列之位置321及322處之精胺酸及絲胺酸。

存在於E2G之多肽序列中，但不存在於**epsi-gam**之序列中之精胺酸及絲胺酸經位於編碼E2G之核苷酸上的限制位點編碼。將編碼發現於E2G中之精胺酸及絲胺酸之核苷酸中的限制位點添加至編碼E2G之核苷酸以促進編碼E2G之核苷酸之選殖。

至少部分由於精胺酸及絲胺酸在E2G多肽序列內之位置及此等胺基酸對E2G構形之影響，E2G在規模化時具有高聚集程度及低產量。

藉由自E2G之位置321及322移除精胺酸及絲胺酸之融合蛋白質**epsi-gam**之設計在規模化時意外且顯著地產生聚集程度及產量方面之改良。如上文所論述，**epsi-gam**之規模化產生與E2G相比極低的聚集率及高22,000倍的產量。在包括E2G、GE2及類似分子之融合蛋白質群中，**epsi-gam**為可行地轉譯成臨床療法之唯一融合蛋白質。

epsi-gam為一種新穎融合蛋白質，其經組態以使FcεRI或FcεRII受體與FcγRIIb受體交聯，藉此抑制包括組織胺之某些細胞介體之釋放。epsi-gam能夠充當用於包括過敏性反應及哮喘之多種人類疾病之療法。重要的是，新穎融合蛋白質epsi-gam可克服當前可見於先前技術中之與製造相關的某些限制，使得epsi-gam單獨有效地轉譯成一種適用的大量產生臨床療法。

#### IV. 製造epsi-gam

epsi-gam極有利於大規模製造之融合蛋白質，因為當使用所描述之製造方法製造epsi-gam時，epsi-gam能以意外的高產量以及與其他類似融合蛋白質相比極低的聚集程度生產。

聚集之融合蛋白質完全不可用的且會造成潛在臨床風險。因此，具有高聚集百分比之融合蛋白質無法過渡至廣泛臨床用途，然而具有意外的極低聚集率之融合蛋白質(諸如epsi-gam)自製造立場來看高度有利於過渡至臨床用途。

當比較由所描述之製造方法產生之epsi-gam的產量與由相同方法產生之其他融合蛋白質的產量時，epsi-gam之產量顯著高於類似融合蛋白質之產量，且epsi-gam之聚集蛋白質濃度顯著較低。

epsi-gam為一種其中Fcε及Fcγ1多肽序列直接融合之多肽。天然免疫球蛋白恆定區之核苷酸及胺基酸序列(包括天然IgG及IgE恆定區序列)可獲自例如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)。

epsi-gam係至少部分經由以下一般性步驟製造(亦請參見下文實例2)：編碼DNA之epsi-gam經由諸如基因合成之方法獲得。隨後，將編碼cDNA之epsi-gam併入適合載體中。隨後，用含有編碼cDNA之epsi-gam之載體例如經由電致孔法(electroporation)來轉染真核細胞，

諸如中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary /CHO)細胞。隨後，自真核細胞分離 $\epsilon$ psi-gam且將其純化。

圖6為實質上編碼融合蛋白質 $\epsilon$ psi-gam之核苷酸之核苷酸序列實例。實質上編碼 $\epsilon$ psi-gam多肽序列之核苷酸序列可藉由此項技術中熟知之方法，諸如使用重組型DNA技術或傳統基因合成之方法來製備。應理解，圖6中展示之核苷酸序列僅為編碼 $\epsilon$ psi-gam之核苷酸之一個實例，如此項技術中熟知，不同密碼子能夠編碼相同胺基酸。因此，應理解可對圖6中展示之核苷酸序列進行某些核苷酸取代，且核苷酸序列將仍編碼 $\epsilon$ psi-gam。

用於製造 $\epsilon$ psi-gam之適合載體使用重組型DNA技術之標準技術，藉由將編碼cDNA之 $\epsilon$ psi-gam插入質體(諸如Lonza GS系統)中來製備，該等技術例如描述於「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第2版(Sambrook等人，1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait編，1984)；「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney編，1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Handbook of Experimental Immunology」，第4版(D. M. Weir及C. C. Blackwell編，Blackwell Science Inc., 1987)；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(J. M. Miller及M. P. Calos編，1987)；「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubel等人編，1987)；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullis等人編，1994)；及「Current Protocols in Immunology」(J. E. Coligan等人編，1991)中。經分離之質體及DNA片段經裂解、剪裁且以特定順序接合在一起以產生所需載體。在接合之後，將含有待表現之基因之載體轉移至適合宿主細胞中。

宿主細胞可為已知用於表現異源蛋白質之任何真核或原核宿主。因此，包含 $\epsilon$ psi-gam之多肽可在真核宿主中表現，該等真核宿主諸如真核微生物(酵母)或自多細胞生物(哺乳動物細胞培養物)分離之

細胞、植物及昆蟲細胞。適用於表現異源多肽之哺乳動物細胞株之實例包括藉由SV40轉型之猴腎臟CV1細胞株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人胚腎細胞株293S (Graham等人, *J. Gen. Virol.* 36:59 [1977])；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(Urlaub及Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 [1980])；猴腎臟細胞(CV1-76, ATCC CCL 70)；非洲綠猴細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎臟細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；及人類肝臟細胞(Hep G2, HB 8065)。一般而言，骨髓瘤細胞，尤其不生產任何內源性抗體之骨髓瘤細胞(例如非免疫球蛋白生產骨髓瘤細胞株SP2/0)可用於產生本文中之融合蛋白質。

釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)為低級真核宿主中最常用的。然而，多種其他屬類、物種及品系亦為可獲得的且適用於本文中，諸如甲醇酵母(EP 183,070；Sreekrishna等人, *J. Basic Microbiol.* 28:165-278 (1988))。酵母表現系統為商業上可獲得的，且可購自例如Invitrogen (San Diego, Calif.)。適用於雙功能蛋白表現之其他酵母包括(但不限於) *Kluyveromyces* 宿主(美國專利第4,943,529號)，例如乳酸克魯維酵母(*Kluyveromyces lactis*)；粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及Nurse, *Nature* 290:140 (1981))；麴菌屬宿主(*Aspergillus* host)，例如黑麴黴(*A. niger*) (Kelly及Hynes, *EMBO J.* 4:475-479 (1985))及構巢麴黴(*A. nidulans*) (Ballance等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284-289 (1983))；及漢森酵母宿主(*Hansenula* host)，例如多形漢遜酵母(*Hansenula polymorpha*)。酵母在便宜(最小)培養基上快速生長，重組可易於藉由補充選擇，表現蛋白質可尤其經工程改造以用於細胞質定位或細胞外輸出，且其較適用於大規模醱酵。

使用昆蟲細胞宿主之真核表現系統可依賴於質體或桿狀病毒表現系統。典型的昆蟲宿主細胞來源於草地夜蛾(草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*))。對於異質蛋白質之表現，用桿狀病毒苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)核型多角體病毒之重組型形式感染此等細胞，該重組型形式具有在病毒多角體蛋白啟動子控制下表現之所關注基因。受此病毒感染之其他昆蟲包括商業上已知為「High 5」(Invitrogen)之細胞株，其來源於甘藍銀紋夜蛾(粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*))。有時使用之另一種桿狀病毒為家蠶(*Bombyx mori*)核型多角體病毒，其感染真絲蠕蟲(家蠶)。諸多桿狀病毒表現系統為商業上可獲得的，例如獲自Invitrogen (Bac-N-Blue™)、Clontech (BacPAK™桿狀病毒表現系統)、Life Technologies (BAC-TO-BAC™)、Novagen (Bac Venter System™)、Pharming and Quantum Biotechnologies。另一昆蟲細胞宿主為常見的果蠅，黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)，藉由Invitrogen (The DESeq™系統)商業上提供暫時或穩定質體類轉染套組。

原核生物可為用於初始選殖步驟之宿主，且適用於快速產生大量DNA，適用於產生用於定點突變誘發、用於同時篩選諸多突變體且用於所產生突變體之DNA定序的單股DNA模板。適用於產生 $\epsilon$ -gam之肽之大腸桿菌(*E. coli*)菌株包括例如攜帶誘導性T7 RNA聚合酶基因之BL21 (Studier等人, *Methods Enzymol.* 185:60-98 (1990))；AD494 (DE3)；EB105；及CB (大腸桿菌B)及其衍生物；K12菌株214 (ATCC 31,446)；W3110 (ATCC 27,325)；X1776 (ATCC 31,537)；HB101 (ATCC 33,694)；JM101 (ATCC 33,876)；NM522 (ATCC 47,000)；NM538 (ATCC 35,638)；NM539 (ATCC 35,639)等。亦可使用諸多其他物種及屬類之原核生物。本發明之 $\epsilon$ -gam之肽可易於藉由使用細菌中之重組型蛋白質表現大量產生，其中肽與用於親和力純化之可裂解配位體融合。

用於在各種宿主細胞中表現之適合啟動子、載體及其他組分在此項技術中熟知。

用含有編碼 $\epsilon$ psi-gam之核苷酸序列之載體轉染適合細胞例如使用電致孔技術達成。

特定細胞或細胞株是否適用於產生本文中之呈功能活性形式之多肽可藉由經驗分析測定。舉例而言，包含所需蛋白質之編碼序列之表現構築體可用於轉染候選細胞株。隨後，經轉染細胞在培養物中生長。經轉染細胞將 $\epsilon$ psi-gam分泌入細胞培養基中。

融合蛋白質 $\epsilon$ psi-gam之分離可藉由例如在其中經轉染細胞生長之培養基中收集，分析經分泌 $\epsilon$ psi-gam之存在且純化經分泌 $\epsilon$ psi-gam來達成。隨後，可藉由此項技術中已知之方法定量 $\epsilon$ psi-gam，諸如藉由其中抗體特異性結合蛋白質之IgG、IgE部分之ELISA。

## V. 靶向疾病之性質

視所誘發免疫反應類型及因對抗原之反應性而產生之所得組織損害而定，將過敏性反應分級。當進入身體中之抗原(在此情況下稱為過敏原)遇到肥大細胞或嗜鹼性血球時，出現I型反應(速發超敏反應)，該等肥大細胞或嗜鹼性血球由於IgE而對連接至其高親和力受體(Fc $\epsilon$ RI)之抗原敏感。在到達敏感肥大細胞後，過敏原與結合於Fc $\epsilon$ RI之IgE交聯，導致細胞內鈣(Ca<sup>2+</sup>)增加，其觸發預形成介體(諸如組織胺及蛋白酶)及新合成脂質衍生介體(諸如白三烯及前列腺素)之釋放。此等內分泌物產生速發超敏反應過敏之急性臨床症狀。經刺激嗜鹼性血球及肥大細胞亦將產生且釋放促發炎介體，其參與過敏性反應之急性及延遲相。

迄今為止已識別各種過敏原，且定期識別、選殖且定序新過敏原。過敏原以不同形式進入身體且與不同疾病及疾病過程有關。

吸入空中過敏原導致過敏性鼻炎及過敏性哮喘，視暴露之性質

而定，其可為急性或慢性。眼睛曝露於空中過敏原導致過敏性結膜炎。常見空中過敏原包括花粉、動物鱗屑、塵蟎及包含大部分最常見的季節性枯草熱及過敏性哮喘病因之其他昆蟲蛋白質及黴菌孢子。

攝入過敏原導致胃腸及全身過敏性反應。所涉及之最常見食物過敏原為花生、貝類、牛奶、魚、大豆、小麥、雞蛋及樹堅果(諸如胡桃)。在易感人群中，此等食物可觸發多種過敏性症狀，諸如噁心、嘔吐、腹瀉、風疹、血管性水腫、哮喘及嚴重全身性過敏反應。

皮膚曝露於過敏原(諸如發現於乳膠手套中之天然橡膠乳膠蛋白質)可導致局部過敏性反應，與過敏原接觸之位置表現為蕁麻疹(風疹)。

全身性暴露於過敏原(諸如在手術期間在患者內部出現之蜂螫針、青黴素注射或使用天然橡膠乳膠(NRL)手套)可導致皮膚、胃腸及呼吸道反應，且包括呼吸道堵塞及嚴重全身性過敏反應。膜翅目昆蟲螫針為通常導致過敏性反應之昆蟲，通常導致過敏性休克。實例包括各種蜂，包括蜜蜂、小黃蜂、大黃蜂、胡蜂及白麵黃蜂。稱為火蟻之某些螞蟻(紅火蟻(*Solenopsis invicta*))在美國為逐漸增加之過敏病因，因為其在此國家中擴大其範圍。NRL手套中之蛋白質已變為健康照護工人及患者之增加的擔憂，且目前除了避免不存在用於此問題之成功療法形式。

## VI. epsi-gam之治療用途

epsi-gam提供一種用於治療經由高親和力IgE受體介導之疾病的新穎治療策略。

特定言之，epsi-gam提供用於治療及預防例如包括(但不限於)哮喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、嚴重食物過敏、慢性風疹及血管性水腫，以及由例如蜂螫針或青黴素過敏引起之過敏性休克之嚴重生理病狀之化合物。

epsi-gam可進一步用於急性或慢性抑制對重度環境及職業性過敏原之IgE介導之反應。

epsi-gam可用於向過敏疫苗接種或免疫療法提供保護，在用於特定過敏原之治療期間誘發非過敏性反應性病況。

當向處於危險中之個體投與時，epsi-gam藉由預防環境及職業性過敏原之過敏性敏感化而亦可對過敏性疾病具有預防作用。例如，處於哮喘基因風險之個體及在工作場所曝露於職業性過敏原之個體。

epsi-gam可急性地用於使患者脫敏，使得可安全地提供治療劑(諸如青黴素)之投與。類似地，epsi-gam可用於使患者脫敏，使得標準過敏原疫苗接種可以較大安全度提供。

epsi-gam亦可用作慢性療法以預防臨床反應性，預防環境過敏原，諸如食物或吸入過敏原。

另外，epsi-gam具有治療慢性風疹及血管性水腫之極大前景。慢性風疹及血管性水腫通常共同出現，但其同樣單獨出現。此等病狀為常見的，且一旦存在超過六個月，則其通常持續十年或十年以上。咸信epsi-gam藉由安全地阻斷接近FcεRI而形成此等疾病之新穎且有效治療的基礎。

另外，視肥大細胞及嗜鹼性血球在疾病中之作用而定，epsi-gam可用於治療發炎性關節炎，諸如類風濕性關節炎或其他自體免疫病狀。

另外，epsi-gam可用於治療慢性特發性風疹及稱為肥大細胞活化症候群之病症群。

慢性特發性風疹(CIU)為在美國影響約150,000名個體之風疹類型。在患有風疹時，個體罹患可在皮膚表面之任何位置出現且可引起瘙癢之風疹塊(凸起紅斑病變)。患有慢性形式風疹之個體將一般具有長期不消散之病變，諸如持續六週或六週以上不消散之病變。特發性

慢性類型風疹為具有未知病因之慢性風疹(因此，其為特發性的)。罹患CIU之許多個體對於其CIU具有某一類型自體免疫病因。

在美國罹患CIU之大致150,000名個體中，大致60,000名個體或40%之CIU患者對其肥大細胞及嗜鹼性血球上之高親和力IgE受體具有自體抗體。可信自體抗體結合可觸發此等個體中之CIU。針對此等個體之傳統治療包括與嚴重副作用有關之抗組織胺及類固醇。epsi-gam為用於此等個體中之CIU的優良治療。

當向患有CIU之個體投與epsi-gam時，epsi-gam使肥大細胞與嗜鹼性血球上之IgE及IgG受體交聯，因此抑制自此等細胞之發炎性介體(諸如組織胺)之釋放。藉由epsi-gam抑制肥大細胞及嗜鹼性血球可治療且預防CIU之發展，例如藉由阻斷實現自體抗體與IgE類型受體之結合且例如藉由一般下調過敏性反應。

肥大細胞活化症候群或肥大細胞活化疾病(MCAD)為與肥大細胞在個體之潛在任何器官或組織中之積累有關的疾病類別。MCAD中積聚之肥大細胞與不同類型之肥大細胞介體之異常釋放有關。MCAD之亞群包括在美國影響大致150,000名個體之皮膚肥大細胞增多症、影響大致15,000名個體之全身性肥大細胞增多症及在美國影響大致1,000名個體之侵襲性全身性肥大細胞增多症。皮膚肥大細胞增多症導致嚴重搔癢及風疹，且通常影響兒童。全身性肥大細胞增多症引起與全身性介質釋放有關之多種症狀，症狀包括搔癢、風疹、暈厥、頭痛、臉紅、血管性水腫、腹痛、腹瀉噁心及嘔吐。侵襲性全身性肥大細胞增多症為全身性肥大細胞增多症之更侵襲性形式，其可包括骨髓侵入。epsi-gam為用於MCAD之有效治療。

當向患有MCAD之個體投與epsi-gam時，epsi-gam使肥大細胞上之IgE及IgG受體交聯，因此抑制自此等細胞之發炎性介體(諸如組織胺)之釋放。藉由epsi-gam肥大細胞之抑制藉由例如阻斷實現介質釋放

來治療且預防MCAD之發展。

另外，**epsi-gam**可用於在接收免疫療法預防療法(諸如緊急免疫療法預防)之個體中提供有效輔助療法。

快速投與緊急免疫療法預防以使個體對過敏原敏感。在某些情況下，個體可能需要經由快速方法而對過敏原敏感，諸如藉由短時間接受重複的低劑量暴露。緊急免疫療法預防可例如在具有嚴重或生命威脅過敏之某人將經歷暴露或不久將曝露於過敏原之風險之情況下投與。舉例而言，患有嚴重昆蟲毒液過敏之個體可在當地昆蟲季即將開始之前的短時間內以一系列注射形式接收緊急免疫療法預防。提供**epsi-gam**與緊急免疫療法預防之組合確保預防之安全投與，提供持續耐受性且允許更快速之投與緊急免疫療法預防協定。

當向將經歷緊急免疫療法預防或正經歷緊急免疫療法預防或近期經歷緊急免疫療法預防之個體投與**epsi-gam**時，**epsi-gam**使涉及過敏性反應之細胞上之IgE及IgG受體交聯，因此抑制發炎性介體(諸如組織胺)自此等細胞釋放。涉及過敏性反應之細胞之抑制使患有對過敏原嚴重過敏之個體對彼過敏原安全快速敏感化。經由緊急免疫療法預防協定用**epsi-gam**敏感化亦產生更有效的敏感化，其產生更少症狀、較不嚴重症狀及較長持續耐受性。

**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防開始前一個月或一個月以上向個體投與。**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防開始之前一週或一週以上向個體投與。**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防開始前一天或一天以上向個體投與。**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防開始之前一小時或一小時以上向個體投與。**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防即將開始之前向個體投與。**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防開始期間任何時間向個體投與。**epsi-gam**可例如在緊急免疫療法預防開始之後任何時間向個體投與。

epsi-gam可類似地作為任何及所有針對食物之習知皮下免疫療法 (SCIT)、舌下免疫療法、基於肽之方法(Circassia)、針對食物之口服免疫療法，內淋巴(諸如以與用於情況緊急免疫療法之epsi-gam相同方式的Imvision)之輔助療法投與。

## VII. 組合物及調配物

對於包括預防之治療用途，epsi-gam可調配為與醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑混合之醫藥組合物。製造醫藥調配物之方法在此項技術中熟知。

epsi-gam之醫藥組合物可包含融合分子以及習知載劑及視情況存在之其他成分。

適合形式部分視用途或進入途徑(例如口服、經皮、吸入或注射)而定。該等形式應允許試劑或組合物到達靶細胞，無論該靶細胞是否存在於多細胞宿主或培養物中。舉例而言，注射入血流中之藥理學試劑或組合物應為可溶性的。其他因素為所屬領域中已知的，且包括諸如阻礙試劑或組合物發揮其效應之毒性及形式之考量。

載劑或賦形劑亦可用於促進化合物之投與。載劑及賦形劑之實例包括碳酸鈣；磷酸鈣；各種糖，諸如乳糖、葡萄糖或蔗糖；或澱粉類型；纖維素衍生物；明膠；植物油；聚乙二醇；及生理學上相容之溶劑。

組合物或醫藥組合物可藉由不同途徑投與，包括(但不限於)口服、靜脈內、動脈內、腹膜內、皮下、鼻內或肺內途徑。

在一個實施例中，向個體靜脈內投與epsi-gam。在一個實施例中，epsi-gam之靜脈內劑量可例如包含0.01 mg/kg。在一個實施例中，epsi-gam之靜脈內劑量可例如包含0.1 mg/kg。在一個實施例中，epsi-gam之靜脈內劑量可例如包含0.3 mg/kg。在一個實施例中，epsi-gam之靜脈內劑量可例如包含1.0 mg/kg。在一個實施例中，epsi-gam

之靜脈內劑量可例如包含3.0 mg/kg。在一個實施例中，epsi-gam之靜脈內劑量可例如包含10.0 mg/kg。應理解，epsi-gam靜脈內劑量之實例為非限制性的，且其他劑量適合於向個體靜脈內投與。

全身性投與亦可藉由經黏膜或經皮方式。對於經黏膜或經皮投與，在調配物中使用適於滲透屏障之滲透劑。

投與本發明化合物之一種途徑可為針對鼻內及/或肺內遞送之吸入劑。肺內遞送之方法之一個實例為呼氣致動計量劑量吸入器，其操作以提供回應於患者吸氣動作之自動計量劑量。

對於表面投與，如所屬領域中一般已知，將本發明化合物調配成軟膏、油膏、凝膠或乳膏。

本發明化合物可與治療IgE介導之過敏性疾病或病狀之一或多種其他治療劑組合投與。該等其他治療劑包括(但不限於)皮質類固醇、 $\beta$ 拮抗劑、茶鹼、白三烯抑制劑、過敏原疫苗接種及生物反應改質劑(諸如可溶性重組型人類可溶性IL-4受體(免疫原))及靶向Toll樣受體之療法。(參見例如 Barnes, *The New England Journal of Medicine* 341:2006-2008 (1999))。因此，本發明化合物可用於傳統過敏療法(諸如用吸入或口服皮質類固醇執行之皮質類固醇療法)之補充物。

## VIII. 製品

本發明亦提供包含epsi-gam之製品。製品包含容器及容器上或與容器相關聯之標籤或藥品說明書。

適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑膠之多種材料形成。

容器保持可有效治療病狀之組合物且可具有無菌入口。

容器亦可為吸入器裝置，諸如如上文所述之彼等物。

組合物中之至少一種活性劑為epsi-gam。

標籤或藥品說明書表明組合物用於治療所選病狀，諸如過敏性

病狀，諸如哮喘或如上文所述之IgE-介導之過敏中之任一者。

藉由以下非限制性實例部分說明其他細節。

## 實例

### 實例1：肥大細胞功效

以下提供如何獲得肥大細胞功效結果之實例。

在37°C，5% CO<sub>2</sub>條件下，藉由用過敏性人類血清作為過敏原特異性IgE之來源培育3-5天來使肥大細胞敏感

此後，通常使細胞曝露於 $\epsilon$ psi-gam 2小時，但可能長達24小時，隨後，使細胞曝露於過敏原45分鐘以使組織胺脫粒。

收集釋放入上清液中之組織胺以及細胞，且使用組織胺EIA定量組織胺含量。

### 實例2：製造 $\epsilon$ psi-gam

以下提供如何製造 $\epsilon$ psi-gam之實例。

經由基因合成產生核苷酸序列SEQ ID NO:1，其實質上編碼 $\epsilon$ psi-gam之胺基酸序列。基因合成之後，將序列嵌入選殖載體pUC57中。在表現卡匣之任一側上創建限制位點，以便能夠切除此基因以用於選殖入表現載體中。

用HindIII及EcoRI限制酶進一步浸漬含有 $\epsilon$ psi-gam之選殖載體以用於選殖入用於表現單一次單元蛋白質之表現載體(諸如Lonza GS系統pXC-17.4質體)中。此表現質體使外源蛋白質之表現與麩醯胺酸合成酶(GS)基因相關聯。

GS中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株在GS基因之兩個複本中具有突變，因此在不存在麩醯胺酸(生長所必需之胺基酸)下其需要GS在表現質體上表現以存活。

一旦將 $\epsilon$ psi-gam插入物選殖入此載體中，選擇個別細菌菌落以用於序列分析。使用位於 $\epsilon$ psi-gam之ORF外部之引子，針對質體內之適

當序列及適當定向驗證該等質體。基於此資訊，選擇一種單選殖系以用於規模化及產生足夠數量轉染CHO細胞之質體。

細菌菌落生長於無動物組分、基於大豆胰化蛋白之培養基中，且使用低內毒素套組純化質體。

在無選擇情況下，使GS CHO細胞融入適當培養基調配物中；亦即含有L-麩醯胺酸。將CHO細胞在培育箱中維持於5% CO<sub>2</sub>，37°C下。

使用電致孔執行藉由表現載體之CHO細胞轉染。藉由遞送300 V、900 μF之單脈衝使細胞電致孔，其中將電阻設定成無限。在電致孔之後，立即將各批細胞添加至含有適當培養基之燒瓶中。逐漸混合細胞，且在細胞培養培育箱中隔夜培育。第二天，離心細胞以移除含有質體之培養基。

當細胞數目達到每毫升約 $0.6 \times 10^6$ 個細胞時，將細胞擴增入選擇培養基中。在兩週選擇之後，基於傳斯維爾板(transwell plate)上之生長選擇CHO細胞之個別菌落。CHO細胞分泌具有序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。

基於經由規模化之生長及產率特徵評估個別菌落。

隨後，藉由蛋白質A親和層析，隨後進行AU280nm；ELISA及SDS-PAGE分析，分析產物之數量及完整性。

### 實例3：緊急免疫療法預防

以適當劑量，每月3次(12週)向參與兩個劑量組中之一組(20次實驗，10安慰劑/組)，具有蜂螫針記錄過敏(IgE，皮膚測試，症狀)且願意經歷1個月院內緊急IT協定之六十名個體投與epsi-gam。基於藥物活性(PD生物標記物)之文檔，在1-2次epsi-gam給藥之後，開始緊急免疫療法預防。

### 實例4：epsi-gam在哮喘之恆河猴模型中改良早期及晚期臨床反應

圖 7-9 展示向 12 隻恆河猴投與 *epsi-gam* 之實驗之結果。在提供 *epsi-gam* 之前，已預先使 12 隻恆河猴對室塵蟎敏感，使得其遵循 Van Scott, M. 等人, *Dust mite-induced asthma in cynomolgus monkeys. J Appl Physiol* 96: 1433-1444, 2004 中描述之協定發展哮喘。12 隻恆河猴顯示回應於肺刺激之肺耐受性 ( $R_{\text{肺}}$ ) 增加與動態順應性 ( $C_{\text{動態}}$ ) 降低。

就對室塵蟎 (HDM) 具有特異性之 IgE 含量，篩選約 150 隻恆河猴，以便選擇已曝露於且已對 HDM 過敏之動物。在公認協定 (Van Scott, *JAPhysiol*, 2004) 下，使短尾猿每兩週一次接受皮下及霧劑 HDM 敏感化以誘發過敏性哮喘之呼吸道症狀。先前公開案已確立此模型之病理生理學及其與人類疾病之關聯性 (Van Scott, *JAPhysiol*, 2004)。二十隻動物中之九隻發展對霧化 HDM 之耐受性 ( $R_{\text{肺}}$ ) 反應，且另外三隻動物展現增加的呼吸道速率及降低的動態順應性 ( $C_{\text{動態}}$ )，但 HDM 攻擊之後  $R_{\text{肺}}$  無明顯變化。支氣管肺泡灌洗術分化細胞計數證實耐受性反應者動物中之呼吸道由嗜伊紅血球之滲浸。使 12 隻 HDM 敏感動物參見用 *epsi-gam* 進行之試驗。將表明有效敏感化之針對霧化過敏原之靶向反應包括肺耐受性 ( $R_{\text{肺}}$ ) 增加 100%、動態順應性 ( $C_{\text{動態}}$ ) 降低 40% 及誘發此等靶向反應之 HDM 霧劑濃度降低。

將 12 隻 HDM 敏感動物分成三組，相同地劃分耐受性反應者與無反應者，且最初經 30 分鐘時間段向各組中之四隻動物提供媒劑對照 (PBS) 之 IV 輸注。在使用儀器光麻醉之後，獲得用一個劑量之霧化 HDM 攻擊後 (對各動物個別化) 之肺耐受性 ( $R_{\text{肺}}$ ) 及動態順應性 ( $C_{\text{動態}}$ ) 之基礎量測值，產生至少 100% 之  $R_{\text{肺}}$  增加及 40% 之  $C_{\text{動態}}$  降低。每隔兩週投與相同劑量霧化 HDM 以確立基礎反應。如圖 7 中所說明，歷經 6 週時間，在所有組中獲得一致基礎反應 (圓)。

隨後，藉由經 30 分鐘 IV 輸注 1 mg/kg、3 mg/kg 或 10 mg/kg 之 *epsi-gam* 來處理各組之四隻動物。同樣，在使用與研究之媒劑組之各動物

中所用相同之劑量HDM之兩週間隔的霧化HDM攻擊後獲得 $R_{肺}$ 及 $C_{動態}$ 之量測值。處理之後，接受3 mg/kg劑量 $\epsilon$ psi-gam之動物展現 $R_{肺}$ 及 $C_{動態}$ 中之較小HDM誘發變化，持續長達8週(圖7)。未在1 mg/kg組及類似反應中觀測到一致效應，但可在10 mg/kg組中發現略微更多變化(圖8)。

在霧化HDM攻擊後24小時，量測動物對甲膽鹼之敏感性。將遞增劑量之甲膽鹼遞送至呼吸道中直至觀測到 $R_{肺}$ 增加100%及/或 $C_{動態}$ 降低50%。關於接受3 mg/kg之 $\epsilon$ psi-gam之動物，在圖9中標繪甲膽鹼之誘發性濃度(定義為導致 $R_{肺}$ 之100%最大反應之劑量)。

### 實例5： $\epsilon$ psi-gam抑制類別轉換

免疫球蛋白由抗原識別域(VDJ)及效應子域組成，由各種恆定域調節。5個恆定區( $C_{\mu}$ 、 $C_{\delta}$ 、 $C_{\gamma}$ 、 $C_{\epsilon}$ 及 $C_{\alpha}$ )為VDJ區之下游且其表現受個別啟動子控制。同型轉換經由涉及生殖系轉錄及類別轉換再結合之多步驟過程出現。類別轉換再結合被認為僅在淋巴結及脾之生發中心中出現之過程。然而，已在過敏原攻擊之後的患有鼻炎及哮喘之個體之鼻及支氣管活檢體內觀察到生殖系轉錄物。此等研究已提出局部IgE類別轉換可顯著促進疾病病源學之可能性。

在人類B細胞內需要兩種信號以產生IgE類別轉換：參與B細胞上之CD40L及IL-4或IL-13。人類B細胞表現「低親和力」(nM) IgE受體(CD23)與 $Fc\gamma RIIb$ 。預先(參考文獻)已展示 $Fc\gamma RIIb$ 受體之參與經由抑制類別轉換再結合而產生IgE產生之抑制，且此效應經由 $Fc\gamma RIIb$ 內之ITIM域介導。為測定 $\epsilon$ psi-gam共同參與CD23及 $Fc\gamma RIIb$ 是否可導致IgE產生減少，經由組織消化，隨後進行磁性細胞分離來分離人類扁桃體初始B細胞。在抗CD40抗體(0.5  $\mu$ g/mL)、IL-4 (20 ng/mL)及IL-13 (200 ng/mL)存在下培養B細胞以誘發類別轉換再結合。在此期間添加遞增濃度之 $\epsilon$ psi-gam (0-80 nM)，且在刺激後第7天藉由定量PCR來定<sub>5</sub>

量所得IgE轉錄物之含量。兩種參考基因用於標準化IgE、大核糖體蛋白質(RPL0)及 $\beta$ 肌動蛋白之表現量。藉由Vandesompele, 等人(參考文獻)之方法執行標準化。圖10展示 $\epsilon$ psi-gam抑制IgE轉錄物在人類B細胞中之相對表現。

**【符號說明】**

無

## 【序列表】

<110> 美商杜尼塔治療公司  
諾蘭 西葛  
吉任堤 史畢瑞迪

<120> EPSIGAM融合蛋白質

<130> 36249-701.201

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> SEQ ID NO 1

<211> 1722

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> SEQUENCE: 1

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctctgtctct gggttccagg ttccactggt      60
gacttcaccc cgcccaccgt gaagatctta cagtcgtcct gcgacggcgg cgggcacttc      120
ccccgacca tccagctcct gtgcctcgtc tctgggtaca ccccagggac tatcaacatc      180
acctggctgg aggacgggca ggtcatggac gtggacttgt ccaccgcctc taccacgcag      240
gagggtgagc tggcctccac acaaagcgag ctcaccctca gccagaagca ctggctgtca      300
gaccgcacct acacctgcca ggtcacctat caaggtcaca cctttgagga cagcaccaag      360
aagtgtgcag attccaaccc gagaggggtg agcgcctacc taagccggcc cagcccgttc      420
gacctgttca tccgcaagtc gcccacgata acctgtctgg tgggtggacct ggcacccagc      480
aaggggaccg tgaacctgac ctgggtcccgg gccagtggga agcctgtgaa ccactccacc      540
agaaaggagg agaagcagcg caatggcacg ttaaccgtca cgtccaccct gccgggtgggc      600
acccgagact ggatcgaggg ggagacctac cagtgcaggg tgaccacccc ccacctgccc      660
agggccctca tgcggtccac gaccaagacc agcggccccg gtgctgcccc ggaagtctat      720
gcgtttgcga cgccggagtg gccggggagc cgggacaagc gcaccctcgc ctgcctgata      780
cagaacttca tgctgagga catctcgggt cagtggctgc acaacgaggt gcagctcccg      840
gacgcccggc acagcacgac gcagccccgc aagaccaagg gctccggctt ctctgtcttc      900
agccgcctgg aggtgaccag ggccgaatgg gagcagaaag atgagttcat ctgccgtgca      960

```

gtccatgagg cagcgagccc ctcacagacc gtccagcgag cgggtgtctgt aaatcccggg 1020  
 aaagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 1080  
 ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 1140  
 cggaccacctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag 1200  
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1260  
 cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc gtccctaccg tcttgcacca ggactggctg 1320  
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc acaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1380  
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1440  
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1500  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1560  
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1620  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1680  
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga 1722

<210> SEQ ID NO 2

<211> 552

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> SEQUENCE: 2

Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met  
 35 40 45

Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala  
 50 55 60

Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp  
 65 70 75 80

Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp  
 85 90 95

Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr  
 115 120 125

Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn  
 130 135 140

Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg  
 145 150 155 160

Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu  
 165 170 175

Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg  
 180 185 190

Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys  
 195 200 205

Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro  
 210 215 220

Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln  
 225 230 235 240

Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val  
 245 250 255

Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys  
 260 265 270

Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu  
 275 280 285

Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala



Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
515 520 525

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
530 535 540

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
545 550

## 申請專利範圍

1. 一種融合蛋白質，其包含序列SEQ ID NO:2。
2. 如請求項1之融合蛋白質，其進一步包含：包含兩個共價連接多肽之均二聚體，該兩個共價連接多肽包含該序列SEQ ID NO:2。
3. 如請求項1之融合蛋白質，其進一步包含：包含兩個共價連接多肽之雜二聚體，該兩個共價連接多肽中之一者包含該序列SEQ ID NO:2。
4. 一種用於製造融合蛋白質之方法，其包含：  
將編碼包含該序列SEQ ID NO:2之該融合蛋白質之聚核苷酸整合入表現載體中；用該表現載體轉染真核細胞；及自該真核細胞分離包含該序列SEQ ID NO:2之該融合蛋白質。
5. 如請求項4之方法，其中該真核細胞為中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary/CHO)細胞。
6. 一種用於治療或預防哮喘之方法，其包含向個體投與包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
7. 一種用於治療或預防過敏性反應之方法，其包含向個體投與包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
8. 如請求項7之方法，其中該過敏性反應包含下列至少一者：過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、嚴重食物過敏、慢性風疹、血管性水腫及IgE介導之對藥物之反應。
9. 一種用於治療或預防個體中發展過敏性反應之方法，該方法包含向該個體靜脈內投與0.01 mg/kg之包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
10. 一種用於治療或預防個體中發展過敏性反應之方法，該方法包含向該個體靜脈內投與0.1 mg/kg之包含序列SEQ ID NO:2之融合

蛋白質。

11. 一種用於治療或預防個體中發展過敏性反應之方法，該方法包含向該個體靜脈內投與0.3 mg/kg之包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
12. 一種用於治療或預防個體中發展過敏性反應之方法，該方法包含向該個體靜脈內投與1.0 mg/kg之包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
13. 一種用於治療或預防個體中發展過敏性反應之方法，該方法包含向該個體靜脈內投與3.0 mg/kg之包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
14. 一種用於治療或預防個體中發展過敏性反應之方法，該方法包含向該個體靜脈內投與10.0 mg/kg之包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
15. 一種用於治療或預防個體中發展肥大細胞活化症候群之方法，該方法包含向該個體投與包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
16. 如請求項15之方法，其中肥大細胞活化症候群包含皮膚肥大細胞增多症、全身性肥大細胞增多症或侵襲性全身性肥大細胞增多症。
17. 一種向個體投與緊急免疫療法預防之方法，該方法包含在該緊急免疫療法預防之該投與之時間向該個體投與包含序列SEQ ID NO:2之融合蛋白質。
18. 如請求項17之方法，其中該融合蛋白質係在該緊急免疫療法預防之該投與之前、在該緊急免疫療法預防之該投與期間或在該緊急免疫療法預防之該投與之後中之一或多個時間段投與該個體。
19. 如請求項17之方法，其中該融合蛋白質每月投與，且該個體在

該緊急免疫療法預防之該投與之前已接受至少一次該融合蛋白質之給藥。

## 圖式

構築體	總蛋白質 (mg/L)	單體 (%)	聚集體 (%)	最終效價 (mg/L)
epsi-gam	1893	94	6	1779
E2G	0.085	N/A	極高	N/A
GE2	162.4	71.9	28.1	117
GE2-lys	86	73.5	26.5	63
GE2-鉸鏈	166.1	70.6	29.4	117

圖1

hGE2 SRT-10層析

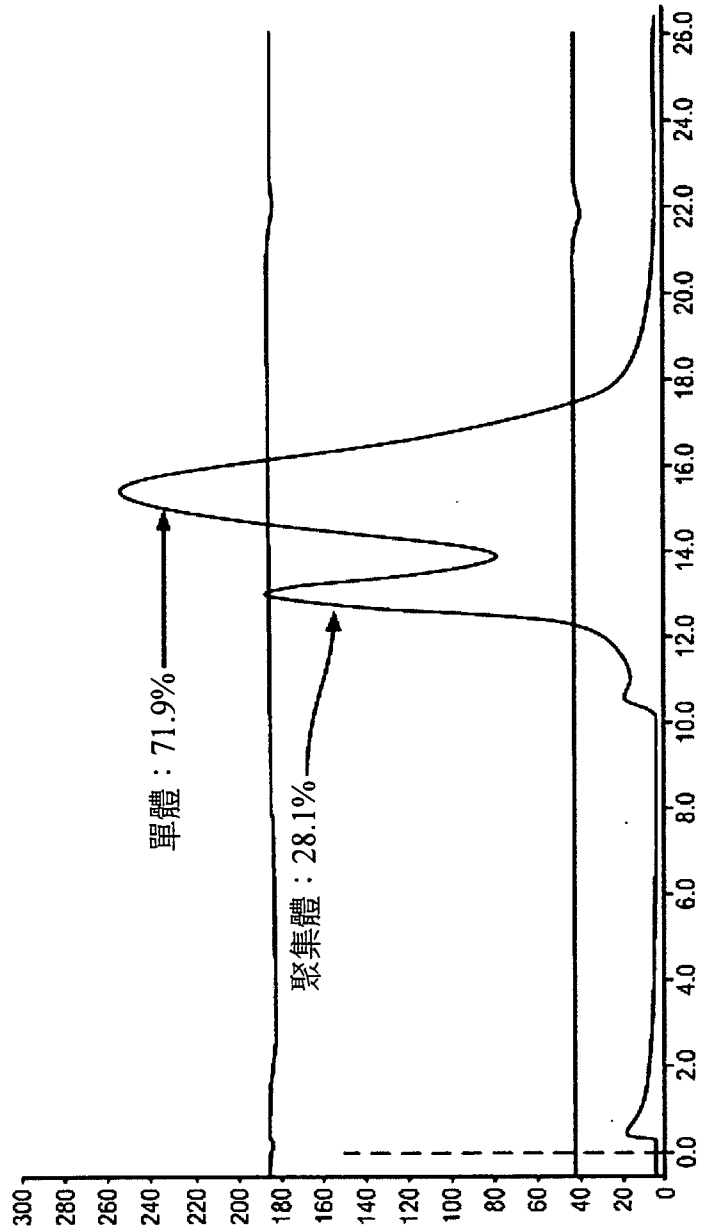


圖2

hGE2 SRT-10層析

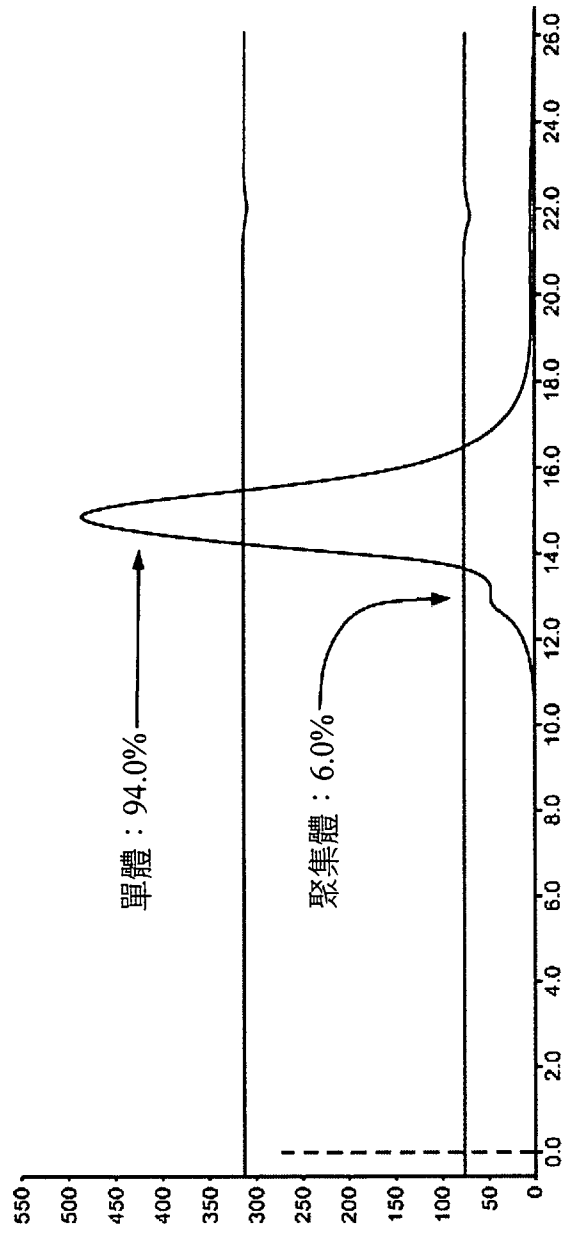


圖3

Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro  
 Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr  
 Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu  
 Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp  
 Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys  
 Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp  
 Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys  
 Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg  
 Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr  
 Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg  
 Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala  
 Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln  
 Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp  
 Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser  
 Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val  
 His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

圖4

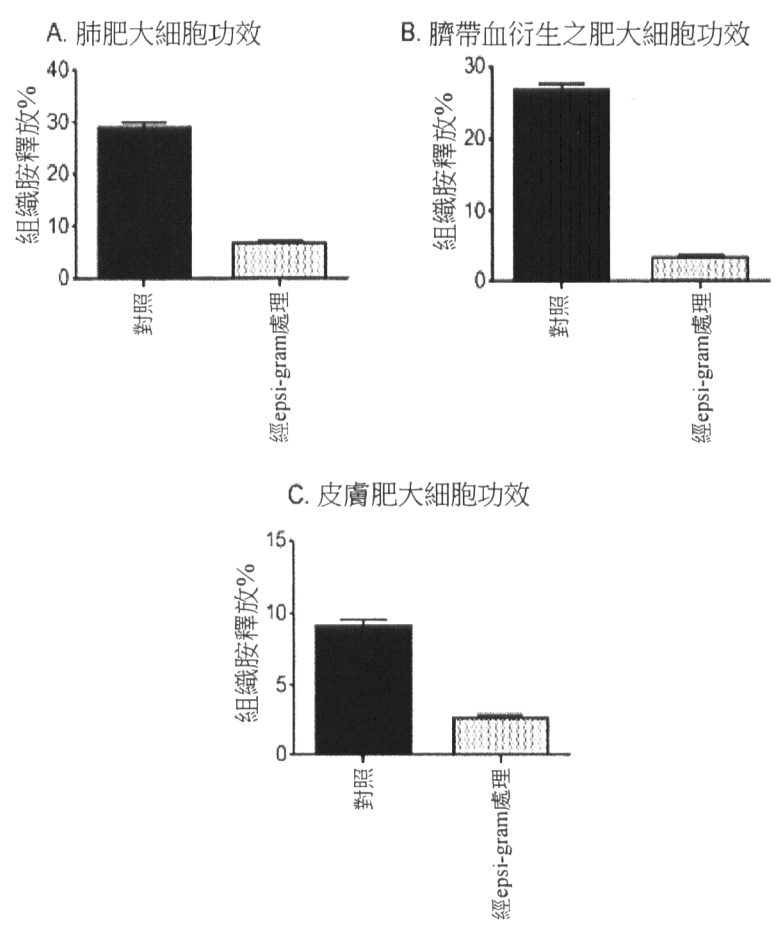


圖5

atggagacagacacactcctgctatgggtactcctgctctgggtccaggtccactggtgacttccccgcccaccgtgaagatcttacagtc  
gtcctgcgacggcggcggcacttcccccgaccatccagctcctgtgcctcgtctctgggtacccccaggactatcaacatcacctggct  
ggaggacgggcaggtcatggacgtggacttgtccaccgcctctaccacgcaggagggtgagctggcctccacacaaagcgagctcacctc  
agccagaagcactggctgtcagaccgcactacacctgccaggtcacctatcaaggtcacaccttgaggacagcaccaagaagtgtgcaga  
ttcaaccgagaggggtgagcgcctacctaagccggcccagcccgttcgacctgttcatccgcaagtcgcccacgatcacctgtctgggtgt  
ggacctggcaccagcaaggggaccgtgaacctgacctgggtcccggccagtgagggaagcctgtgaacctccaccagaaaggaggaga  
agcagcgcgaatggcacgttaaccgtcacgtccaccctgccggtgggcacccgagactggatcgagggggagacctaccagtgcagggtga  
cccacccccacctgccagggccctcatgcggtccacgaccaagaccagcggcccgcgtgctgccccggaagtctatgcgtttgcgacgcc  
ggagtggccggggagccgggacaagcgcaccctgcctgcctgatccagaacttcatgcctgaggacatctcgtgagctggctgcacaac  
gaggtgcagctcccggacgcccggcacagcacgacgcagccccgcaagaccaagggtccggcttctcgtcttcagccgcctggagggtg  
accagggccgaatgggagcagaaagatgagttcatctgccgtgcagtccatgaggcagcagcccctcacagaccgtccagcgcggtgt  
ctgtaaatcccggtaagagcccacaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttt  
ccttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctg  
aggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccggg  
tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaaagccctcccagccccatc  
gagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccag  
gtcagcctgacctgcctggtaaaagcttctatcccagcgcacatgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaaga  
ccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct  
catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

圖6

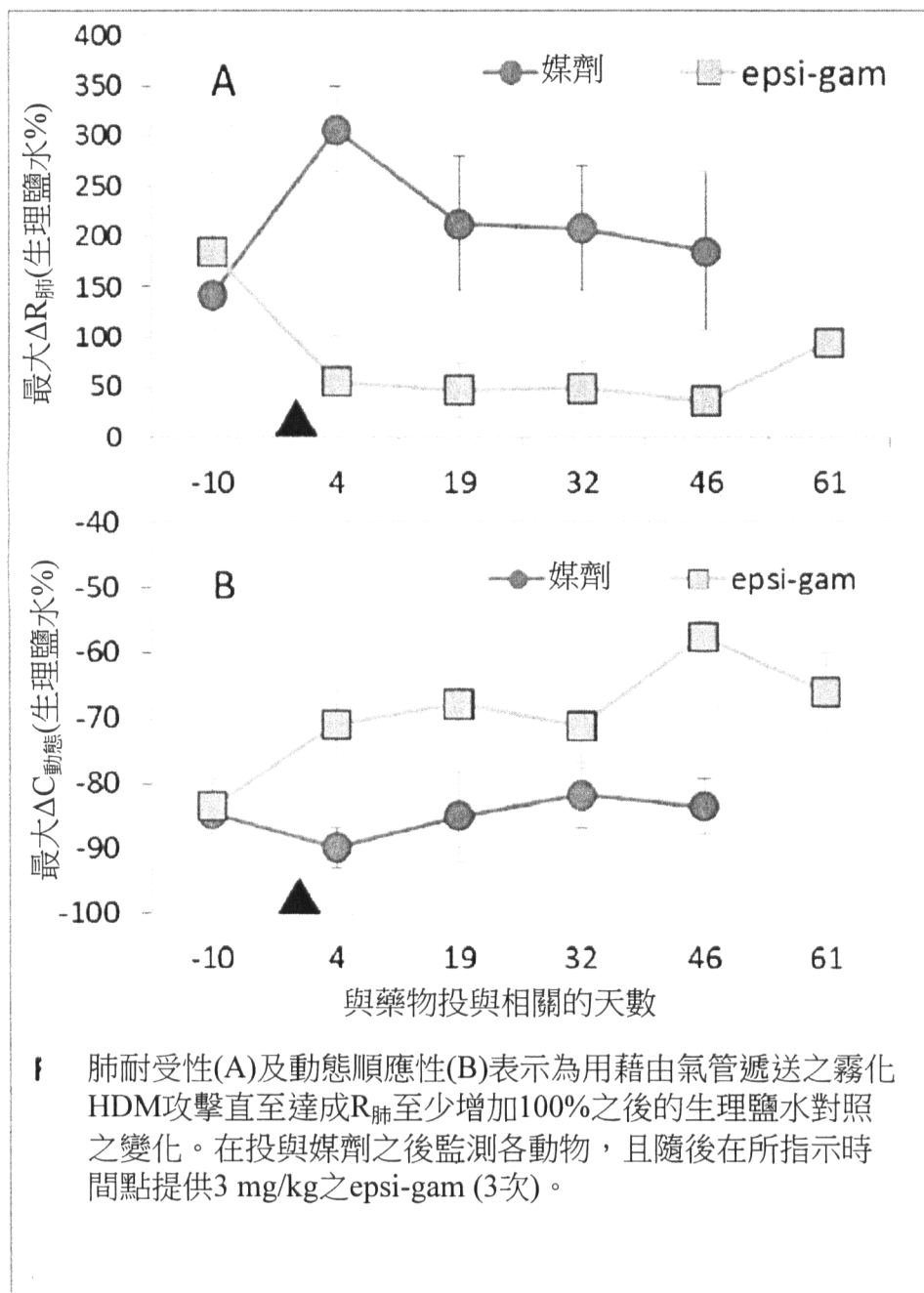


圖7

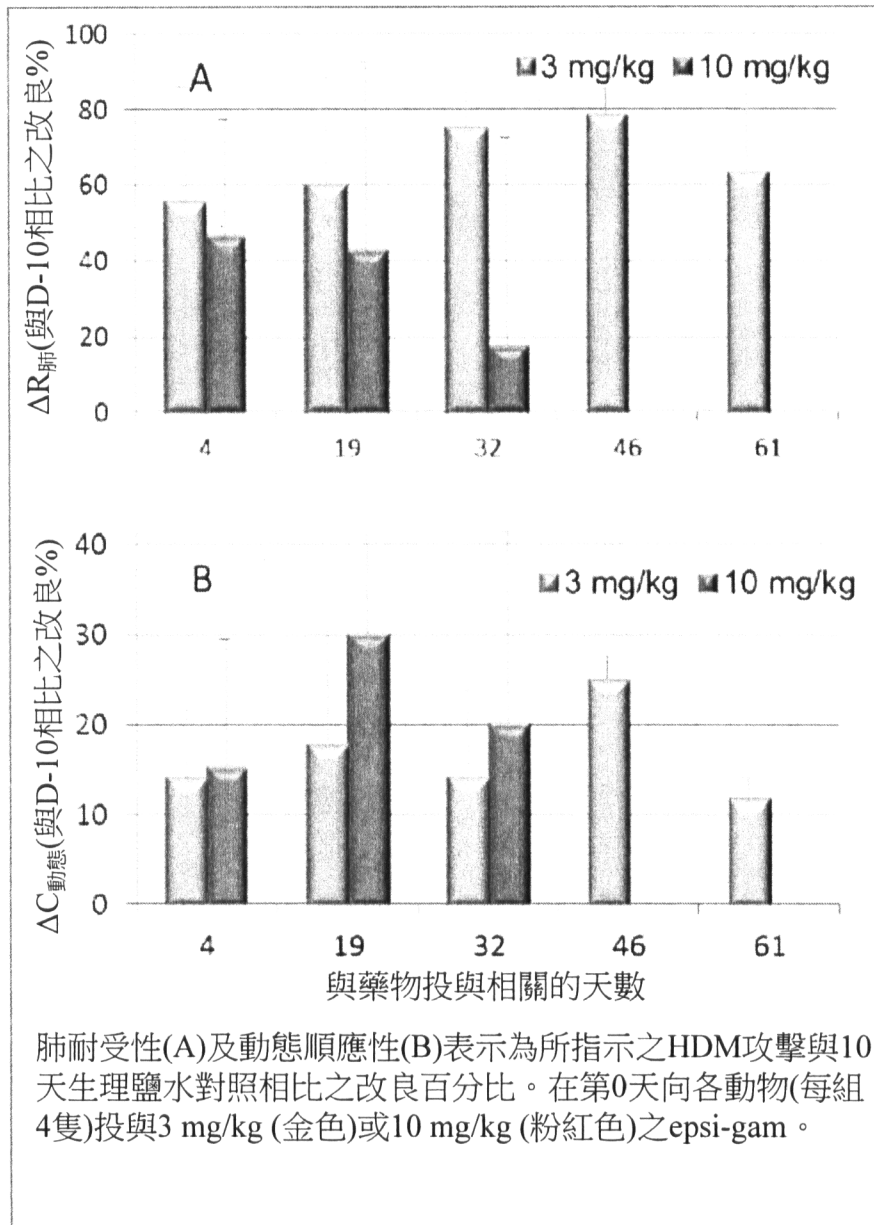


圖8

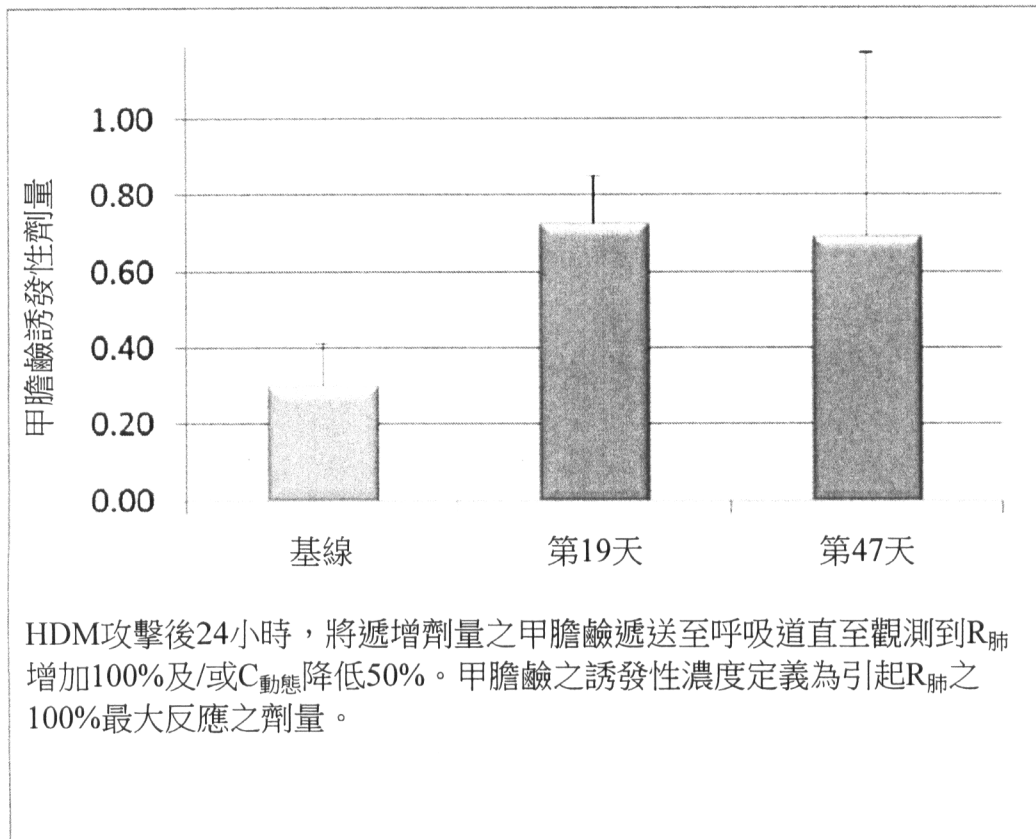


圖9

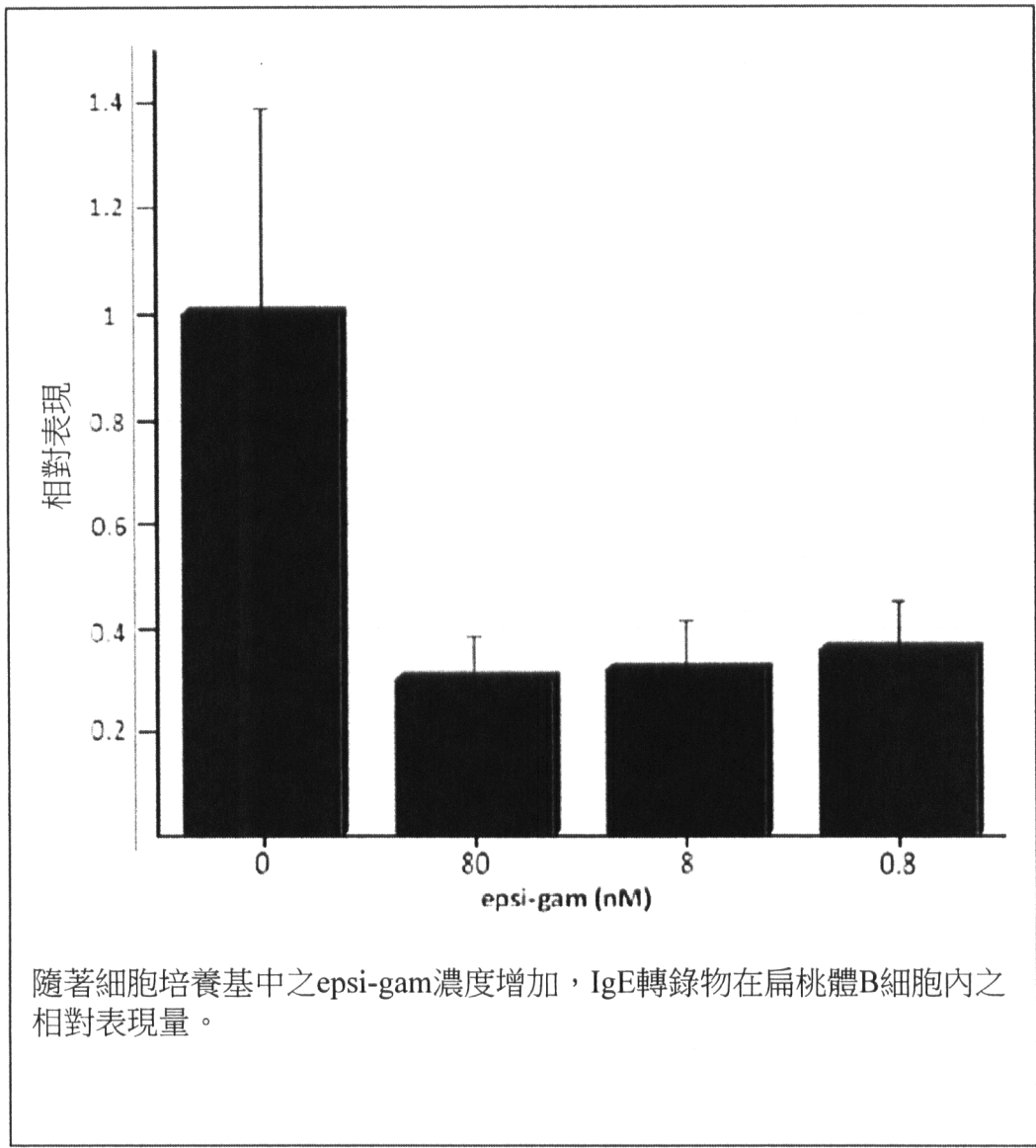


圖10