

發明專利說明書

PD1084312(5)

(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：97130018

※申請日期：97.8.7

※IPC 分類：

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

對表現含死亡功能域受體之細胞誘導細胞凋零之免疫微脂粒

IMMUNOLIPOSOME WHICH CAN INDUCE APOPTOSIS TO THE CELLS

EXPRESSING DEATH DOMAIN-CONTAINING RECEPTORS

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文) (簽章) ID：

第一三共股份有限公司(第一三共株式会社)

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

代表人：(中文/英文) (簽章)

庄田隆

SHODA, TAKASHI

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都中央區日本橋本町3丁目5番1號

3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中文/英文)

日本

Japan

三、發明人：（共4人）

姓 名：（中文/英文） ID：

1. 森田浩司/MORITA, KOJI
2. 丹羽貴子/NIWA, TAKAKO
3. 市川公久/ICHIKAWA, KIMIHISA
4. 好田宏子/YOSHIDA, HIROKO

國 籍：（中文/英文）

1. ~4. 日本
Japan

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：

日本 2007/8/9 特願 2007-208664

☐ 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。

三、發明人：（共4人）

姓 名：（中文/英文） ID：

1. 森田浩司/MORITA, KOJI
2. 丹羽貴子/NIWA, TAKAKO
3. 市川公久/ICHIKAWA, KIMIHISA
4. 好田宏子/YOSHIDA, HIROKO

國 籍：（中文/英文）

1. ~4. 日本

Japan

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：

日本 2007/8/9 特願 2007-208664

☐ 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：

【發明所屬之技術領域】

本發明為有關作為腫瘤之治療及/或預防劑有用之含有與細胞凋零誘導關連之細胞表面受體結合之抗體、對表現該細胞表面受體之細胞具有誘導細胞凋零作用之免疫微脂粒、及用該微脂粒之治療及/或預防癌、自體免疫疾病或炎症性疾病之方法。

【先前技術】

微脂粒因可包含多量水溶性或疏水性之物質，故作為藥物載劑，尤其靜脈注射用之 Drug Delivery System：DDS 之載劑頗受高度關心((D.D.Lasic, " Liposomes： from basic to applications" , Elsevier Science Publishers, (1993)))。近年以親水性高分子，例如聚乙二醇(PEG)表面修飾之微脂粒比習用之微脂粒減輕微脂粒之凝集化及於體內之由細網內皮系之捕捉等，而也可適用於體內安定性低之藥物，作為實現血中之高安定性(藥物血中半減期 20-40 小時)之製劑技術已達實用化。更於近年，以賦予機能性為目的有諸多嘗試於微脂粒表面結合(含有)蛋白質、胜肽、糖等機能性分子。

作為將藥物輸送至體內特定部位之手段，提案於微脂粒封入藥劑，於其表面結合抗體之方法，尤其於癌治療之領域，有封入抗腫瘤劑之抗體結合微脂粒之有效性之報告。如此含有抗體之微脂粒乃稱免疫微脂粒。多數場合，免疫微脂粒之藥效為依內封於微脂粒之抗腫瘤劑，他方面，於

免疫微脂粒含有之抗體乃藉結合於對腫瘤細胞專一地表現之抗原，利用以將免疫微脂粒輸送至腫瘤細胞。故一般含於免疫微脂粒之抗體，只要具有腫瘤細胞專一地結合抗原之機能即可，抗體本身具有作為治療劑之機能並非必須。即使於如此賦予標的指向性之微脂粒(即使於 PEG 微脂粒)，被投與中之大部分於到達標的細胞以前補足於肝臟等免疫細胞而消費，或多量之藥物消失於溶液中，故實際到達標的部位而能表現活性之藥物只限於一部分。於是，將藥物就更安定含有而到達標的細胞，於標的部位賦予有效率放出內封藥物之機能之微脂粒雖有諸多嘗試開發，但未至實用化。又理論上微脂粒應可適用於所有藥物，但是否能於血中安定地保持藥物，則大大依存於微脂粒之脂質成分與內封藥物之物性相互作用(相性)，適用可能之藥物之種類實際上被限定為現狀。如此，於有限送達量封入有限種類之藥物之微脂粒，欲得更高藥理效果，於微脂粒要求以新形更賦予藥理效果。

已知參與死亡受體所代表之細胞凋零誘導之細胞表面受體為由配體結合之細胞膜上之局部受體之多量化成為生物學上對細胞內之細胞凋零·信號誘導之扳機 (Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003))。具有參與細胞凋零誘導對細胞表面受體之結合能力之抗體，現在處於作為治療藥臨床之開發階段，表現該受體之細胞(癌細胞·免疫疾病關連細胞)專一地呈激動劑作用，期待將此死滅之治療效果。作為此抗體之作用機制，於該受體結合之前或結合之

後，抗體彼此被交聯而多量化，引起抗原受體之多量化(也即細胞凋零誘導)。於活體外實驗，添加對本抗體之二次抗體而人工交聯為活性表現所必要，又於活體內，由免疫效應細胞上之Fc受體而交聯乃視為抗體之活性表現必要之作用機制。近年，改變抗體之構造來嘗試使抗體本來之機能更增強，例如去除抗體上特定之糖鏈構造來改善與Fc受體之親和性之報告。但免疫效應細胞之量或功能有個人差，又於既受藥物治療之癌患者或免疫疾病患者，免疫效應細胞之量或功能大大降低。於如此癌、免疫疾病患者，以既存之抗體有不能獲得充分藥效之疑慮，須求抗體本身之更加機能增強。

【發明內容】

本發明之一課題為提供對癌具有治療效果之醫藥品。本發明之另一課題為提供含有可對細胞誘導細胞凋零之抗體之微脂粒製劑。

本發明者等為解決上述課題致力檢討結果，發現含有可對細胞誘導細胞凋零之抗體之微脂粒製劑比該抗體單獨之場合，可呈示顯著細胞凋零誘導能力，終於完成本發明。本發明之微脂粒於微脂粒上將抗體以高密度存在，則與生物學上交聯之抗體同樣機能，其結果可不依存活體外之二次抗體或活體內之效應細胞之存在，免疫微脂粒單獨則可更有效發揮細胞凋零誘導能力。由此，即使在抗體單獨則無法獲得充分治療效果之患者也可得有效治療效果。又封入藥物之本免疫微脂粒除以藥物為標的細胞有效標定之機

能，也有由藥物之治療效果和增強之抗體之活性之治療效果之雙重藥理效果。由此，可得藥物封入微脂粒單獨或只具有標定能力之抗體之免疫微脂粒則無法實現之治療效果。

也即，本發明包含以下之發明。

(1)一種免疫微脂粒，其與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合而含有如下(a)及(b)：

(a)與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體、該抗體之機能性片段、或含有該抗體之重鏈及輕鏈之相補性決定部位而與該細胞表面受體專一地結合之多肽；

(b)兩親媒性小胞形成脂質。

(2)如(1)記載之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞呈示細胞凋零誘導活性。

(3)如(1)或(2)記載之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞，若於該細胞表面受體專一地結合之抗體之全長分子由二次抗體或蛋白質 G、A 等抗體結合蛋白質來交聯時呈示與於活體外呈示細胞凋零誘導活性同等、或於活體外呈示更強細胞凋零誘導活性。

(4)如(1)至(3)記載之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞，若於該細胞表面受體專一地結合之抗體之全長分子由二次抗體或蛋白質 G、A 等抗體結合蛋白質來交聯時與於活體外呈示之 50%細胞生存濃度比較，呈示 1/2.5 以下之 50%細胞生存濃度。

(5)如(1)至(4)記載之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋

零誘導之細胞表面受體之細胞，若於該細胞表面受體專一地結合之抗體之全長分子由二次抗體或蛋白質 G、A 等抗體結合蛋白質來交聯時與於活體外呈示之 50%細胞生存濃度比較，呈示 1/10 以下之 50%細胞生存濃度。

(6)如(1)至(5)中任一項記載之免疫微脂粒，其係含有與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體，而該抗體為抗體之全長分子。

(7)如(6)記載之免疫微脂粒，其係含有抗體之全長分子對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 0.23 莫耳%之抗體密度。

(8)如(7)記載之免疫微脂粒，其係含有抗體之全長分子對總脂質莫耳數為 0.002 莫耳%至 0.14 莫耳%之抗體密度。

(9)如(1)至(5)中任一項記載之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體之機能性片段為 $F(ab')_2$ 。

(10)如(9)記載之免疫微脂粒，其中含有 $F(ab')_2$ 對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 0.23 莫耳%之抗體密度。

(11)如(10)記載之免疫微脂粒，其中含有 $F(ab')_2$ 對總脂質莫耳數為 0.006 莫耳%至 0.11 莫耳%之抗體密度。

(12)如(1)至(5)中任一項記載之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體之機能性片段為 Fab' 。

(13)如(12)記載之免疫微脂粒，其中含有 Fab' 對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 0.94 莫耳%之抗體密度。

(14)如(13)記載之免疫微脂粒，其中含有 Fab' 對總脂質莫耳數為 0.005 莫耳 %至 0.56 莫耳 %之抗體密度。

(15)如(1)至(14)中任一項記載之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體為嵌合體抗體。

(16)如(1)至(14)中任一項記載之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體為人化抗體。

(17)如(1)至(14)中任一項記載之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體為人抗體。

(18)如(1)至(5)中任一項記載之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之多肽為單鏈可變部位抗體。

(19)如(18)記載之免疫微脂粒，其中含有單鏈可變部位抗體對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳 %至 1.8 莫耳 %之抗體密度。

(20)如(19)記載之免疫微脂粒，其中含有單鏈可變部位抗體對總脂質莫耳數為 0.005 莫耳 %至 0.56 莫耳 %之抗體密度。

(21)如(1)至(20)中任一項記載之免疫微脂粒，其中參與細胞凋零誘導之細胞表面受體為含有死亡功能域之受體。

(22)如(21)記載之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為由 Fas、DR4、DR5 及 TNF 受體而成之群選擇。

(23)如(22)記載之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為 DR5。

(24)如(22)記載之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為 DR4。

(25)如(22)記載之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為 Fas。

(26)如(23)記載之免疫微脂粒，其中抗體分子或該抗體之機能性片段為含有由序列表記載之序列編號 1 之胺基酸序列之 1~118 號胺基酸殘基而成重鏈可變領域序列及序列表記載之序列編號 2 之胺基酸序列 1~107 號之胺基酸殘基而成之輕鏈可變領域序列。

(27)如(24)記載之免疫微脂粒，其中抗體分子或該抗體之機能性片段為含有由融合瘤 2E12 產生之抗體、與該抗體同一抗原決定部位結合之抗體或由該抗體之人化抗體選擇之抗體之重鏈及輕鏈可變領域。

(28)如(25)記載之免疫微脂粒，其中抗體分子或該抗體之機能性片段為含有由序列表記載之序列編號 3 之胺基酸序列之 1~139 號之胺基酸殘基而成重鏈可變領域序列及序列表記載之序列編號 4 之胺基酸序列 1~131 號之胺基酸殘基而成輕鏈可變領域序列。

(29)一種免疫微脂粒，其與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合而含有如下(a)及(b)：

(a)與該細胞表面受體專一地結合，且具有仲介該受體而於細胞誘導細胞凋零之活性之內因性配體或該內在性配體之

機能性片段；

(b)兩親媒性小胞形成脂質。

(30)如(29)記載之免疫微脂粒，對表現該細胞表面受體之細胞，呈示比該內因性配體更強之細胞凋零誘導活性。

(31)如(29)或(30)記載之免疫微脂粒，其中細胞表面受體為含有死亡功能域之受體。

(32)如(31)記載之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為由 Fas、DR4、DR5 及 TNF 受體而成之群選擇。

(33)如(32)記載之免疫微脂粒，其中對含有死亡功能域之受體之內在性配體為 TRAIL 或 Fas 配體。

(34)如(1)至(33)中任一項記載之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質含有固醇類、磷脂質。

(35)如(34)記載之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之一之固醇類為膽固醇。

(36)如(35)記載之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之一之膽固醇以對總脂質莫耳數為 20 莫耳%至 50 莫耳%之比例含有。

(37)如(34)至(36)中任一項記載之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之一之磷脂質為磷脂醯膽鹼。

(38)如(37)記載之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之磷脂醯膽鹼中之醯基為碳數 14 至 22。

(39)如(38)記載之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之磷脂醯膽鹼中之醯基為碳數 14 至 18。

(40)如(34)至(39)中任一項記載之免疫微脂粒，其中構成免

疫微脂粒之脂質更含有親水性聚合物或該親水性聚合物之脂質衍生物。

(41)如(40)記載之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物中親水性聚合物之平均分子量為500至20000。

(42)如(41)記載之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物中親水性聚合物之平均分子量為2000至5000。

(43)如(40)至(42)中任一項記載之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物以對總脂質莫耳數為0.1莫耳%至10莫耳%之比例含有。

(44)如(40)至(44)中任一項記載之免疫微脂粒，其中如(43)記載之免疫微脂粒、親水性聚合物之脂質衍生物以對總脂質莫耳數為1莫耳%至6莫耳%之比例含有。

(45)如(40)至(44)項任項之一種構成免疫微脂粒之脂質之一，其中親水性聚合物之脂質衍生物為聚乙二醇修飾脂質。

(46)如(34)至(44)中任一項記載之免疫微脂粒，其中使用末端具有馬來醯亞胺基之脂質或親水性聚合物、微脂粒和抗體仲介硫醚結合來結合。

(47)如(1)至(46)中任一項記載之免疫微脂粒、免疫微脂粒之平均粒徑為30-1000nm。

(48)如(47)記載之免疫微脂粒，其中免疫微脂粒之平均粒徑為30-200nm。

(49)如(1)至(48)中任一項記載之免疫微脂粒，其微脂粒中封入具有抗腫瘤活性之藥劑。

(50)如(1)至(48)中任一項記載之免疫微脂粒，其微脂粒中

封入具有自體免疫疾病或炎症性疾病之治療作用之藥劑。

(51)一種醫藥組成物，含有如(1)至(50)中任一項記載之免疫微脂粒為有效成分。

(52)一種抗腫瘤劑，含有如(1)至(49)中任一項記載之免疫微脂粒為有效成分。

(53)一種自體免疫性疾病或炎症性疾病之治療劑，含有如(1)至(48)或(50)中任一項記載之免疫微脂粒為有效成分。

【實施方式】

(實施發明之最佳形態)

本說明書中，「癌」和「腫瘤」以同意義使用。

本說明書中，「基因」一詞，不只 DNA，也含有其 mRNA、cDNA 及其 cRNA。

本說明書中，「聚核苷酸」一詞以與核酸同意義使用，也包括 DNA、RNA、探針、寡核苷酸、及引子。

本明細中，「多肽」和「蛋白質」不區別使用。

本說明書中，「RNA 劃份」乃指含有 RNA 之劃份。

本說明書中，「細胞」也包括動物個體內之細胞、培養細胞。

本說明書中，「細胞之癌化」乃指細胞喪失對接觸阻止現象之感受性，或呈示立足場非依存性增殖等細胞呈示異常增殖，如此呈示異常增殖之細胞稱「癌細胞」。

本說明書中，「細胞傷害」乃指以任何形於細胞呈示病理變化，不只直接外傷，也指 DNA 之切斷和鹼基之二聚物之形成、染色體之切斷、細胞分裂裝置之損傷、各種酵素

活性之降低等所有細胞之構造或機能上之損傷。

本說明書中「細胞傷害活性」乃指引起上述細胞傷害。

本說明書中，使用例如「免疫微脂粒所含有之抗體(或多肽)」等表現時之「含有」乃指具有構成該微脂粒之脂質之官能基和具有該多肽之官能基形成共有結合，或基於物理·生物學親和性之非共有結合之狀態。

本說明書中「含有死亡功能域之受體」乃指將與黑猩猩蠅之自殺基因 reaper 呈示相同性之稱「死亡功能域」之細胞凋零信號傳達領域於細胞內功能域具有之受體分子(包括 Fas、TNFRI、DR3、DR4、DR5 及 DR6，但不限於這些)。

本說明書中「抗體之機能性片段」乃指具有與抗原結合活性之抗體之部分片段，包括 Fab、F(ab')₂、scFv 等。又將 F(ab')₂ 於還原條件下處理之抗體之可變領域之一價片段之 Fab' 也包括於抗體之機能性片段。但只要具有與抗原之結合能力，不限於這些分子。又於這些機能性片段不只將抗體蛋白質之全長分子以適當酵素處理者，也包括使用基因工程上改變之抗體基因於適當宿主細胞產生之蛋白質。

本發明中「Fab'」為如上述將 F(ab')₂ 於還原條件下處理之抗體之可變領域之一價之片段，可利用於還原條件生成之 Fab' 中之硫醇基使該 Fab' 與微脂粒結合。但用基因工程上改變之抗體基因而產生之 Fab' 或於羧基末端賦予含有基因工程上半胱胺酸殘基之多肽之 Fab 也可利用各

硫醇基與微脂粒結合而包括於本發明中 Fab' 。

本說明書中「單鏈可變部位抗體」為與單鏈 Fv(scFv)同意義使用。

本說明書中「二次抗體」乃指於抗體分子專一地結合，而將該抗體分子彼此交聯之抗體。

本說明書中「兩親媒性小胞形成脂質」乃指具有疏水性及親水性部分，更可單獨於水中形成二層小胞之脂質、或與其他脂質一起吸入脂質雙重層，此時該雙重膜之內部疏水領域與其疏水性領域接觸，更包括其親水性領域向該膜之外部極性表面並列之一切兩親媒性脂質。

本說明書中「微脂粒」乃指由兩親媒性小胞形成脂質形成之脂質構造體。微脂粒典型為於內部有水相之由單層或多層之脂質雙重層而構成之閉鎖小胞，本發明乃更廣指粒子狀之脂質複合體。

本說明書中「免疫微脂粒」乃指由微脂粒和蛋白質而形成之複合體。

本說明書中免疫微脂粒之「抗體密度」為對構成免疫微脂粒之總脂質莫耳數，將於該免疫微脂粒含有之抗體之莫耳數之比例以莫耳%標記者。

本說明書中「平均粒徑」為以體積或數為基準測定之粒徑分布之平均值。粒徑可依例如雷射繞射法、動光散射法等電磁波散射法、離心沈澱法等光透過法測定。

1.關於細胞凋零關連基因

關於本發明中含有目的免疫微脂粒之抗體，要求該抗體

對特定抗原結合，且仲介該抗原呈示細胞傷害活性。又為防止正常細胞被殺傷，有將腫瘤細胞專一地存在之抗原選擇之必要。如此抗原群之一例，有腫瘤細胞壞死因子(本說明書中以下稱「TNF」)關連細胞凋零誘導配體(本說明書中以下稱「TRAIL」)受體群。TRAIL為TNF家族蛋白質之一員，此含有Fas配體及TNF- α (Wiley SR等 Immunity 1995 Dec; 3(6): 673-82)。這些蛋白質為細胞凋零之強力誘導因子。

這些TNF家族蛋白質之受體由細胞外功能域之半胱氨酸富反復序列來特徵，尤其屬於Fas配體之受體之Fas，及屬於TNF α 之受體之TNF受體I(本說明書中以下稱「TNFRI」)為於細胞內功能域具有呈示與黑猩猩蠅之自殺基因reaper (Golstein,P.,等(1995) Cell. 81, 185-186, White,K,等(1994) Science 264, 677-683)相同性領域之稱「死亡功能域」之細胞凋零之信號傳達所必須之領域，而總稱為含有死亡功能域之受體。

關於TRAIL，有5種受體被鑑定，這些中2種(DR4(TRAIL-R1)及DR5(TRAIL-R2))可傳達細胞凋零信號，其他3種(DcR1(TRAIL-R3), DcR2(TRAIL-R4)及骨保護素(osteoprotegerin: OPG)不傳達細胞凋零信號。與Fas及TNFRI同樣，DR4及DR5兩者之細胞內片斷含有死亡功能域，而仲介含有Fas關連死亡功能域蛋白質(本說明書中以下稱「FADD」)及Caspase8之經路傳達細胞凋零信號 (Chaudhary PM,等 Immunity 1997 Dec; 7(6): 813-20;

Schneider P,等 Immunity 1997 Dec ; 7(6) : 821-30)。

關於上述 Fas、TNFRI、DR4、DR5，已知結合於該分子而作為激動劑作用之抗體對將該分子於細胞表面保有之細胞呈示細胞凋零誘導能力(Journal of Cellular Physiology , 209 : 1221-1028 (2006); Leukemis, Apl; 21 (4): 805-812 (2007) ; Blood, 99 : 1666-1675 (2002); Cellular Immunology, Jan; 153 (1): 184-193 (1994))。上述激動劑抗體之藥效由二次抗體或效應細胞之交聯而增強 (Journal of Immunology, 149 : 3166-3173(1992); European Journal of Immunology, Oct; 23(10): 2676-2681(1993))。免疫微脂粒可於微脂粒膜上結合多數抗體，可視為模仿抗體之交聯狀態之構造體。故比仲介習用之二次抗體或效應細胞之交聯，更可增強上述激動劑抗體之藥效。又因可實現人工高度之交聯狀態，故也可期待抗體單獨未必具有激動劑活性之必要。由以上之理由，於含有死亡功能域之受體結合之抗體，可選擇為於本發明之免疫微脂粒含有之抗體。

2.結合於 DR5 之抗體

(1)DR5 基因

人 DR5(death receptor 5)基因之核苷酸序列及胺基酸序列於基因庫以 GI : 22547118(登錄編號 : NM_147187)登錄。DR5 之胺基酸序列中，有 1 或數個胺基酸取代、缺失、附加之胺基酸序列而成，將具有與 DR5 同等生物活性之蛋白質編碼之核苷酸序列也包括於 DR5 基因之核苷酸序列。又 DR5 之胺基酸序列中，有 1 或數個胺基酸取代、缺失、附

加之胺基酸序列而成，具有與 DR5 同等生物活性之蛋白質也包括於 DR5。

(2)對 DR5 之抗體

對本發明之 DR5 之抗體可依常法將由 DR5 或 DR5 之胺基酸序列選擇之任意多肽免疫於動物，採集活體內產生之抗體來精製而得。

又可依公知之方法(例如 Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p.495-497; Kennet, R.ed., Monoclonal 抗體, p.365-367, Penum Press, N.Y.(1980)), 將產生對 DR5 之抗體之抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合來樹立融合瘤，也可得單元抗體。

又成為抗原之 DR5 可將 DR5 基因依基因操作而於宿主細胞產生而得。

具體而言，製作可表現 DR5 基因之載體，將此導入宿主細胞而表現該基因，來精製表現之 DR5。

又可構築將 DR5 之細胞外領域與抗體之定常領域融合之人工基因，將適切基因表現系中調製之蛋白質作為免疫原使用。

以下具體說明對 DR5 之抗體之取得方法。

(2)-1. 抗原之調製

為製作抗 DR5 抗體之抗原可為由 DR5 或其至少 6 個連續之部分胺基酸序列而成之多肽，或於這些附加任意之胺基酸序列或載體之衍生物。

DR5 可由人之腫瘤組織或腫瘤細胞直接精製而使用，又

可將 DR5 於活體外合成，或依基因操作而於宿主細胞產生而得。

於基因操作，具體而言，將 DR5 導入表現可能之載體後，於含有將轉錄和翻譯所必要之酵素、基質及能量物質之溶液中合成，或其他原核生物、或真核生物之宿主細胞予以轉形來表現 DR5，而得該蛋白質。

DR5 之 cDNA 可例如以表現 DR5 之 cDNA 庫為模板，用將 DR5 cDNA 專一地增幅之引子施行聚合酶連鎖反應(以乃稱「PCR」)(Saiki,R.K.等 Science (1988) 239, p.487-489)之所謂 PCR 法來取得。

多肽之活體外合成法可為例如 Roche-Diagnostics 公司製之迅速翻譯系統(RTS)，但不受此限定。

原核細胞之宿主可為例如大腸菌(*Escherichia coli*)或枯草菌(*Bacillus subtilis*)等。將目的基因於這些宿主細胞內轉形，可於含有能與宿主適合之種由來之複製子也即複製起點和含有調節序列之質體載體將宿主細胞轉形。又載體以具有能於轉形細胞賦予表現形質(表現型)之選擇性之序列者較佳。

真核細胞之宿主細胞包括脊椎動物、昆蟲、酵母等細胞、脊椎動物細胞常用例如猿之細胞之 COS 細胞(Gluzman,Y. Cell(1981) 23, p.175-182、ATCC CRL-1650)、小鼠纖維芽細胞 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658)或倉鼠卵巢細胞(CHO 細胞、ATCC CCL-61)之二氫葉酸還原酶缺損株(Urlaub, G. and Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77 ,p4126-

4220)等，但不受此等限定。

如上所述所得轉形體可依常法培養，由該培養於細胞內，或細胞外產生目的之多肽。

該培養所用培養基依採用宿主細胞而可適宜選擇慣用之各種者，若為大腸菌，則可例如依 LB 培養基而添加安比西林等抗生物質或 IPTG 來使用。

依上述培養，於轉形體之細胞內或細胞外產生之重組蛋白質可依利用該蛋白質之物理性質或化學性質等之各種公知分離操作法來分離・精製。

該方法具體而言，可例示如依通常之蛋白質沈澱劑之處理、超濾、分子篩層析(凝膠過濾)、吸附層析、離子交換層析、親和層析、高速液體層析(HPLC)等各種液體層析、透析法、這些之組合等。

又可於表現重組蛋白質連繫由 6 殘基而成之組胺酸，則可有效精製鎳親和柱。

組合上述方法則可容易以高產率、高純度大量製造目的多肽。

(2)-2. 抗 DR5 單元抗體之製造

與 DR5 專一地結合之抗體之例可為與 DR5 專一地結合之單元抗體，其取得方法如下：

製造單元抗體時，一般須如下述作業工程，即

(a)作為抗原使用之活體高分子之精製、

(b)注射抗原於動物而免疫後，採集血液而檢定其抗體價來決定脾臟摘出之時期後，調製抗體產生細胞之工程、

- (c)骨髓腫細胞(以下稱「骨髓瘤」)之調製、
- (d)抗體產生細胞與骨髓瘤之細胞融合、
- (e)選別產生目的抗體之融合瘤群、
- (f)分割為單一細胞克隆(選植)、
- (g)有時，為大量製造單元抗體而培養融合瘤，或飼育移植融合瘤之動物、
- (h)檢討如此製造之單元抗體之生理活性、及其結合特異性，或檢定標識試藥之特性等。

以下沿上述工程詳述單元抗體之製作法，但該抗體之製作法不受此限制，也可使用例如脾細胞以外之抗體產生細胞及骨髓瘤。

(a)抗原之精製

抗原可使用如前述方法調製之 DR5 或其一部分。

又由 DR5 表現重組體細胞調製之膜劃份，或 DR5 表現重組體細胞本身、DR5 與其他蛋白質之融合蛋白質，更也可依業者周知之方法，以化學合成之本發明之蛋白質之部分胜肽為抗原使用。

(b)抗體產生細胞之調製

混合工程(a)所得抗原與弗氏之完全或不完全佐劑，或鉀明礬等助劑，作為免疫原於實驗動物免疫。實驗動物可將公知之融合瘤製作法所用動物無阻礙使用。具體而言，可用例如小鼠、大鼠、山羊、綿羊、牛、馬等。但由與摘出之抗體產生細胞融合之骨髓瘤細胞之取得容易性等觀點，以小鼠或大鼠為被免疫動物較佳。

又實際使用之小鼠及大鼠之系統無特限，於小鼠之場合，可用例如各系統 A、AKR BALB/c BDP BA CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF. R III、SJL、SWR、WB、129 等，又於大鼠之場合，可用例如 Low, Lewis, Sprague, Daweley, ACI, BN, Fischer 等。

這些小鼠及大鼠可由例如日本可麗兒公司、日本查爾斯河公司等實驗動物飼育販售業者取得。

其中，斟酌與後述骨髓瘤細胞之融合適合性，於小鼠以 BALB/c 系統，於大鼠以 LOW 系統作為被免疫動物特佳。

又考慮抗原於人與小鼠之相同性，則使用降低去除自己抗體之活體機構之小鼠，也即自體免疫疾病小鼠也較佳。

這些小鼠或大鼠之免疫時之週齡宜 5~12 週齡，更宜 6~8 週齡。

欲由 DR5 或此重組體來免疫動物，可用例如於 Weir,D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol.I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Maye r, M. M., Experimental Immunology, Charles C Thomas Publisher Spigfield, Illinois (1964) 等詳細記載之公知方法。

這些免疫法中，具體例示本發明適宜方法如下：

即先將抗原膜蛋白劃份，或表現抗原之細胞投與動物之皮內或腹腔內。

但為提高免疫效率，以兩者之併用較佳，前半施行皮內

投與，後半或僅最終回施行腹腔內投與，則可特提高免疫效率。

抗原之投與程序依被免疫動物之種類、個體差等而異，惟一般以抗原投與回數 3~6 回，投與間隔 2~6 週較佳，以投與回數 3~4 回，投與間隔 2~4 週更較佳。

又抗原之投與量依動物之種類、個體差等而異，惟一般為 0.05~5mg，宜 0.1~0.5mg 之程度。

追加免疫可如上之抗原投與之 1~6 週後，宜 2~4 週後，更宜 2~3 週後施行。

施行追加免疫之際之抗原投與量依動物之種類、大小等而異，一般例如小鼠之場合為 0.05~5mg，宜 0.1~0.5mg，更宜 0.1~0.2mg 之程度。

上述追加免疫 1~10 日後，較佳為 2~5 日後，更較佳為 2~3 日後，由被免疫動物將抗體產生細胞由上述追加免疫起 1~10 日後，宜 2~5 日後，更宜 2~3 日後，由被免疫動物無菌取出含有抗體產生細胞之脾臟細胞或淋巴球。

於此際測定抗體價，將抗體價充分高之動物作為抗體產生細胞之供給源，則可提高以後操作之效率。

所用抗體價之測定法可例如 RIA 法或 ELISA 法，但不受這些方法限制。

本發明中抗體價之測定例如依 ELISA 法，可依如下程序施行。

先將精製或部分精製之抗原吸附於 ELISA 用 96 穴板等固相表面，更將未吸附抗原之固相表面被覆與抗原無關之蛋

白質，例如牛血清蛋白素(以下稱「BSA」)，而將該表面洗淨後，與作為第一抗體而階段稀釋之試料(例如小鼠血清)接觸，於上述抗原結合試料中之抗體。

更加作為第二抗體而酵素標識之對小鼠抗體之抗體結合於小鼠抗體，洗淨後加該酵素之基質，基於基質分解之發色測定吸光度之變化等，算出抗體價。

由這些脾臟細胞或淋巴球之抗體產生細胞之分離可依公知之方法(例如 Kohler 等，Nature (1975) 256, p.495；Kohler 等，Eur. J. Immunol. (1977) 6, p.511；Milstein 等，Nature (1977) 266, p.550；Walsh, Nature, (1977) 266, p.495)施行。

例如脾臟細胞之場合，可用將細胞細切而以不鏽鋼篩過濾後，於 Eagle 最低必須培養基(MEM)浮游來分離抗體產生細胞之一般方法。

(c)骨髓腫細胞(以下稱「骨髓瘤」)之調製

細胞融合所用骨髓瘤細胞無特限，可由公知之細胞株適宜選擇使用。但考慮由融合細胞選擇融合瘤時之方便性，以使用其選擇手續確立之 HGPRT(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)缺損株較佳。

也即小鼠由來之 X63-Ag8 (X63)、NS1-ANS/1 (NS1)、P3X63-Ag8.U1 (P3U1)、X63-Ag8.653 (X63.653)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG)、FO、S149/5XXO、BU.1 等、大鼠由來之 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3)等、人由來之 U266AR (SKO-007)、GM1500·GTG-A12 (GM1500)、

UC729-6 、 LICR-LOW-HMy2 (HMy2) 、 8226AR/NIP4-1 (NP41)等。

這些 HGPRT 缺損株可由例如 American Type Culture Collection (ATCC)等取得。

這些細胞株於適當培養基，例如於 8-吡鳥嘌呤培養基[於 RPMI-1640 培養基加麩醯胺酸、2-氫硫基乙醇、僅大黴素、及牛胎血清(以下稱「FCS」)之培養基加 8-吡鳥嘌呤之培養基]、Iscoe 改變 Dulbecco 培養基以下稱「IMDM」)，或 Dulbecco 改變 Eagle 培養基以下稱「DMEM」)繼代培養，惟於細胞融合之 3 至 4 日前以正常培養基[例如含有 10% FCS 之 ASF104 培養基(味素公司製)]繼代培養，於融合當日確保 2×10^7 以上之細胞數。

(d)細胞融合

抗體產生細胞與骨髓瘤細胞之融合可依公知之方法(Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol.I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)等)於細胞之生存率不極度降低程度之條件下適宜實施。

如此方法可用例如於聚乙二醇等高濃度聚合物溶液中混合抗體產生細胞和骨髓瘤細胞之化學方法，利用電刺激之物理方法等。

其中上述化學方法之具體例如下：

即作為高濃度聚合物溶液使用聚乙二醇時，於分子量

1500~6000，宜 2000~4000 之聚乙二醇溶液中，於 30~40℃，宜 35~38℃ 之溫度混合抗體產生細胞與骨髓瘤細胞 1~10 分，宜 5~8 分。

(e)融合瘤群之選擇

由上述細胞融合所得融合瘤之選擇方法無特限，通常使用 HAT(次黃嘌呤·胺基喋呤·胸苷)選擇法(Kohler 等，Nature (1975) 256, p.495；Milstein et al., Nature (1977) 266, p.550)。

此方法使用以胺基喋呤不能生存之 HGPRT 缺損株之骨髓瘤細胞得融合瘤時有效。

即將未融合細胞及融合瘤以 HAT 培養基培養，則可僅將對胺基喋呤有耐性之融合瘤選擇殘存且增殖。

(f)分割為單一細胞克隆(選植)

融合瘤之選植法可用例如甲基纖維素法、軟瓊脂糖法、極限稀釋法等公知之方法(例如 Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980))。這些方法中，特以極限稀釋法較佳。

依此方法，於微板接種大鼠胎兒由來之纖維芽細胞株，或正常小鼠脾臟細胞、胸腺細胞、腹水細胞等飼養細胞。

他方面，預先將融合瘤於培養基中稀釋成 0.2~0.5 個/0.2ml，將此稀釋融合瘤之浮游液於各穴各加入 0.1ml，每一定期間(例如每 3 日)將約 1/3 之培養基邊換新邊續培養 2 週之程度，則可增殖融合瘤之克隆。

就認定抗體價之穴，例如依極限稀釋法反復選植 2~4 回，將安定而認定抗體價者選擇為抗 DR5 單元抗體產生融合瘤株。

(g)由融合瘤培養調製單元抗體

如此選擇之融合瘤雖可將此培養而有效得單元抗體，但於培養之前，篩選產生目的單元抗體之融合瘤較佳。

此篩選可採用其本身既知之方法。

本發明中抗體價之測定可例如於上述(b)之項目說明之依 ELISA 法施行。

依上述方法所得融合瘤可於液體氮中或 -80℃ 以下之冷凍庫中以凍結狀態保存。

選植完了之融合瘤可將培養基由 HT 培養基更換於正常培養基培養。

大量培養可用大型培養瓶之回轉培養，或以自旋培養施行。

將此大量培養中上清以凝膠過濾等當業者周知之方法精製，則可得於本發明之蛋白質專一地結合之單元抗體。

又同系統之小鼠(例如上述 BALB/c)，或於 Nu/Nu 小鼠之腹腔內注射融合瘤，而增殖該雜交瘤，則可得大量含本發明單元抗體之腹水。

投與腹腔內時，於事前(3~7 日前)投與 2,6,10,14-四甲基十五烷(pristane)等礦物油，則可得更多量之腹水。

例如於與融合瘤同系統之小鼠之腹腔內預先注射免疫抑

制劑，將 T 細胞惰性化後，於 20 日後，將 $10^6 \sim 10^7$ 個之融合瘤·克隆細胞於不含血清之培養基中浮游 (0.5ml) 而投與腹腔內，通常腹部膨滿而蓄積腹水時，由小鼠採集腹水。

依此方法，得比培養液中約 100 倍以上濃度之單元抗體。

依上述方法所得單元抗體可例如依 Weir, D. M. : Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978) 記載之方法精製。

即硫安鹽析法、凝膠過濾法、離子交換層析法、親和層析法等。

作為精製之簡便方法，也可利用市售之單元抗體精製套組 (例如 MAbTrap GII 套組；Pharmacia 公司製) 等。

如此所得單元抗體對 DR5 具有高抗原特異性。

(h) 單元抗體之檢定

如此所得單元抗體之異型及亞型之決定可如下施行。

首先作為鑑定法可為 Ouchterlony 法、ELISA 法或 RIA 法。

Ouchterlony 法雖簡便，但單元抗體之濃度低時，須濃縮操作。

他方面，用 ELISA 法或 RIA 法時，將培養上清就此與抗原吸附固相反應，更作為第二次抗體使用 1 與各種免疫球蛋白異型、亞型對應之抗體，則可鑑定單元抗體之異型、

亞型。

又作為更簡便之方法，也可利用市售之鑑定用之套組(例如小鼠 Typer 套組；Bio-Rad 公司製)等。

蛋白質之定量可依 Foreign row Lee 法、及由 280nm 中吸光度 [$1.4(OD_{280}) = \text{免疫球蛋白 } 1\text{mg/ml}$] 算出之方法施行。

(3) 其他抗體

本發明之抗體除對上述 DR5 之單元抗體之外，更含有以降低對人異種抗原性等為目的之人為改變之基因重組型抗體，例如由嵌合體抗體、人化(Humanized)抗體、人抗體等。這些抗體可用既知之方法製造。

嵌合體抗體可為抗體之可變領域和定常領域為相互異種之抗體，例如將小鼠由來抗體之可變領域接合於人由來之定常領域之嵌合體抗體(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984))。

人化抗體可為僅將互補性決定領域(CDR；complementarity determining region) 人化抗體可為僅將互補性決定領域(Nature(1986)321,p.522-525)，依 CDR 移植法、除將 CDR 之序列，也將一部分構架之胺基酸殘基也移植於人抗體之抗體(國際公開小冊 WO90/07861)。

更可列舉抗人抗體。人抗體乃指只具有人染色體由來之抗體之基因序列之人抗體。抗 DR5 人抗體可用含有人抗體之 H 鏈和 L 鏈之基因之人染色體斷片之人抗體產生小鼠之方法(Tomizuka, K.等，Nature Genetics (1997) 16, p.133-143

； Kuroiwa, Y 等 , Nuc. Acids Res. (1998) 26, p.3447-3448
； Yoshida, H.等 , Animal Cell Technology : Basic and Applied Aspects vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999 ;
Tomizuka, K.等 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727)來取得。

如此轉基因動物具體而言，將非人哺乳動物之內在性免疫球蛋白重鏈及輕鏈之基因座被破壞，代之以仲介酵母人工染色體 (Yeast artificial chromosome, YAC) 宿主等導入人免疫球蛋白重鏈及輕鏈之基因座之基因重組動物，藉剔除動物及轉基因動物之製作，及這些動物彼此交配來作出。

也可由基因重組技術，將如此人抗體之重鏈及輕鏈各別編碼之 cDNA，宜由含有該 cDNA 之宿主使真核細胞轉形，培養產生基因重組人單元抗體之轉形細胞，將此抗體由培養上清中取得。

於此，宿主可用例如真核細胞，宜 CHO 細胞、淋巴球或骨髓瘤等哺乳動物細胞。

又已知將由人抗體庫選別之噬菌體顯示由來之人抗體取得之方法 (Wormstone, I. M.等, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p.2301-2308 ; Carmen, S.等 , Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2) , p.189-203 ; Siriwardena, D.等 , Ophthalmology (2002) 109 (3), p.427-431)。

例如可用將人抗體之可變領域作為一股鏈抗體(scFv)於噬菌體表面表現，而選擇結合於抗原之噬菌體之噬菌體顯示法(Nature 生技 (2005) 23,(9), p.1105-1116)。

解析選擇結合於抗原之噬菌體之噬菌體之基因，則可決定編碼結合於抗原之人抗體之可變領域之 DNA 序列。

若明白結合於抗原之 scFv 之 DNA 序列，則可使用與適當宿主之表現載體之組合，製作具有該序列之表現宿主，導入適當宿主來表現，則可取得人抗體。(WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388、Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p.433-455、Nature 生技 (2005) 23 (9), p.1105-1116)。

將抗體基因一旦單離後，導入適當宿主來製作抗體時，可用適當宿主和表現宿主之組合。

以真核細胞為宿主使用時，可用動物細胞、植物細胞、真核微生物。

動物細胞可為(1)哺乳類細胞，例如猿之細胞之 COS 細胞(Gluzman, Y .Cell (1981) 23, p.175-182, ATCC CRL-1650)、小鼠纖維芽細胞 NIH3T3(ATCC No. CRL-1658)或倉鼠卵巢細胞(CHO 細胞、ATCC CCL-61)之二氫葉酸還原酶缺損株(Urlaub,G.and Chasin,L.A. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1980) 77,p.4126-4220)。

使用原核細胞時，可用例如大腸菌、枯草菌。

於這些細胞將目的抗體基因依轉形而導入，將轉形之細胞於活體外培養而得抗體。

本發明之抗體之異型無限制，可為例如 IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1、IgA2)、IgD 或 IgE 等，較佳為 IgG 或 IgM。

又本發明之抗體只要維持與抗原之結合性，則也可為具有與抗體之抗原結合部之抗體之斷片或其修飾物。

例如抗體之機能性片段可為將 Fab、F(ab')₂、F(ab')₂ 還原所得抗體之一價可變領域片段 Fab'、Fv、或重鏈及輕鏈之 Fv 以適當接頭連結之單鏈 Fv(scFv)、diabody(diabodies)、線狀抗體、及抗體斷片所形成之多特異性抗體等，但只要保持對抗原之結合性、不限於上述片段。上述抗體之片段可將完全長之抗體分子以木瓜酵素、胃蛋白酶等酵素處理來取得。又用將上述抗體片段之重鏈及輕鏈編碼之核酸序列而以適當基因表現系產生蛋白質，也可取得上述抗體片段。又於抗體之機能性片段之羧基末端將含有半胱胺酸殘基之多肽予以基因工程上附加之蛋白質也可作為本發明中抗體之機能性片段使用。如此機能性片段之一例可為於重鏈或輕鏈之羧基末端附加含有半胱胺酸殘基之多肽之 Fab，但不受此限定。附加之半胱胺酸殘基之硫醇基可用於抗體之機能性片段與微脂粒之結合。

本發明之抗體也可為對至少 2 種類之相異之抗原具有特異性之多特異性抗體。通常如此分子為結合 2 個抗原者(即雙重特異性抗體(bispecific 抗體)),惟本發明中「多特異性抗體」也包含對其以上(例如 3 種類)之抗原具有特異性之

抗體。

本發明之抗體可為多特異性抗體全長而成之抗體，或也可為如此抗體之斷片(例如 $F(ab')_2$ 二特異性抗體)。雙重特異性抗體也可將 2 種抗體之重鏈和輕鏈(HL 對)結合來製作，也可將產生相異之單元抗體之融合瘤融合，而製作雙重特異性抗體產生融合細胞來製作(Millstein 等, Nature (1983) 305, p.537-539)。

本發明之抗體也可為單鏈可變部位抗體(也可記載為 scFv)。單鏈可變部位抗體可將抗體之重鏈 V 領域和輕鏈 V 領域以多肽之接頭連結而得(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (Rosenburg 及 Moore 編, Springer Verlag, New York, p.269-315 (1994); Nature 生技 (2005), 23, p.1126-1136)。

製作單鏈可變部位抗體之方法為本技術領域中周知(例如美國專利第 4,946,778 號、美國專利第 5,260,203 號、美國專利第 5,091,513 號、美國專利第 5,455,030 號)。此單鏈可變部位抗體中，重鏈 V 領域和輕鏈 V 領域為仲介不作成結合之接頭，宜多肽接頭來連結(Huston, J. S. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85, p.5879-5883)。單鏈可變部位抗體中重鏈 V 領域及輕鏈 V 領域可為同一抗體由來，也可分別抗體由來。連結 V 領域之胜肽接頭可用由例如 12~19 殘基而成之任意之一股鏈胜肽。

編碼為單鏈可變部位抗體之 DNA 為編碼前述抗體之重鏈或重鏈 V 領域之 DNA、及編碼輕鏈或輕鏈 V 領域之 DNA 中，以編碼這些之序列中之全部或所望之胺基酸序列之

DNA 部分為模板，用規定其兩端之引子對依 PCR 法增幅，次更將胜肽接頭部分編碼之 DNA，及將其兩端規定為與各重鏈、輕鏈連結之引子對組合增幅而得。

又一旦製作編碼單鏈可變部位抗體之 DNA，將含有這些之表現宿主，及由該表現宿主轉形之宿主可依常法而得，又用其宿主可依常法得單鏈可變部位抗體。

這些抗體斷片可仿前述將基因取得來表現，而由宿主產生。

本發明之抗體為胺基酸序列相異之複數種類之抗 DR5 抗體之混合物，也可為多克隆抗體。多克隆抗體之一例可為 CDR 相異之複數種類之抗體之混合物。如此多克隆抗體可培養產生相異抗體之細胞混合物，可用由該培養物精製之抗體 (WO2004/061104 號)。

抗體之修飾物也可用與聚乙二醇 (PEG) 等各種分子結合之抗體。

本發明之抗體可更與這些抗體和其他藥劑結合形成者 (Immunoconjugate)。如此抗體之例可為該抗體與放射性物質或具有藥理作用之化合物結合之物 (Nature 生技 (2005) 23, p.1137-1146)。

所得抗體可精製至均勻。抗體之分離、精製可於通常之蛋白質使用之分離、精製方法。

例如將層析柱、過濾器、超濾、鹽析、透析、調製用聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電點電泳等適宜選擇組合，則可分離、精製抗體 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R.

Marshak 等 eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996) ; Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), 但不受這些限定。

層析可為親和層析、離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、逆相層析、吸附層析等。

這些層析可用 HPLC 或 FPLC 等液相層析施行。

親和層析所用柱可為蛋白質 A 柱、蛋白質 G 柱。

例如用蛋白質 A 柱之柱,可為 Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia)等。

也可用將抗原固定化之載體,利用與抗原之結合性來精製抗體。

(4)抗 DR5 抗體之具體例

例如於國際公開小冊、WO98/51793、WO2001/83560、WO2002/94880、WO2003/54216、WO2006/83971、WO2007/22157 記載之 DR5 表現細胞誘導細胞凋零之抗 DR5 抗體乃可作為本發明之免疫微脂粒之構成成分使用。乃稱為 Lexatumumab、HGSTR2J、APOMAB、APOMAB7.3、AMG-655、LBY135 之抗 DR5 抗體、及這些變異體也可作為本發明之免疫微脂粒之構成成分使用可能。但只要保有對 DR5 蛋白質之結合能力、不受上述抗體限定。

3.結合 Fas 之抗體

(1)Fas 基因

人 Fas 基因之核苷酸序列及胺基酸序列為於基因庫以 GI : 182409(登錄編號 : M67454)登錄。又 Fas 之胺基酸序列

中，由 1 或數個胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成，將具有與 Fas 同等生物活性之蛋白質編碼之核苷酸序列也包括於 Fas 基因之核苷酸序列。又 Fas 之胺基酸序列中，由 1 或數個胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成，而具有與 Fas 同等生物活性之蛋白質也包括於 Fas。

(2)對 Fas 之抗體

至於結合於 Fas 之抗體、可仿「2.(2)對 DR5 之抗體」記載之方法取得。

(3)其他抗體

至於結合於 Fas 之抗體、可仿「2.(3)其他抗體」記載之方法取得。

(4)抗 Fas 抗體之具體例

例如於美國專利第 6,972,323 號記載之於 Fas 表現細胞誘導細胞凋零之抗 Fas 抗體及其變異體可作為本發明之免疫微脂粒之構成成分使用。但只要保有對 Fas 蛋白質之結合能力、不受上述抗體限定。

4.對其他抗原之抗體

至於 DR5 及 Fas 以外之受體，也若該受體含有死亡功能域時，依上述抗體之製作法可取得於該受體結合，於該受體表現細胞誘導細胞凋零之抗體。如此抗體成為本發明之免疫微脂粒之構成成分。含有死亡功能域之受體可為 TNFRI、DR3、DR4、DR6 等，但只要傳達細胞細胞凋零誘導信號之受體，則不限於上述記載之受體。

人 TNFRI 基因之核苷酸序列及胺基酸序列為於基因庫以

GI: 339748(登錄編號: M75866)登錄。又 TNFRI 之胺基酸序列中, 由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成, 將具有與 TNFRI 同等生物活性之蛋白質編碼之核苷酸序列也包括於 TNFRI 基因之核苷酸序列。又 TNFRI 之胺基酸序列中, 由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成, 具有與 TNFRI 同等生物活性之蛋白質也包括於 TNFRI。

人 DR3 (death receptor 3)基因之核苷酸序列及胺基酸序列為於基因庫以 GI: 23200020(登錄編號: NM_148965)登錄。又 DR3 之胺基酸序列中, 由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成, 將具有與 DR3 同等生物活性之蛋白質編碼之核苷酸序列也包括於 DR3 基因之核苷酸序列。又 DR3 之胺基酸序列中, 由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成, 具有與 DR3 同等生物活性之蛋白質也包括於 DR3。

人 DR4 (death receptor 4)基因之核苷酸序列及胺基酸序列為於基因庫以 GI: 21361085(登錄編號: NM_003844)登錄。又 DR4 之胺基酸序列中, 由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成, 將具有與 DR4 同等生物活性之蛋白質編碼之核苷酸序列也包括於 DR4 基因之核苷酸序列。又 DR4 之胺基酸序列中, 由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成, 具有與 DR4 同等生物活性之蛋白質也包括於 DR4。例如於國際公開小冊 WO2002/97300 記載之抗體、Mapatumumab、及係這些變異體之抗 DR4 抗體可作為本發明之免疫微脂粒之構成成分使

用。但只要保有對 DR4 蛋白質之結合能力，則不限於上述抗體。

人 DR6(death receptor 6)基因之核苷酸序列及胺基酸序列為於基因庫以 GI: 23238206(登錄編號: NM_014452)登錄。又 DR6 之胺基酸序列中，由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成，將具有與 DR6 同等生物活性之蛋白質編碼之核苷酸序列也包括於 DR6 基因之核苷酸序列。又 DR6 之胺基酸序列中，由 1 或數個之胺基酸被取代、缺失、附加之胺基酸序列而成，具有與 DR6 同等生物活性之蛋白質也包括於 DR6。

5. 免疫微脂粒之構成成分

本發明提供含有於參與前述 1.至 4.記載之細胞凋零之細胞表面上之受體專一地結合之蛋白質，呈示細胞凋零誘導活性之免疫微脂粒。

「微脂粒」乃指由兩親媒性小胞形成脂質所形成之脂質構造體 ((D.D.Lasic, "Liposomes : from basic to applications", Elsevier Science Publishers, pp. 1-171 (1993)))。微脂粒典型上為於內部有水相之由單層或多層脂質雙重層所構成之閉鎖小胞，本發明中乃更廣指粒子狀之脂質複合體。也包括例如是否具有水相不明確之複合體。脂質複合體至少含有 1 種脂質，此外也可指含有親水性聚合物、多糖類、胺基酸等，這些以共有或非共有結合呈粒子狀形成者。

「免疫微脂粒」乃指由上述微脂粒與蛋白質所形成之複

合體。蛋白質不限於抗體，也包括內因性配體或該內因性配體之機能性胜肽等。

這些免疫微脂粒含有兩親媒性小胞形成脂質，將參與細胞凋零誘導之受體專一地結合之蛋白質(抗體、內因性配體等)及胜肽以共有結合或非共有結合載持於微脂粒。「兩親媒性小胞形成脂質」為具有疏水性及親水性部分，更可單獨於水中形成二層小胞之脂質、或與其他脂質一起吸入脂質雙重層，此時該雙重膜之內部疏水領域與其疏水性領域接觸，更包括其親水性領域向該膜之外部極性表面並列之一切兩親媒性脂質。

「脂質雙重層」為極性脂質分子之疏水性領域彼此匯合、疏水性部向二分子層之中心，他方面，親水性領域向水相配列之構造。

本發明之免疫微脂粒含有(1)兩親媒性小胞形成脂質、(2)親水性聚合物、(3)蛋白質及胜肽等，也可於微脂粒之內部含有治療用藥物。又只要不阻礙脂質複合體之形成則無制限。以下就構成免疫微脂粒之各成分詳述。

(1)兩親媒性小胞形成脂質

構成微脂粒之脂質成分包括磷脂質、糖脂質、神經鞘脂質、固醇類、二醇類、飽和或不飽和之脂肪酸、界面活性劑、具有親水性聚合物之衍生物脂質等(參照文獻「Liposomes: from physics to applications」之 Chapter 1. Chemistry of lipids and liposomes)。可為如下示(1)-1.至

(1)-8.之例示。

(1)-1.磷脂質

磷脂質大別為甘油磷脂質和神經鞘磷脂質。甘油磷脂質之代表性者為磷脂醯膽鹼(PC)、磷脂醯絲胺酸(PS)、磷脂醯肌醇(PI)、磷脂醯甘油(PG)、磷脂醯乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)。他方面，神經鞘磷脂質之代表性者為鞘髓磷脂類。可為以下之(a)至(i)記載之脂質。

(a)磷脂醯膽鹼類

例如二軟脂醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯磷脂醯膽鹼(DSPC)、二肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼(DMPC)、二油醯磷脂醯膽鹼(DOPC)、二月桂醯磷脂醯膽鹼(DLPC)、二癸醯磷脂醯膽鹼(DDPC)、二辛醯磷脂醯膽鹼(DOPC)、二己醯磷脂醯膽鹼(DHPC)、二丁醯磷脂醯膽鹼(DBPC)、二反油醯磷脂醯膽鹼、二亞麻仁油醯磷脂醯膽鹼、二花生四烯醯磷脂醯膽鹼、二花生醯磷脂醯膽鹼(DEPC)、二庚醯磷脂醯膽鹼、二己醯磷脂醯膽鹼、雙十七醯磷脂醯膽鹼、雙二十二醯磷脂醯膽鹼、桐醯磷脂醯膽鹼、氫化卵磷脂醯膽鹼(HEPC)、氫化大豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、1-軟脂醯-2-花生四烯醯磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯-2-油醯磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯-2-亞麻仁油醯磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯-2-肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼、1-軟脂醯-2-硬脂醯磷脂醯膽鹼、1-硬脂醯-2-軟脂醯磷脂醯膽鹼、1,2-二肉豆蔻醯胺-1,2-去氧磷脂醯膽鹼、1-肉豆蔻醯-2-軟脂醯磷脂醯膽鹼、1-肉豆蔻醯-2-硬脂醯磷脂醯膽鹼、二-0-十六

醯磷脂醯膽鹼、反二反油醯磷脂醯膽鹼、二軟脂醯-磷脂醯膽鹼、正十八醯-2-甲基磷脂醯膽鹼、正十八醯磷脂醯膽鹼、1-月桂基丙二醇-3-磷醯基膽鹼、赤-N-二十四醯基神經鞘磷脂醯膽鹼、軟脂醯-(9-順-油醯基)-3-sn-磷脂醯膽鹼等。

(b) 磷脂醯絲胺酸類

例如二硬脂醯磷脂醯絲胺酸(DSPS)、二肉豆蔻醯磷脂醯絲胺酸(DMPS)、二月桂醯磷脂醯絲胺酸(DLPS)、二軟脂醯磷脂醯絲胺酸(DPPS)、二油醯磷脂醯絲胺酸(DOPS)、溶磷脂醯絲胺酸、桐醯磷脂醯絲胺酸、1,2-二-(9-順-油醯基)-3-sn-磷脂醯絲胺酸等。

(c) 磷脂醯肌醇類

例如二軟脂醯磷脂醯肌醇(DPPI)、二硬脂醯磷脂醯肌醇(DSPI)、二月桂醯磷脂醯肌醇(DLPI)等。

(d) 磷脂醯甘油類

例如二軟脂醯磷脂醯甘油(DPPG)、二硬脂醯磷脂醯甘油(DSPG)、二油醯磷脂醯甘油(DOPG)、二月桂醯磷脂醯甘油(DLPG)、二肉豆蔻醯磷脂醯甘油(DMPG)、溶磷脂醯甘油、氫化大豆磷脂醯甘油(HSPG)、氫化卵磷脂醯甘油(HEPG)、心磷脂(二磷脂醯甘油)等。

(e) 磷脂醯乙醇胺(cephalin)類

例如二軟脂醯磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(DSPE)、二油醯磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二月桂醯磷脂

醯乙醇胺(DLPE)、二肉豆蔻醯磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二癸醯磷脂醯乙醇胺(DDPE)、N-戊二醯磷脂醯乙醇胺(NGPE)、溶磷脂醯乙醇胺、N-(7-硝基-2,1,3-苜醯氧二唑-4-基)-1,2-二油醯-sn-磷脂醯乙醇胺、桐醯磷脂醯乙醇胺、N-丁二醯油醯磷脂醯乙醇胺、1-十六醯-2-軟脂醯甘油磷脂醯乙醇胺等。

(f) 磷脂酸類

例如二軟脂醯磷脂酸(DPPA)、二硬脂醯磷脂酸(DSPA)、二肉豆蔻醯磷脂酸(DMPA)、二油醯磷脂酸(DOPA)等。

(g) 神經鞘磷脂質

例如鞘髓磷脂類、二軟脂醯鞘髓磷脂類、二硬脂醯鞘髓磷脂類、神經醯胺(ceramide)、胺乙基磷酸(Ciliatine)、神經醯胺磷醯基乙醇胺、神經醯胺磷醯基甘油等。

(h) 具有聚合性殘基之聚合性磷脂質

作為不飽和磷脂質、具有聚合性殘基之聚合性磷脂質可為例如 1,2-雙(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1,2-雙(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1-(十八醯基)-2-(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1-(十六醯基)-2-(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1-(十八醯基)-2-(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1-(十六醯基)-2-(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1-(2,4-十八碳二烯醯基)-2-(十八醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1-(2,4-十六碳二烯醯基)-2-(十六醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼。

)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1,2-雙-(8,10,12-十八碳三烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1,2-雙(12-甲基丙烯醯癸醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼、1,2-雙(9-(對乙烯苄醯基)壬醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼等。

又別之聚合性磷脂質可爲例如 1,2-雙(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1,2-雙(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1-(十八醯基)-2-(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1-(十六醯基)-2-(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1-(十八醯基)-2-(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1-(十六醯基)-2-(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1-(2,4-十八碳二烯醯基)-2-(十八醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1-(2,4-十六碳二烯醯基)-2-(十六醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1,2-雙-(8,10,12-十八碳三烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1,2-雙(12-甲基丙烯醯癸醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺、1,2-雙(9-(對乙烯苄醯基)壬醯基)-sn-甘油-3-磷醯基乙醇胺等。

更別之聚合性磷脂質可爲例如 1,2-雙(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1,2-雙(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1-(十八醯基)-2-(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1-(十六醯基)-2-(2,4-十八碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1-(十八醯基)-2-(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1-(十六醯基)-2-(2,4-十六碳二烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、

1-(2,4-十八碳二烯醯基)-2-(十八醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1-(2,4-十六碳二烯醯基)-2-(十六醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1,2-雙-(8,10,12-十八碳三烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1,2-雙(12-甲基丙烯醯癸醯基)-sn-甘油-3-磷酸、1,2-雙(9-(對乙烯苄醯基)壬醯基)-sn-甘油-3-磷酸等磷酸衍生物或其鹽等。

又於聚合性磷脂質也可含有非聚合性脂肪酸殘基、非聚合性脂肪酸殘基可為碳數 2~24 之直鏈或分岐鏈之烷基、醯基、非聚合性烯基、非聚合性烯醯基等。

(i)其他磷脂質

以磷脂醯酞胺酸、磷酸二鯨蠟酯、溶磷脂質、係屬以磷脂醯膽鹼為主成分含有磷脂醯乙醇胺·鞘髓磷脂類·膽固醇等之複數種脂質之混合物之蛋卵磷脂、大豆卵磷脂。

(1)-2.糖脂質

糖脂質可大別甘油糖脂質和神經鞘糖脂質。可為如下(a)至(c)之脂質。

(a)甘油糖脂質

例如二糖基二甘油酯、糖基二甘油酯、二半乳糖基二甘油酯、半乳糖基二甘油酯、磺酸氧基核糖基二甘油酯、(1,3)-D-甘露糖基(1,3)二甘油酯、二半乳糖基甘油酯、二半乳糖基二月桂醯甘油酯、二半乳糖基二肉豆蔻醯甘油酯、二半乳糖基二軟脂醯甘油酯、二半乳糖基二硬脂醯甘油酯、半乳糖基甘油酯、半乳糖基二月桂醯甘油酯、半乳糖

基二硬脂醯甘油酯、二半乳糖基二醯基甘油等。

(b)神經鞘糖脂質

例如神經醯胺(腦苷脂(Cerebroside))、半乳糖基神經醯胺、乳糖基神經醯胺、二半乳糖基神經醯胺、神經節苷脂(ganglioside)GM₁、神經節苷脂 GM₂、神經節苷脂 GM₃、硫脂質(sulfatide)、神經醯胺寡己苷脂、古羅保苷脂。

(c)其他糖脂質

神經醯胺寡己苷脂、軟脂醯苷脂、硬脂醯苷脂、十四醯苷脂、烷基苷脂、胺苯基苷脂、膽固醇甘露糖基苷脂、膽固醇基苷脂、3-膽固醇基-6'-(糖硫基)己醚糖脂質、糖醯胺類等。

(1)-3.固醇類

固醇類之最代表性者為膽固醇。已知膽固醇有助脂質雙重層構造之膜剛性及安定性。膽固醇之外，固醇類可為例如膽固醇丁二酸、二氫膽固醇、羊毛蘭醇、二氫羊毛蘭醇、碳鏈固醇、豆固醇、甾固醇、菜子固醇(Brassicasterol)、酵母固醇(zymosterol)、麥角固醇(Ergosterol)、菜油(Campesterol)固醇、岩藻固醇(Fucosterol)、22-酮固醇、20-羥基固醇、7-羥基膽固醇、19-羥基膽固醇、22-羥基膽固醇、25-羥基膽固醇、7-去氫膽固醇、5 α -膽固醇-7-烯-3 β -醇、表膽固醇、去氫麥角固醇、硫酸膽固醇、半丁二酸膽固醇、酞酸膽固醇、磷酸膽固醇、戊酸膽固醇、膽固醇半丁二酸酯、3 β N-(N',N'-二甲基胺乙烷)-胺甲醯基膽固醇、膽固醇乙酸酯、膽固醇油酸酯、膽固醇亞麻仁油酸酯

、膽固醇十四酸酯、膽固醇十八酸酯、膽固醇二十酸酯、
糞固醇(coprostanol)、膽固醇酯、膽固醇磷醯基膽鹼、
3,6,9-三羥辛烷-1-醇-膽固醇基-3 α -醇等。

(1)-4.中性脂質

中性脂質可為例如二甘油酯(例如二甘油三油酸酯、二甘油三軟脂酸酯)及混合甘油三癸酸酯-癸酸二甘油酯、三醯基甘油(三甘油三油酸酯、三甘油三軟脂酸酯、三甘油三肉豆蔻酸酯、三甘油三月桂酸酯、三甘油三癸酸酯、三甘油三癸酸酯、三甘油三己酸酯等)、角鯊烯、生育酚、膽固醇等。

(1)-5.飽和或不飽和脂肪酸

飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸可為例如辛酸、壬酸、癸酸、十一碳烯酸、十二碳烯酸、十三碳烯酸、十四碳烯酸、十五碳烯酸、十六碳烯酸、十七碳烯酸、十八碳烯酸、十九碳烯酸、二十碳烯酸、二十二碳烯酸、二十四碳烯酸、油酸、亞油酸、亞麻酸、icoseric acid、芥酸(erucic acid)、二十二碳五烯酸等碳數 5~30 之飽和或不飽和之脂肪酸。

(1)-6.荷電性脂質

可為如下(a)至(b)記載之脂質。

(a)陰離子性脂質

陰離子性脂質乃指具有生理學 pH 中負電荷之脂質。磷脂醯甘油、磷脂酸、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、心磷脂(cardiolipin)等酸性磷脂質、油酸、十六碳烯酸、十八碳烯

酸、十四碳烯酸、亞油酸、亞麻酸等脂肪酸、神經節苷脂 GM₁、神經節苷脂 GM₂、神經節苷脂 GM₃ 等神經節苷脂類、二鯨蠟基磷酸等酸性脂質、N-醯基-L-麩醯胺酸等酸性胺基酸系界面活性劑等。

(b)陽離子性脂質

陽離子性脂質乃指具有生理學 pH 正電荷之脂質。N,N-二硬脂醯基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、鯨蠟基三甲基溴化銨(CTAB)、N-(α -三甲基乙醯銨)-雙十二醯基-D-麩胺醯氯(TMAG)、DL-1,2-二油醯基-3-二甲基胺丙基- β -羥乙基銨(DORI)、N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨(DORIE)、N-(1,2-雙十四醯氧丙基)-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨(DMRIE)、(1,2-二油醯氧丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、雙十七醯胺甘胺醯亞精胺、N,N-雙十八醯胺-甘胺醯精胺、N,N-雙十八醯胺甘胺酸、1,2-二油醯基-3-丁二醯基-sn-甘油膽鹼酯(DOSC)、1,2-二油醯基-sn-甘油-3-丁二醯基-2-羥乙基二硫化鳥胺酸(DOGSDSO)、鯨蠟基氯化吡錠(CPyC)、1,2-二油醯基-sn-甘油-3-乙基磷醯基膽鹼(DOEPC)、N-(1-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N-(2-(精胺羧醯胺基)乙基)-N,N-二甲基銨三氟乙酸酯(DOSPA)、N-(1-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、N,N-二油醯基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、1,2-二油醯-sn-3-磷醯基乙醇胺(DOPE)、1,2-二油醯-3-(4'-三甲基銨基)丁醯基-sn-甘油(DOBT)、1,3-二油醯氧-2-(6-羧精胺基)-丙醯胺(DOSPER)、二軟脂醯磷脂醯基乙醇醯

胺基精胺 (DPPES) 等脂多胺、O-烷基磷脂醯膽鹼、O-烷基磷脂醯乙醇胺、離胺酸·精胺酸或鳥胺酸之醯胺及磷脂醯乙醇胺、 3β -(N-(N',N'-二甲基胺乙烷)胺甲醯基)膽固醇 (DC-Chol)、 3β -[N-(N',N',N'-三甲基胺乙烷)胺甲醯基]膽固醇 (TC-Chol)、雙-胍基-亞精胺-膽固醇 (BGSC)、雙-胍基-tren-膽固醇 (BGTC)、(4'-三甲基氮)丁酸膽固醇基 (ChOTB)、 3β -N-(聚乙烯亞胺)-胺甲醯基膽固醇、碘化膽固醇基- 3β -羧醯胺基-伸乙基三甲基銨、1-二甲胺基-3-三甲基銨基-DL-2-丙基-膽固醇基羧醯碘、膽固醇基- 3β -羧醯胺伸乙基乙二胺、碘化膽固醇基- 3β -氧丁二醯胺-伸乙基三甲基銨、1-二甲胺基-3-三甲基銨基-DL-2-丙基-膽固醇基- 3β -氧丁二醯碘、2-(2-三甲基銨基)-乙基甲胺基乙基-膽固醇基- 3β -氧丁二醯碘、膽固醇基半丁二酸酯、長鏈乙二胺、長鏈吡錠化合物、第四銨化合物等。

(1)-7. 界面活性劑

界面活性劑可大別為親水性部分為離子性之 (a) 陽離子性界面活性劑、(b) 陰離子性界面活性劑、(c) 兩性界面活性劑、和親水性部分為非離子性之 (d) 非離子性界面活性劑。

(a) 陽離子性界面活性劑

陽離子性界面活性劑可為烷基乙二胺鹽、醯基乙二胺鹽、第四級銨鹽、乙二胺衍生物等。具體而言，苄烷氯化銨、醯胺基乙基二乙基乙二胺鹽、N-烷基聚烷基聚乙二胺鹽、脂肪酸聚伸乙基聚醯胺、鯨蠟基三甲基溴化銨、十二醯基三甲基溴化銨、烷基聚氧乙烯乙二胺、N-烷基胺丙基乙

二胺、脂肪酸三乙醇胺酯等。

(b)陰離子性界面活性劑

陰離子性界面活性劑可為醯基肌胺酸、烷基硫酸鈉、烷基苯磺酸鈉、烷基硫酸酯鈉、烷基醚硫酸酯鈉、 α 烯磺酸鈉、 α 磺酸基脂肪酸酯鈉、碳數 7~22 之脂肪酸鈉及脂肪酸鉀等。具體而言，十二醯基硫酸鈉、月桂基硫酸鈉、膽酸鈉、去氧膽酸鈉、牛磺去氧膽酸鈉等。

(c)兩性界面活性劑

兩性界面活性劑可為烷胺基脂肪酸鈉、烷基甜菜鹼、烷基乙二胺氧化物等。具體而言，3-[(3-膽醯胺丙基)二甲銨基]-1-丙磺酸、N-十四基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙磺酸等。

(d)非離子性界面活性劑

非離子性界面活性劑可為聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、山梨聚糖脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯、甘油脂肪酸酯、脂肪酸烷醇醯胺、嵌段聚合物型非離子界面活性劑、烷基乙二胺型非離子界面活性劑、烷醯胺型非離子界面活性劑等。具體而言，單油酸聚氧乙烯山梨聚糖、聚山梨酸酯 80、聚氧乙烯聚氧丙二醇、PluronicF68、山梨聚糖單月桂酸酯、山梨聚糖單油酸酯、聚氧乙烯硬化蓖麻油 60、聚氧乙烯月桂醇等。

(1)-8.與前述脂質之任一親水性聚合物結合之「親水性聚合物之脂質衍生物」(於「6.(1)脂質與親水性聚合物之結合樣式」詳載)也可作為本發明之免疫微脂粒之構成成分使用。

將如上示兩親媒性小胞形成脂質依通常適宜混合來調製微脂粒。至於代表性脂質組成，以磷脂質或糖脂質為主成分，更將固醇類對總脂質莫耳數以 20 至 50 莫耳 % 之比例含有之脂質組成。宜以磷脂醯膽鹼類為主成分，更將膽固醇對總脂質莫耳數以 20 至 50 莫耳 % 之比例含有之脂質組成。

(2) 親水性聚合物

微脂粒投與血液循環中，具有易被肝臟、脾臟、肺等細網內皮系 (RES: reticulo-endothelial system) 捕捉之性質。此若標的臟器為肝臟或肺等則成有利性質，但若以全身作用為目的時，標的部位為 RES 以外之場合成為大缺點。親水性聚合物之存在提供血中滯留性之改善和回避由 RES 之吸入微脂粒之性質。又親水性聚合物之存在，也提供微脂粒保存中分散安定性。

本發明之免疫微脂粒所用親水性聚合物之種類為聚乙烯吡咯啉酮 (PVP)、聚伸烷基氧化物、聚烷二醇 (例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇、聚四甲二醇、聚六甲二醇等)、聚甘油、聚丙烯酸、聚丙烯酸醯胺、聚乙烯亞胺、聚縮水甘油、神經節苷脂、葡聚糖、藻醇、聚乙烯醇、聚乙烯甲基醚、聚甲基哌啶啉、聚乙基哌啶啉、聚羥丙基哌啶啉、聚羥丙基甲基丙烯酸醯胺、聚甲基丙烯酸醯胺、聚二甲基丙烯酸醯胺、聚羥丙基甲基丙烯酸酯、聚羥乙基丙烯酸酯、羥甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、聚天冬醯胺、聚胺基磷腈 (phosphazene)、聚(羥烷基羧酸)、乙二醇-丙二醇共聚

合體、苯乙烯-馬來酸酐共聚合體、二乙烯醚-馬來酸酐交互共聚合體、環糊精、玻尿酸、硫酸腦苷脂、軟骨素硫酸、多糖類(例如直鏈澱粉、支鏈澱粉、果膠、甲殼質、甘露聚糖、三聚葡萄糖、角叉聚糖、甲基纖維素等)、多肽、合成聚胺基酸(例如聚-L-離胺酸等)等。

上述親水性聚合物為由 1 以上之反復單位構造而成，其單位構造數無限制，可為直鏈型也可為分歧型。宜分子量為 500 至 20000 之親水性聚合物，更宜分子量為 2000 至 5000 之親水性聚合物。又這些聚合物可作為同質聚合物及嵌段或無規共聚物。例如含有由聚乳酸、聚乙醇酸而成之聚乳酸/聚乙醇酸共聚物等。

上述親水性聚合物可為烷基、烷氧基、羥基、羰基、烷氧羰基、氰基、胺基、硫醇基、馬來醯亞胺基、乙烯磺醯基、醯肼基等取代基導入之衍生物。

為回避血中滯留性之改善和由 RES 之微脂粒之吸入目的中，宜微脂粒中親水性聚合物或親水性聚合物之脂質衍生物之含量為對總脂質莫耳數可為 0.1 至 10 莫耳%之比例。更宜對總脂質莫耳數為 1 至 6 莫耳%之比例。

(3)蛋白質

可將上述「2.於 DR5 結合之抗體」、「3.於 Fas 結合之抗體」、及「4.於其他抗原結合之抗體」所述抗體作為本發明之免疫微脂粒之構成成分。又至於將具有對本發明記載之細胞凋零誘導能力之受體之天然配體結合之微脂粒也為本發明之範圍。更可將於含有死亡功能域之受體專一地結

合之人工胜肽也可作為本發明之免疫微脂粒之構成成分。如此人工胜肽之例可為於 Fas 結合之機能性胜肽 (Yoshimori 等, Apoptosis 10 (2), 323-329 (2005))。又由上述分子群選擇於同一抗原結合之 2 種類以上分子, 於同一免疫微脂粒上共存, 則可改善對特定抗原之結合能力。更由上述分子群選擇於相異抗原結合之 2 種以上分子, 於同一微脂粒上共存, 則也可對複數抗原作用。

(4)內水相

若微脂粒內部有水相存在時, 水相所用水溶液只要不阻礙微脂粒之形成則無特限。通常可使用氯化鈉水溶液、緩衝液(磷酸緩衝液、乙酸緩衝液、HEPES 緩衝液等)、單糖類或二糖類之水溶液(葡萄糖水溶液、繭蜜糖水溶液等)。

(5)添加劑

於免疫微脂粒之構成成分也可更添加機能性賦予劑。如此機能性賦予劑可為如膜安定化劑、膜表面之親水性調整劑、曲率調整劑、抗氧化劑、電荷賦予劑、凍結保護劑等。例如糖、糖脂質、甘油、聚乙二醇等安定劑、生育酚或抗壞血酸等氧化防止劑。膽固醇類可作為膜安定化劑、膜表面之親水性調整劑或微脂粒之曲率調整劑等、生育酚類可作為抗氧化劑使用。

又於免疫微脂粒加上上述添加劑時, 其種類和含量無特限, 可考慮免疫微脂粒之物性而適宜選擇。

(6)內封藥物

又本發明之免疫微脂粒可於內水相將親水性藥物、及於

水性藥物封入。封入之藥物只要不阻礙微脂粒之形成則無特限，可為抗腫瘤劑、抗風濕劑、抗病毒劑、抗菌劑等具有細胞傷害活性之藥物。抗腫瘤劑可為例如下列歐黴素 (Bleomycin)、Carboplatin、Chlorambucil、cisplatin、秋水仙素 (colchicine)、cyclophosphamide、陶諾黴素 (Daunorubicin)、達可及諾黴素 (Dactinomycin)、Diethylstilbestrol、Doxorubicin、Etoposide、5-氟尿嘧啶、氟尿苷 (Floxuridine)、Melphalan、gemcitabine、Imatinib、irinotecan、Methotrexate、埋多黴素 (mitomycin)、6-氫硫基嘌呤、paclitaxel (Taxol)、Nexavar、SUTENT、Teniposide、6-硫基鳥嘌呤、Vincristine、Vinblastine。抗癌化合物及治療劑之例更見於 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 第 15 編、Berkow 等編, 1987、Rahway, N. J. 及 Sladek 等 Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs, 1987, Powis 等編、Taylor 及 Francis, New York, N. Y.。

自體免疫疾病治療劑或抗炎症劑可為例如雙氯芬酸 (Diclofenac)、Loxoprofen 鈉、celecoxib、Etodolac、meloxicam、Rofecoxib，比羅昔康 (Piroxicam)、indomethacin、異丁苯丙酸 (Ibuprofen)、naproxen 等非類固醇性抗炎症劑，或例如胺甲喋呤 (Methotrexate)、Chloroquine、氫化 Chloroquine、環孢素 (cyclosporin)、penicillamine、Sulfasalazine、吡硫基嘌呤、Leflunomide 等疾病修飾性抗風濕藥。

如上所述，可將各種藥劑封入免疫微脂粒之內水相來作

用。他方面，上述藥劑也可以未封入免疫微脂粒之狀態而與免疫微脂粒併用來作用於標的細胞。

6. 免疫微脂粒成分之結合樣式

本發明之免疫微脂粒由兩親媒性小胞形成脂質、親水性聚合物、蛋白質、胜肽、糖等構成而前述脂質、蛋白質、胜肽及親水性聚合物形成共有結合或非共有結合。本發明之免疫微脂粒之形態也可於微脂粒表面直結蛋白質、胜肽等機能性分子、或仲介親水性聚合物而於微脂粒結合。前者之場合，親水性聚合物也可於微脂粒直結而含有。

(1) 脂質與親水性聚合物之結合樣式

親水性聚合物之脂質衍生物為由上述 5.(1)記載之兩親媒性小胞形成脂質與上述 5.(2)記載之親水性聚合物而成，其組合無特限，可依目的而適宜選擇。脂質與親水性聚合物由具有脂質之官能基(含有於脂質人為導入之官能基)與具有親水性聚合物之官能基(含有於親水性聚合物人為導入之官能基)仲介直接或接頭形成共有結合。

於親水性聚合物之脂質衍生物可為以下者，但不限於此。親水性聚合物之脂質衍生物為例如聚乙二醇修飾脂質、聚乙烯亞胺衍生物、聚乙烯醇衍生物、聚丙烯酸衍生物、聚丙烯醯胺衍生物、葡聚糖衍生物、聚甘油衍生物、甲殼質衍生物、聚乙烯吡咯啉酮衍生物、聚天冬醯胺酸醯胺衍生物、聚-L-離胺酸衍生物、甘露聚糖衍生物、三聚葡萄糖衍生物等。

「聚乙二醇(PEG)修飾脂質」可為文獻((D.D.Lasic,

” Liposomes : from basic to applications” ,Elsevier Science Publishers, pp. 1-171 (1993))之 ” Chapter 11. Liposomes as a drug delivery system”)記載之聚乙二醇(PEG)修飾磷脂醯乙醇胺類，更具體而言，N-單甲氧基聚乙二醇丁二醯基磷脂醯乙醇胺類、N-單甲氧基聚乙二醇羧基磷脂醯乙醇胺類、N-單甲氧基聚乙二醇伸乙基磷脂醯乙醇胺類、N-單甲氧基聚乙二醇羧乙羧基磷脂醯乙醇胺類、N-單甲氧基聚乙二醇羧丙羧基磷脂醯乙醇胺類、N-單甲氧基聚乙二醇(2-氯-1,3,5-三吡啶-4,6-二基)丁二醯基磷脂醯乙醇胺類、二-C₁₂₋₂₄醯基-甘油-磷脂醯乙醇胺-N-PEG、二-C₁₂₋₂₄醯基-甘油-單PEG醚、單C₁₂₋₂₄醯基甘油-二PEG醚、聚乙二醇烷基醚、N-(2,3-雙十四醯氧丙基)醯胺聚乙二醇甲基醚、N-(2,3-雙十四醯氧丙基)胺甲酸酯聚乙二醇甲基醚、N-(2,3-雙十四醯氧丙基)丁二醯胺聚乙二醇甲基醚、神經鞘胺醇-1-(丁二醯基甲氧基聚乙二醇類、神經鞘胺醇-1-(丁二醯基(甲氧基聚乙二醇))類、聚乙二醇山梨聚糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如單硬脂酸聚乙二醇、單油酸聚乙二醇、二甘油三月桂酸酯聚乙二醇、二硬脂酸聚乙二醇、二油酸聚乙二醇、硬脂酸二乙二醇等)、聚乙二醇蓖麻油、吡咯啉酮羧酸異硬脂酸 PEG-40 水添蓖麻油、單甲氧基聚乙二醇-3,5-雙十五烷氧苄基胺甲酸酯、4-(N'-(甲氧基聚乙二醇羧基)2-胺乙基)N,N-二硬脂醯苄醯胺、DSPE-PEG(NOF 公司製品、SUNBRIGHT DSPE-020C、DSPE-050C、DSPE-020G、DSPE-050G、DSPE-020CN、DSPE-050CN)、DSPE-Multi-arm

PEG(NOF 公司製品、SUNBRIGHT DSPE-PTE020)、DSPE-Comb-型 PEG(NOF 公司製品、SUNBRIGHT DSPE-AM0530K)、二醯基甘油-PEG(NOF 公司製品、SUNBRIGHT GS-020,GS-050)、膽固醇-PEG(NOF 公司製品、SUNBRIGHT CS-010、CS-020、CS-050)、PEG-Ceramide(Avanti POLAR LIPID 公司製品)、mPEG-DTB-DSPE(DTB; 二硫苄基、國際公開小冊、WO2005/051351)、PEG-DAA(DAA; 二烷氧丙基、國際公開小冊 WO2005/026372)等。

其他親水性聚合物之脂質衍生物之具體例可為聚氧乙烯蓖麻油·硬化蓖麻油(例如聚氧乙烯 POE(3)蓖麻油、POE(5)硬化蓖麻油等)、N-[ω -甲氧基聚(氧伸乙基)- α 氧羰基]-磷脂醯乙醇胺類、O-(C₁₀₋₁₈ 烷醯基或烯醯基)三聚葡萄糖、N-(C₁₀₋₁₈ 烷醯基或烯醯基)聚丙烯醯胺、DSPE-聚甘油(NOF 公司製品、SUNBRIGHT DSPE-PG8G)等。

將親水性聚合物結合於脂質之方法有(a)於預先形成之微脂粒分散液結合親水性聚合物之方法、(b)將親水性聚合物之脂質衍生物於調製之微脂粒加入之方法。

(a)於預先形成之微脂粒結合親水性聚合物之方法，例如用甲苯磺醯氯活性化 PEG，此續於含有具有胺基之脂質(磷脂醯乙醇胺等於微脂粒高 pH 條件下添加，得以親水性聚合物修飾之微脂粒(Senior 等，Biochim. Biophys. Acta.1-62: 77-82 (1991))。又其他多數結合也可利用為當業者周知。

(b)調製親水性聚合物之脂質衍生物而於微脂粒加入之方法，親水性聚合物可作為結合脂質之衍生物使用，則可將其

疏水性部位插入微脂粒之脂質層。將這些親水性聚合物衍生物於預先形成之微脂粒分散液來加溫，或將親水性聚合物衍生物於微脂粒構成脂質成分之混合時添加，得以親水性聚合物修飾之微脂粒。由親水性聚合物來衍生物化之脂質之製造可例如美國專利第 5,395,619 號記載，可依公知之方法製造。例如欲磷脂質之反應活性官能基與 PEG 共有結合，可用氰尿醯氯之方法(Blume 等, *Biochim. Biophys. Acta.* 1029: 91-97 (1990)及美國專利第 5,213,804 號)、用羰醯亞胺基之方法(*Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 17: 77-78 (1990); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11460-11464 (1991); *Biochim. Biophys. Acta.*, 1066: 29-36 (1991); *Biochim. Biophys. Acta.*, 1105: 193-200 (1992); *Period. Biol.*, 93: 349-352 (1991))、用酸酐之方法、用戊二醛之方法等公知之方法。

(2)脂質與蛋白質之結合樣式

於微脂粒將蛋白質或胜肽等固定化之方法可為如下述(i)至(x)之方法。構成微脂粒之脂質與蛋白質之結合為脂質具有之官能基(包括於脂質人為導入之官能基)與蛋白質具有之官能基(包括於蛋白質人為導入之官能基)之共有結合、或基於物理·生物學親和性之非共有結合來形成。形成共有結合之官能基之組合為例如胺基/羧基、胺基/N-羥丁二醯亞胺基酯、胺基/醛基、胺基/甲苯磺醯基、胺基/硝苯羰基、胺基/縮醛基、胺基/異硫氰酸酯基、胺基/鹵化醯基、胺基/苯并三唑羧酸酯基、醯肼基/醛基、硫醇基/馬來醯亞

胺基、硫醇基/乙烯磺醯基等、硫醇基/硫醇基等。非共有結合可利用疏水結合或抗生物素蛋白 (avidin) /生物素、聚組胺酸標記/鎳等專一結合。

(i)於蛋白質導入疏水性基，則對疏水環境下之微脂粒之脂質層予以親和性，將此加入別途調製之微脂粒之方法 (Biochimica et Biophysica Acta, 812, 116(1985))。

(ii)將抗體或內因性配體作為與細胞之膜蛋白質之融合蛋白質來表現，將此膜蛋白部分於別途調製之微脂粒加入之方法 (莫耳 Med. 7 (10) 723, (2001))。

(iii)若微脂粒構成脂質成分為糖脂質時，將其糖以氧化劑氧化而生成醛基，將此與蛋白質之胺基反應而形成許夫鹼來使脂質與蛋白質結合之方法 (Biochimica et Biophysica Acta. 640, 66 (1981))。

(iv)微脂粒調製時將具有能與胺基反應之官能基之脂質混合，於此將蛋白質之 Lys 殘基之 ϵ -胺基或 N 末端之 α -胺基反應而加入微脂粒之方法 (J. Immunol Methods. 1983, 65(3): 295-306)。

將蛋白質之胺基與脂質共有結合時，脂質所必要之反應性官能基可為例如 N-羥丁二醯亞胺基酯 (NHS 酯)、醛基、甲苯磺醯基、硝基苯羰基、縮醛基、羧基、異硫氰酸酯基、鹵化醯基、苯并三唑羧酸酯基等。

(v)微脂粒調製時將具有能與硫醇基反應之官能基之脂質混合，於此將與具有硫醇基之蛋白質反應之方法 (Journal of Immunological Method, 75,351 (1984); Biochemical and

Biophysical Research Communications, 117, 399 (1983))。

賦予蛋白質硫醇基已知用 N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯 (SPDP)(Carlsson, J. 等 Biochem. J. 173, 723, (1978)) 或 N-丁二醯亞胺基-S-乙醯硫乙酸酯 (SATA)、N-丁二醯亞胺基-S-乙醯硫丙酸酯 (SATP)、亞胺基噻茂烷 (Traut, R. R. 等 Biochemistry 12, 3266 (1973))、氫硫烷基亞胺酸酯等化合物來施行之方法為公知。上述方法之外，將蛋白質之內在性二硫醇基還原成硫醇基而可作為結合使用。尤其蛋白質為抗體時，可利用抗體(全長或片段)之鉸鏈領域及重鏈與輕鏈之連結部位之二硫醇基，抗體與脂質之結合中以用內在性硫醇基之後者之方法由蛋白質之活性維持之點較佳。例如可將 IgG 抗體以胃蛋白酶等酵素予以 $F(ab')_2$ 化、可將以二硫基蘇醇等還原而得之 Fab' 所生成之硫醇基供結合 (Martin, F. J. 等 Biochemistry 20, 4229 (1981))。IgM 之場合，可仿 Miller 等之方法 (J. Biol. Chem 257, 286 (1965))，以穩和之條件將 J 鏈還原所得之 IgMs 之 Fc 部分之硫醇基供結合。

蛋白質之硫醇基與脂質予以共有結合時必要之脂質之官能基為馬來醯亞胺基、乙烯磺醯基、硫醇基等。例如含有馬來醯亞胺基之脂質可為 N-(3-(2-吡啶二硫基)丙醯基)磷脂醯乙醇胺、N-(間馬來醯亞胺苄醯基)二軟脂醯磷脂醯乙醇胺、N-(4-對馬來醯亞胺苯基)丁醯磷脂醯乙醇胺 (MPB-PE) 等。馬來醯亞胺基化試藥可為 N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)丁二醯亞胺之外，製作胺基之馬來醯亞胺基衍生物

一般使用之 N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苯基)丁酸酯 (SMPB), N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苯基)丙酸酯、N- (γ -馬來醯亞胺基丁醯氧基)丁二醯亞胺等。

又可以上述馬來醯亞胺基化試藥將蛋白質之胺基取代為馬來醯亞胺基。這些與具有硫醇基之例如將吡啶二硫基丙酸酯(PDP)等修飾之脂質反應而形成共有結合。

(vi)微脂粒調製時混合具有能與醛基反應之官能基之脂質、結合糖鏈由來之醛基之方法。

通常真核生物中，蛋白質為由翻譯後修飾而接受糖鏈修飾。尤其抗體之場合，於其 Fc 領域有糖鏈存在。將這些糖鏈氧化而生成之醛基與醯肼反應而形成共有結合，故於脂質修飾醯肼，則可仲介糖鏈將蛋白質及胜肽固定化於脂質 (Biochimica et Biophysica Acta 1420 153-167 (1999))。

(vii)微脂粒、蛋白質各所具有之官能基彼此用交聯劑或縮合劑等來結合之方法。

將脂質所具有之胺基與蛋白質之胺基結合，則可於微脂粒表面將蛋白質固定化 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 89, 1114 (1979) ; Liposome Technology, 155 (1983))。具有胺基之脂質為例如磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸或磷脂醯酥胺酸等。蛋白質之胺基為由離胺酸殘基之 ϵ -胺基及 N 末端之 α -胺基來提供。欲於由具有胺基之脂質構成之微脂粒將蛋白質固定化、可採用以戊二醛將脂質之胺基與蛋白質之胺基直接交聯之方法、用反應活性試藥將脂質之胺基與蛋白質之胺基予以化學結

合之方法等公知之方法。二價交聯劑除戊二醛之外，可為二丁二醯亞胺基辛二酸酯(DSS)、酞醛、對酞醛等二醛、甲基庚二醯亞胺酸酯(DMP)、二異硫氰基二苯乙烯二磺酸鈉(DIDS)等。反應活性試藥可為 N-羥基丁二醯亞胺基 3-(2-吡啶硫基)丙酸酯、間馬來醯亞胺苄基-N-羥基丁二醯亞胺基酯、二硫雙(丁二醯亞胺基丙酸酯)、雙(磺酸基丁二醯亞胺基)辛二酸酯、二丁二醯亞胺基辛二酸酯等。

將脂質具有之胺基與蛋白質具有之硫醇基、或脂質具有之硫醇基與蛋白質具有之胺基結合，則可於微脂粒表面將蛋白質固定化。於胺基和硫醇基具有反應性之二價交聯劑可為 N-丁二醯亞胺基 3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苄基)丁酸酯(SMPB)、N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苄基)乙酸酯(SMPA)、N-丁二醯亞胺基溴乙酸酯、N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苄基)丙酸酯(SMPP)、N-(γ -馬來醯亞胺基丁醯氧基)丁二醯亞胺(GMBS)、N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)丁二醯亞胺(EMCS)等。

脂質之羧基與蛋白質之胺基、或脂質具有之胺基與蛋白質具有之羧基用縮合劑來結合，則可於微脂粒表面將蛋白質固定化(Biochemistry, Vol.31, 2850-2855(1992))。

將脂質之硫醇基與蛋白質之硫醇基結合，則可於微脂粒表面將蛋白質固定化。例如可用雙馬來醯亞胺基己烷等交聯劑。

(viii) 利用生物素與抗生物素或抗生物素蛋白 (

avidin) 之專一親和性，使蛋白與脂質結合之方法。

將生物素修飾蛋白質與抗生物素蛋白鏈黴素或抗生物素蛋白修飾脂質予以非共有結合(Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12: 311-325 (2002))。又抗生物素蛋白及抗生物素蛋白形成 4 量體，可利用最大 4 分子之生物素之結合，則可將生物素修飾蛋白質以抗生物素蛋白或抗生物素蛋白鏈黴素接頭於生物素修飾脂質而予以非共有結合(Biochimica et Biophysica Acta 1239 133-144 (1995))。

(ix)利用組胺酸標記與鎳離子之親和性，使蛋白與脂質結合之方法。

利用聚組胺酸標記(His-Tag)與鎳離子(Ni^{2+})之親和性，則可於微脂粒將蛋白質及胜肽固定化(Molecular Pharmaceutics 3, 5, 525-530)。依基因工程手法，將 His-Tag 融合之嵌合體蛋白質或胜肽依公知之方法表現、精製。又將具有金屬(Ni^{2+})螯合部位之 NTA(nitriloacetic acid)、IDA(iminodiacetic acid)等於脂質之末端修飾，則可調製 Ni^{2+} 被固定化之微脂粒。於該微脂粒之 Ni^{2+} 專一地結合 His-Tag，則 His-Tag 融合蛋白質或胜肽固定化於微脂粒上。

(x)於抗體之 Fc 功能域有親和性之蛋白質或仲介其蛋白質功能域，將抗體之全長分子結合之方法。

於抗體之 Fc 功能域有親和性之蛋白質 A 或蛋白質 G 蛋白質、或仲介參與 Fc 功能域之結合之蛋白質 A，蛋白質 G 之功能域蛋白質，則可將抗體之全長分子載持。此時蛋白

質 A, 蛋白質 G 蛋白質可依上述(i)至(ix)中之任何方法於微脂粒脂質結合(BMC Immunology 2006,7: 24)。

上述(i)至(x)中, 調節蛋白質和參與固定化之脂質之比例, 則可任意變化於微脂粒固定化之蛋白質之量。

(3)親水性聚合物與蛋白質之結合樣式

於親水性聚合物將蛋白質或胜肽等固定化之方法有如下述(i)至(vii)之方法。欲將親水性聚合物與蛋白質、或將依上述方法所得親水性聚合物之脂質衍生物與蛋白質結合, 將親水性聚合物具有之官能基(包括於親水性聚合物人為導入之官能基)與蛋白質具有之官能基(包括於蛋白質人為導入之官能基)反應, 而形成共有結合或非共有結合之方法。形成共有結合之官能基之組合可為例如胺基/羧基、胺基/N-羥丁二醯亞胺基酯、胺基/醛基、胺基/甲苯磺醯基、胺基/硝苯羰基、胺基/縮醛基、胺基/異硫氰酸酯基、胺基/鹵化醯基、胺基/苯并三唑羧酸酯基、醯肼基/醛基、硫醇基/馬來醯亞胺基、硫醇基/乙烯磺醯基等、硫醇基/硫醇基等。非共有結合可利用抗生物素蛋白/生物素、聚組胺酸標記/鎳等專一結合。蛋白質可於親水性聚合物之主鏈·側鏈之任意末端及非末端部位結合, 也可對親水性聚合物 1 分子可有複數個結合。

(i)於具有與胺基之反應性官能基之親水性聚合物, 將蛋白質及胜肽之 Lys 殘基之 ϵ -胺基或 N 末端之 α -胺基反應之方法(Int J Oncol. 2003 23(4): 1159-65.)。

蛋白質之胺基為由 Lys 殘基之 ϵ -胺基或 N 末端之 α -胺

基來提供。欲將蛋白質之胺基與脂質結合時，親水性聚合物衍生物所必要之反應性官能基可為例如 N-羥丁二醯亞胺基酯(NHS 酯)、醛基、甲苯磺醯基、硝基苯羰基、縮醛基、羧基、異硫氰酸酯基、鹵化醯基、苯并三唑羧酸酯基等。

(ii)於具有與硫醇基之反應性官能基之親水性聚合物，將具有硫醇基之蛋白質及胜肽之硫醇基結合之方法(Dmitri Kirpotin 等, Biochemistry, 1997, 36, 66-75)。

對蛋白質之硫醇基之賦予已知使用 N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)(Carlsson, J.等 Biochem.J. 173, 723 (1978))或 N-丁二醯亞胺基-S-乙醯硫乙酸酯(SATA)、N-丁二醯亞胺基-S-乙醯硫丙酸酯(SATP)、亞胺基噻茂烷(Traut, R. R.等 Biochemistry 12, 3266 (1973))、氫硫烷基亞胺酸酯等化合物來施行之公知之方法。上述方法之外，將蛋白質之內在性二硫醇基以 TCEP、DTT、氫硫基乙醇、半胱胺酸、半胱胺醯二胺等來還原成硫醇基，而可用以結合。尤其蛋白質為抗體時，可利用抗體(全長或片段)之鉸鏈領域及重鏈與輕鏈之連結部位之二硫醇基、抗體與親水性聚合物之結合中使用內在性硫醇基之後者之方法由活性維持之點較佳。例如將 IgG 抗體以胃蛋白酶等酵素予以 $F(ab')_2$ 化，更可以二硫基蘇醇等還原所得於 Fab' 生成之硫醇基供結合(Martin, F. J.等 Biochemistry 20, 4229 (1981))。IgM 之場合，可仿 Miller 等之方法(J. Biol. Chem 257, 286 (1965))，以穩和之條件將 J 鏈還原所得之 IgMs 之

Fc 部分之硫醇基供結合。

與蛋白質之硫醇基之結合必要之官能基為馬來醯亞胺基、乙烯磺醯基、硫醇基等。如此親水性聚合物衍生物可為例如 PEG-馬來醯亞胺〔NOF 公司製品、SUNBRIGHT MA SERIES (馬來醯亞胺-PEGs)〕、PEG-乙烯磺(Bo B.Lundberg 等, Int. J. Pharm, 205, 101-108 (2000))、甲氧基(醯肼)聚乙二醇、雙(醯肼)聚乙二醇等。馬來醯亞胺基化試藥除 N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)丁二醯亞胺之外, 可為製作胺基之馬來醯亞胺基衍生物一般使用之 N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苯基)丁酸酯(SMPB), N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苯基)丙酸酯、N-(γ -馬來醯亞胺基丁醯氧基)丁二醯亞胺等。

又可於上述馬來醯亞胺基化試藥將蛋白質之胺基以馬來醯亞胺基取代。這些與具有硫醇基之例如將吡啶二硫基丙酸酯(PDP)等修飾之親水性聚合物反應而形成共有結合。

(iii)於具有與醛基之反應性官能基之親水性聚合物、與蛋白質之糖鏈由來之醛基結合之方法。

通常真核生物中, 蛋白質由翻譯後修飾而接受糖鏈修飾。尤其抗體時, 於其 Fc 領域有糖鏈存在。將這些糖鏈氧化而生成之醛基和醯肼可反應而形成共有結合, 故於親水性聚合物修飾醯肼, 則可仲介糖鏈而將蛋白質及胜肽於親水性聚合物固定化(Biochimica et Biophysica Acta 1420 153-167 (1999))。

(iv)將親水性聚合物、蛋白質各具有之官能基彼此用交聯

劑或縮合劑等來結合之方法。

將親水性聚合物具有之胺基與蛋白質之胺基結合，則可於親水性聚合物使蛋白質固定化。具有胺基之親水性聚合物之衍生物可為例如 PEG-NH₂ [NOF 公司製品、SUNBRIGHT PA SERIES(Amino-PEGs)] 等。蛋白質之胺基為由離胺酸殘基之 ϵ -胺基及 N 末端之 α -胺基而提供。欲於具有胺基之親水性聚合物將蛋白質固定化，可採用以戊二醛使親水性聚合物之胺基與蛋白質之胺基直接交聯之方法、用反應活性試藥使親水性聚合物之胺基與蛋白質之胺基予以化學結合之方法等公知之方法。二價交聯劑除戊二醛之外，可用二丁二醯亞胺基辛二酸酯(DSS)、酞醛、對酞醛等二醛、甲基庚二醯亞胺酸酯(DMP)、二異硫氰基二苯乙烯二磺酸鈉(DIDS)等。反應活性試藥為 N-羥基丁二醯亞胺基 3-(2-吡啶硫基)丙酸酯、間馬來醯亞胺苄基-N-羥基丁二醯亞胺基酯、二硫雙(丁二醯亞胺基丙酸酯)、雙(磺酸基丁二醯亞胺基)辛二酸酯、二丁二醯亞胺基辛二酸酯等。

親水性聚合物具有之胺基與蛋白質具有之硫醇基、或親水性聚合物具有之硫醇基與蛋白質具有之胺基結合，則可於親水性聚合物將蛋白質固定化。對胺基和硫醇基具有反應性之二價交聯劑可為 N-丁二醯亞胺基 3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苄基)丁酸酯(SMPB)、N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苄基)乙酸酯(SMPA)、N-丁二醯亞胺基溴乙酸酯、N-丁二醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺苄基)丙酸酯(SMPP)、N-(γ -馬來醯亞胺基

丁醯氧基)丁二醯亞胺(GMBS)、N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)丁二醯亞胺(EMCS)等。

親水性聚合物之羧基與蛋白質之胺基、或親水性聚合物具有之胺基與蛋白質具有之羧基以縮合劑結合，則可於親水性聚合物將蛋白質固定化(Maruyama K 等, *Biochimica et Biophysica*, 1234,74-80 (1995))。

將親水性聚合物之硫醇基與蛋白質之硫醇基結合，則可於親水性聚合物將蛋白質固定化。例如用雙馬來醯亞胺基己烷等交聯劑。

(v)利用生物素與抗生蛋白鏈黴素或抗生物素蛋白之專一親和性使蛋白質與親水性聚合物結合之方法。

可將生物素修飾蛋白質與抗生蛋白鏈黴素或抗生物素蛋白修飾親水性聚合物予以非共有結合(*Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 12: 311-325 (2002))。又抗生蛋白鏈黴素及抗生物素蛋白形成 4 量體，利用可結合最大 4 分子之生物素，將生物素修飾蛋白質由抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈黴素接頭於生物素修飾親水性聚合物而予以非共有結合(*Biochimica et Biophysica Acta* 1239 133-144 (1995))。

(vi)利用組胺酸標記與鎳離子之親和性、結合蛋白質與親水性聚合物之方法。

利用聚組胺酸標記(His-Tag)與鎳離子(Ni^{2+})之親和性可於微脂粒將蛋白質及胜肽固定化(*Molecular Pharmaceutics* 3, 5, 525-530)。依基因工程手法，可將 His-Tag 融合之嵌合

體蛋白質或胜肽由公知之方法表現、精製。又將具有金屬(Ni^{2+})螯合部位之 NTA(nitriloacetic acid)、IDA(imino diacetic acid)等於親水性聚合物之末端或側鏈修飾，則可調製 Ni^{2+} 被固定化之微脂粒。於該微脂粒之 Ni^{2+} 專一地結合 His-Tag，則 His-Tag 融合蛋白質或胜肽固定化於親水性聚合物。

(vii)於抗體之 Fc 功能域具有親和性之蛋白質或仲介其蛋白質功能域結合抗體之全長分子之方法。

於抗體之 Fc 功能域具有親和性之蛋白質 A 或蛋白質 G 蛋白質、或仲介與 Fc 功能域之結合參與之蛋白質 A，蛋白質 G 之功能域蛋白質，可將抗體之全長分子載持。此時蛋白質 A，蛋白質 G 蛋白質可依上述(i)至(vi)之任何方法於親水性聚合物結合(BMC Immunology 2006,7: 24)。

上述(i)至(vii)中，調節蛋白質與具有反應性之親水性聚合物之比例，則可仲介親水性聚合物將固定化於微脂粒之蛋白質之量任意變化。

7. 免疫微脂粒之形態

微脂粒典型上為由內部有水相之單層或多層之脂質雙重層而構成之閉鎖小胞(D.D.Lasic, "Liposomes: from basic to applications", Elsevier Science Publishers, pp. 1-171 (1993))，但本發明中乃更廣指粒子狀之脂質複合體。採取典型閉鎖小胞構造之微脂粒之形態可為多重膜微脂粒(MLV; multilamellar vesicle)、小小一枚膜微脂粒(SUV; small unilamellar vesicle)、大大一枚膜微脂粒(LUV; large

unilamellar vesicle)、脂質複合體之構造無明確規定。本發明中免疫微脂粒之粒徑乃依上述大小調節法而異，其製造可能之微脂粒大小之下限為約 20nm 程度 (D.D.Lasic, "Liposomes : from basic to applications", Elsevier Science Publishers, pp. 1-171 (1993))。他方面，微脂粒大小之上限為可血管內投與之 $7\mu\text{m}$ 以下之必要。本發明所用免疫微脂粒之粒徑無特限，通常為 0.03 至 $5\mu\text{m}$ 程度。由注射來全身投與之場合，考慮微脂粒之血中滯留性、腫瘤或炎症部位等病態組織之集積性，以 400nm 以下較佳。構成微脂粒之脂質成分及其組成比率可考慮微脂粒分散液之 pH、滲透壓、Zeta 電位、相轉移溫度、活體內之血中滯留性、安定性等物性來選定。

8. 免疫微脂粒之調製法及精製法

(1) 免疫微脂粒調製法

本發明之微脂粒製造方法無特限，當業者可能利用之方法 (D.D.Lasic, "Liposomes : from basic to applications", Elsevier Science Publishers, pp. 1-171 (1993)) 皆可能適用。用上述脂質可依薄膜法、逆相蒸發法、乙醇注入法、醚注入法、脫水-再水和法、界面活性劑透析法、水和法、凍結融解法、小型微脂粒小胞之鈣誘發融合法、機械化學法、己烷-span80 透析法，有機溶劑小球蒸餾法等製造，可依超音波照射法、凍結融解後之超音波照射法、擠壓法、夫冉其壓法、勻化法等方法調節微脂粒之粒徑。可依公知之方法施行由多重膜微脂粒至一枚膜微脂粒，由一枚膜微脂

粒至多重膜微脂粒之轉換。

又可依公知之方法將藥物載持於微脂粒之內部。一般可為被包化法、遙控載法(pH 梯度法)、對離子濃度梯度法、凍結融解法、界面活性劑去除法、電機穿孔法、超臨界二氧化碳法、膜載法等(G.Gregoriadis, "Liposome Technology Liposome Preparation and Related Techniques", 2nd edition, Vol.I-III, CRC Press)。藥物之封入形態只要於微脂粒載持藥物之構造體則其形態無特限，例如將藥物內包於脂質小胞之閉鎖空間內之形態、內包於脂質層間之形態、包含於脂質層內之形態等，也可為這些組合之形態。

免疫微脂粒之調製法可大別為(A)調製含有具有反應性官能基之脂質或親水性聚合物之微脂粒，對此與蛋白質反應之方法、或(B)具有反應性官能基之親水性聚合物與蛋白質反應，與別途調製之不具有反應性官能基之微脂粒融合之方法。

(A)上述微脂粒調製法中，作為微脂粒構成脂質成分之一部分，使用具有反應性官能基之脂質、或具有反應性官能基之親水性聚合物衍生物脂質，以任意方法調製微脂粒。將所得微脂粒與蛋白質如上述 6-(2)、(3)記載反應，將微脂粒之脂質分子或親水性聚合物與蛋白質予以共有結合或非共有結合。

(B)已知脂質-親水性聚合物-蛋白質之結合體於與微脂粒(無必要反應性官能基)之混合分散液中，於脂質分子之相轉移溫度附近及其以上之溫度條件下融合，也即引起兩親

媒性小胞形成脂質之再構成，得於水相配置親水性聚合物-蛋白質部分，於脂質相配置脂質部分之免疫微脂粒 (Paul S.Uster 等 FEBS, 1996, 243-246; T.Ishida 等 FEBS, 1999, 129-133)。於此，微脂粒與脂質-親水性聚合物-蛋白質之結合體融合之適當條件為考慮該脂質之物性等來選擇。

(2)免疫微脂粒之精製法

免疫微脂粒之精製乃指於上述免疫微脂粒調製法 8.(1)之過程生成、未結合於微脂粒之未反應之蛋白質或胜肽等分離、或於上述免疫微脂粒調製法 8.(1)之過程生成、未與微脂粒融合之親水性聚合物-蛋白質之分離。免疫微脂粒之精製為由層析之分離、超濾、透析、超離心分離等。

(3)免疫微脂粒之抗體密度測定法

免疫微脂粒之「抗體密度」乃定義為將對構成免疫微脂粒之總脂質莫耳數，於該免疫微脂粒含有之抗體之莫耳數之比例以莫耳%標記者。於此，總脂質乃指含於上述 5-(1)列舉之兩親媒性小胞形成脂質、構成微脂粒之所有脂質。

脂質之定量方法可為例如依放射性同位素之方法 (Maehama T, 等, Anal Biochem.279 (2): 248,2000), 依高速液體層析之方法 (Serunian L.A. 等, Methods Enzymol.1991; 198: 78), 依氣體層析之方法 (Hoving EB, 等, J Chromatogr B Biomed Appl .1995, 15; 671 (1-2): 341), 依質量分析之方法 (Wenk M.R.等, Nat Biotechnol. 2003, 21 (7): 813)、吸光光度法、化學定量法、酵素的定量法等。尤其磷脂質為 Bartlett 法 (Bartlett GR.等, J Biol

Chem. 1959, 234(3): 46)、Stewart 法(John Charles,等,Anal Biochem.1980,1; 104(1): 10), 又磷脂醯膽鹼類等含有膽鹼之脂質時, 利用膽鹼氧化酶之酵素定量法(Takayama M, 等, Clin Chim Acta. 1977, 15; 79 (1): 93), 於膽固醇之場合, 利用膽固醇氧化酶之酵素定量法(Allain CC,等,Clin Chem.1974,20 (4): 470)等。聚乙二醇之定量可依示差折射率測定(“Comprehensive Polymer Science”,1st Edition, 1989)、苦味酸法(Int.J.Pharm. 203, 255, 2000)等施行。總脂質量可依上述方法測定總脂質量或特定之脂質成分之脂質量, 由對該脂質之總脂質量之構成比率(理論值)算出。但微脂粒構成脂質之構成比率假定為於免疫微脂粒之製作工程不變動。

蛋白質之定量方法可依 CBQCA 法(You WW 等, Anal Biochem. 15; 244 (2): 277)、紫外吸收法、Biuret 法、Bradford 法、Kieldahl 法、Lowry 法等公知之方法施行。

免疫微脂粒為含有抗體之全長分子時, 可以 0.000014 莫耳%至 0.23 莫耳%, 宜 0.002 莫耳%至 0.14 莫耳%之範圍選擇抗體密度。免疫微脂粒含有抗體之 $F(ab')_2$ 時, 可以 0.000014 莫耳%至 0.23 莫耳%, 宜 0.006 莫耳%至 0.11 莫耳%之範圍選擇抗體密度。免疫微脂粒含有 Fab' 時, 可以 0.000014 莫耳%至 0.94 莫耳%, 宜 0.005 莫耳%至 0.56 莫耳%之範圍選擇抗體密度。免疫微脂粒含有單鏈可變部位抗體時, 可以 0.000014 莫耳%至 1.8 莫耳%, 宜 0.005 莫耳%至 0.56 莫耳%之範圍選擇抗體密度。

於此，免疫微脂粒之最小抗體密度(0.000014 莫耳%)乃指於粒徑 1000nm 之免疫微脂粒結合各種抗體 2 個之狀態。最大抗體密度(抗體全長：0.23 莫耳%、 $F(ab')_2$ ：0.23 莫耳%、 Fab' ：0.94 莫耳%、scFv：1.8 莫耳%)乃指於免疫微脂粒上抗體以最密狀態存在之狀態。也即將免疫微脂粒上之抗體之佔有面積假定為以各種抗體分子之長徑作為直徑之圓面積，將免疫微脂粒之表面積除以抗體分子之圓面積之值之抗體數存在之狀態、抗體以最密配置之狀態 (Allen 等 *Biochimica et Biophysica Acta* (1995))。抗體分子之長徑為以抗體全長為 14.2nm，以 $F(ab')_2$ 為 14.2nm，以 Fab' 為 7nm，以 scFv 為 5nm。關於抗體全長， $F(ab')_2$ 、 Fab' 之長徑，採用 Raghupathy 等，*The Journal of Biological Chemistry* (1971)記載之值。關於 scFv 之長徑，參照 Raghupathy 等，*The Journal of Biological Chemistry* (1971)，更由 Hoedemaeker 等，*J. Biol. Chem* (1997)記載之 scFv 之結晶構造算出長徑，採用 5nm。

9. 含有免疫微脂粒之醫藥

依上述「8.免疫微脂粒調整法及精製法」之項記載之方法所得之免疫微脂粒為活體內之 DR5、Fas 等細胞凋零關連受體之生物活性，也即仲介受體對癌細胞誘導細胞凋零而阻礙癌細胞之增殖，故作為醫藥，尤其可作為癌之治療劑。

依活體外之免疫微脂粒之抗腫瘤活性為可以將細胞凋零關連受體過剩表現之細胞中細胞之增殖之抑制活性測定。

例如培養將 DR5 過剩表現之癌細胞株，於培養系以種種濃度添加免疫微脂粒、測定對焦點形成、噬菌斑形成及類球狀體增殖之抑制活性。

活體內利用實驗動物之免疫微脂粒對癌之治療效果可例如於將高表現 DR5 之腫瘤細胞株移植之裸小鼠投與免疫微脂粒、來測定癌細胞之變化。

癌之種類可為肺癌、前列腺癌、肝臟癌、卵巢癌、大腸癌、乳癌、胰臟癌、血球癌(白血病、淋巴腫等)等，但只要成治療對象之癌細胞表現含有死亡功能域受體，則不受這些限定。

又已知對 Fas 及 DR5 之抗體為對炎症性細胞誘導細胞凋零(J. Clin. Invest. 1996, 98 (2), 271-278; Int. Immunol. 1996, 8 (10), 1595-1602)。故本發明之免疫微脂粒可作為自體免疫疾病或炎症性疾病之治療劑。至於此自體免疫或炎症性之疾病，其例為全身性紅斑性狼瘡、橋本病、關節風濕、宿主移植片病、休格連症候群、惡性貧血、艾迪遜病、硬皮症、Goodpasture 症候群、克隆病、自體免疫溶血性貧血、生殖不能症、重症肌無力症、多發性硬化症、巴塞杜病、血栓不足紫斑病、胰島素依存糖尿病、過敏症、氣喘病、異位性皮膚炎疾病、動脈硬化症、心肌炎、心肌症、腎小球腎炎、再生不良性貧血、臟器移植後之排斥反應。

本發明也提供含有治療有效量免疫微脂粒和藥學容許之稀釋劑、載體、可溶化劑、乳化劑、保存劑及/或補助劑之

醫藥組成物。

本發明之醫藥組成物中容許之製劑所用物質較佳為投與量或投與濃度中，對投與醫藥組成物者為非毒性者較佳。

本發明之醫藥組成物可含有用以將 pH、滲透壓、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸產率、滲透率改變、維持、保持之製劑用物質。

製劑用之物質可為如下者，但不限於這些：甘胺酸、丙胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸等胺基酸類、抗菌劑、抗壞血酸、硫酸鈉或亞硫酸氫鈉等抗氧化劑、磷酸、檸檬酸、硼酸緩衝液、碳酸氫鈉、(Tris-鹽酸)溶液等緩衝劑、甘露糖醇或甘胺酸等充填劑、乙二胺四乙酸(EDTA)等螯合劑、咖啡因、聚乙烯吡咯啶、 β -環糊精或 ϵ -羥丙基- β -環糊精等錯化劑、葡萄糖、甘露糖或糊精等增量劑、單糖類、二糖類或葡萄糖、甘露糖或糊精等其他 ϵ -著色劑、香味劑、稀釋劑、乳化劑或聚乙烯吡咯啶等親水聚合物、低分子量多肽、鹽形成對離子、苺烷氯化銨、苯甲酸、柳酸、硫柳汞、苯乙醇、對 ϵ -羥苯甲酸甲酯、對 ϵ -羥苯甲酸丙酯、Chlorexydine、山梨酸或過氧化氫等防腐劑、甘油、丙二醇或聚乙二醇等溶劑、甘露糖醇或山梨糖醇等糖醇、懸浮劑、PEG、山梨聚糖酯、聚山梨酸酯 20 或聚山梨酸酯 80 等聚山梨酸酯、三硝基甲苯 (triton)、胺基丁三醇 (tromethamine)、卵磷脂或膽固醇等界面活性劑、蔗糖或山梨糖醇等安定化增強劑、氯化鈉、氯化鉀或甘露糖醇·山梨糖醇等彈性增強劑、輸送劑、稀釋劑、賦形

劑、及/或藥學上之補助劑。

這些製劑用之物質之添加量以對免疫微脂粒之重量為 0.01~100 倍，尤其以 0.1~10 倍添加較佳。

製劑中適宜醫藥組成物之組成可由業者依適用疾病、適用投與經路等適宜決定。

醫藥組成物中之賦形劑或載體可為液體也可為固體。適當賦形劑或載體可為注射用之水或生理食鹽液、人工腦脊髓液或非經口投與通常用之其他物質。

也可用含有中性之生理食鹽液或血清蛋白素之生理食鹽液為載體。

於醫藥組成物也可含有 pH7.0-8.5 之 Tris 緩衝液或 pH4.0-5.5 之乙酸緩衝液或於這些含有山梨糖醇或其他化合物。本發明之醫藥組成物可以選擇之組成以必要純度作為適當藥劑、準備成凍乾品或液體。

含有免疫微脂粒之醫藥組成物可用蔗糖等適當賦形劑之凍乾品而成型。

本發明之醫藥組成物可調製成非經口投與用，也可調製成經口之消化管吸收用。

製劑之組成及濃度可依投與方法來決定，對本發明之醫藥組成物所含抗體之抗原之親和性，即對抗原之解離定數 (K_d 值)，親和性越高 (K_d 值低)，越可對人之投與量少而發揮藥效，故可基於此結果而決定本發明之醫藥組成物對人之投與量。

投與量於將免疫微脂粒投與人時，可將依抗體量換算約

0.1~100mg/kg 於 1~30 日投與 1 回。

本發明之醫藥組成物之形態可為包括點滴之注射劑、坐劑、經鼻劑、舌下劑、經皮吸收劑等。

以下舉實施例具體說明本發明，但本發明不受這些實施例限定。又下述實施例中有關基因操作之各操作若無特示，可依「分子選植 (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及 Maniatis, T. 著，Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 年發刊)記載之方法施行，或用市售之試藥或套組時，可依市售品之指示書使用。

於免疫微脂粒結合之蛋白質之濃度乃用 CBQCA 蛋白質定量套組 (Molecular Probes) 依添附之指示書而定量。微脂粒之磷脂質濃度乃用磷脂質 C 和光試劑 (和光純藥工業公司) 依添附之指示書定量。免疫微脂粒之粒徑乃用粒徑測定機 (Nicomp Particle Sizer Model 370, Nicomp Particle Sizing Systems) 來測定。

【參考例 1】

hTRA-8 F(ab')₂ 之調製

將抗人 DR5 抗體 hTRA-8 以乙酸緩衝液 (20mM 乙酸鈉, pH4.5) 調製為 10mg/ml 之濃度。又 hTRA-8 為將係屬小鼠抗人 DR5 抗體之 TRA-8 (Nature Med. 2001, 7(8), 954-60) 人化之抗體，其作為重鏈胺基酸序列具有於序列表記載之序列編號 1 之胺基酸序列，作為輕鏈胺基酸序列具有於序列表記載之序列編號 2 之胺基酸序列。於本抗體溶液 1ml 添加固定化胃蛋白酶 (Pierce 生技公司) 125 μ l 後，於 37°C 保

溫 8.5 小時，將本抗體片段化為 $F(ab')_2$ 片段。將反應溶液離心，由上清濾除固定化胃蛋白酶。以離子交換層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱 (GE HEALTHCARE 公司, Resource S 6ml)；A 液 (50mM 檸檬酸緩衝液, pH4.0)，B 液 (50mM 檸檬酸緩衝液，1M NaCl, pH4.0)；梯度 (B 液 15→40%, 50CV, 直線梯度)；4℃；6ml/分；檢出波長 UV280 nm)，去除胜肽片段及未消化之全長 hTRA-8，回收 $F(ab')_2$ 劃份 (57-111ml 之溶出劃份)。由使用 Labscale TFF 系統 (MILLIPORE 公司)、聚醚磺醯基膜 (MILLIPORE 公司, Pellicon XL, Biomax 50 (分劃分子量：50,000)) 之超濾操作，將檸檬酸緩衝液交換為 HEPES 緩衝液 (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7.4)。

【參考例 2】

hHFE7A $F(ab')_2$ 之調製

將抗人 Fas 抗體 hHFE7A 以乙酸緩衝液 (20mM 乙酸鈉, pH4.5) 調製成 10mg/ml 之濃度。又 hHFE7A 將係屬小鼠抗人 Fas 抗體之 HFE7A (Int.Immunol.2000, 12(4), 555-62) 予以人化之抗體，作為其重鏈胺基酸序列具有序列表記載之序列編號 3 之胺基酸序列，作為輕鏈胺基酸序列具有序列表記載之序列編號 4 之胺基酸序列。於本抗體溶液 1ml 添加固定化胃蛋白酶 (Pierce 生技公司) 125 μ l 後，於 37℃ 保溫 8.5 小時，將本抗體片段化成 $F(ab')_2$ 片段。將反應溶液離心，由上清濾除固定化胃蛋白酶。依離子交換層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱 (GE

HEALTHCARE 公司, Resource S 6ml); A 液 (50mM 檸檬酸緩衝液, pH4.0)、B 液 (50mM 檸檬酸緩衝液、1 M NaCl, pH4.0); 梯度 (B 液 15→40%, 50CV, 直線梯度); 4℃; 6ml/分; 檢出波長 UV 280 nm)回收胜肽片段及濾除未消化之全長 hHFE7A、F(ab')₂ 劃份 (40-65ml 之劃份)。依用 Labscale TFF 系統 (MILLIPORE 公司)、聚醚磺醯基膜 (MILLIPORE 公司, Pellicon XL, Biomax 50 (分劃分子量: 50,000)) 之超濾操作, 將檸檬酸緩衝液交換為 HEPES 緩衝液 (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7.4)。

【參考例 3】

hTRA-8 scFv 之調製

(1) hTRA8 scFv 表現載體之作成

將編碼 hTRA8 之 H 鏈領域之載體 TRA8-H pHA15-1 作為 VH 之模板, 用 2 寡核苷酸引子將編碼 hTRA8 scFv 之前半部分之 DNA 依 PCR 法增幅。

同樣將編碼 hTRA8 之 L 鏈領域之領域之載體 TRA8-L LM-1L 作為 VL 之模板, 用 2 寡核苷酸引子, 將編碼 hTRA8 scFv 之後半部分之 DNA 依 PCR 法增幅。

此時, VH 與 VL 之間將可撓性胜肽接頭 (GGGGS)₃ 於 C 末端設計引子成附加 HHHHHHGGAC 序列 (含有組胺酸 6 殘基標記及 Cys 殘基之序列)。將這些 2DNA 片段於 5' 插入 NdeI (TAKARA BIO 公司), 於 3' 插入 XhoI (TAKARA BIO 公司) 部位, 依 PCR 法連結、製作將 hTRA8 scFv 編碼之 DNA。

將製作之 DNA 以限制酵素 NdeI、XhoI 消化後，於 pET22b(+)(Novagen)之多選植部位存在之限制酵素 NdeI、XhoI 部位插入，而構築 pET22b(+)hTRA8 scFv 表現載體。

(2)hTRA8 scFv 之表現

將於(1)所得 pET22b(+)hTRA8 scFv 表現載體依公知之方法於 OrigamiB(DE3)(Novagen)大腸菌株導入，而於含有 100 μ g/ml 安比西林(Sigma-Aldrich)、25 μ g/ml 康黴素(和光純藥工業公司)、34 μ g/ml 綠黴素(和光純藥工業公司)之 LB 板塗布，得轉形體。次將此轉形體之噬菌斑於 20ml 之 LB 培養基(Invitrogen)中邊振盪邊於 37℃ 增殖終夜至近飽和，將此接種於 2 L 之新 LB 培養基。將細菌於 2 公升坂口燒瓶中 37℃ 通氣培養增殖至 OD 600 nm=0.8。將溫度降低為 16℃，其後用 0.5mM 異丙基- β -D-硫吡喃半乳糖苷(IPTG) (和光純藥工業公司) 惹起蛋白質表現。細菌培養於通氣培養下 16℃ 持續 18 小時。

(3)蛋白質精製

將細胞以 6000g $\times$ 20 分離心來粒化，於含有 20mM Tris-鹽酸 (和光純藥工業公司) (pH8.0)、100mM NaCl (MANAC Incorporated)、4mM CHAPS(Sigma-Aldrich)、10%甘油(和光純藥工業公司) (v/v)、蛋白酶阻礙劑混合液 Completemini (無 EDTA) (Roche Diagnostic GmbH)之緩衝劑再懸浮而於 -80℃ 保存。

將再懸浮液以流水解凍，於冰上施行超音波破碎，以 24,000xg、4℃、20 分之離心分離去除細胞片。

將離心上清通過 0.45 ul 之濾器後，以 His 標記·親和柱精製。也即於 AKTA Prime 系統(GE Healthcare 公司)於柱 His-Trap HP 1ml (GE Healthcare 公司)樣品·施行後，以流量 1ml/分、20mM Tris-鹽酸 (pH7.5)、500mM NaCl、40mM 咪唑 (CALBIOCHEM)、0.6% CHAPS、1mM DTT(Sigma-Aldrich)、予以 5 柱體積分洗淨、次以 20mM Tris-鹽酸 (pH7.5)、500mM NaCl、0.6% CHAPS、1mM DTT、500mM 咪唑來梯度溶出。

將 His-Trap HP 溶出之各劃份以 SDS-PAGE 解析，對含有 scFv 之劃份，更施行凝膠過濾層析精製。也即於柱 Superdex75pg HiLoad16/60 (GE Healthcare 公司) 用 50mM Tris-鹽酸 (pH7.5)、500mM NaCl、10% 甘油、10mM CHAPS、1mM DTT 而添加樣品。分取 Superdex75pg HiLoad16/60 溶出之各劃份，以 SDS-PAGE 解析，回收 scFv 劃份。

【實施例 1】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

將於參考例 1 調製之 $F(ab')_2$ 溶液(抗體濃度 2.5mg/ml, HEPES 緩衝液)，於 10mM L-半胱胺酸(和光純藥工業公司)存在下，於室溫保溫 90 分、還原為 Fab'。依凝膠過濾精製(柱；GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱；HEPES 緩衝液)去除 L-半胱胺酸，得 hTRA-8 Fab' 片段。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DPPC；NOF 公司 COATSOME MC-

6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol)succinyl distearoylphosphatidylethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; 和 NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 22mg、7.73mg、1.26mg(莫耳比 100:66:1)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 3ml 而溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液(20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7.4) 3ml 而懸浮, 得微脂粒(DPPC 濃度: 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合反應

混合上述 hTRA-8 Fab' (3.6mg/ml, 15.3 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 500 μ l)使呈 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:50 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液(pH7.4); 4°C; 2ml/分; 檢出波長 UV280

nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 1，抗體濃度 $33.5 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 6.3mM ，抗體密度 0.0058 莫耳%，平均粒徑 $73.0 \pm 35.9 \text{ nm}$ (HEPES 緩衝液))。

【實施例 2】

仿實施例 1 之(1)，將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃如下施行。將上述 hTRA-8 Fab' (3.6mg/ml , $152 \mu\text{l}$)與微脂粒分散液(10mM DPPC, $500 \mu\text{l}$)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $5 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)； 4°C ； 2ml/分 ；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 2，抗體濃度 $278.5 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 6.1mM

，抗體密度 0.050 莫耳 %，平均粒徑 86.6 ± 39.9 nm(HEPES 緩衝液))。

【實施例 3】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃如下施行。將上述 hTRA-8 Fab' (3.6mg/ml, 244μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 320μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:2 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3.2μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 3，抗體濃度 413.7μ g/ml，磷脂質濃度 4.38mM，抗體密度 0.102 莫耳 %，平均粒徑 84.4 ± 42.2 nm(HEPES 緩衝液))。

【實施例 4】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyldistearoylphosphatidylethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; 和 NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 11mg、3.9mg、3.15mg(莫耳比 100:66:5)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 1.5ml 而溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液(20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7.4) 1.5ml 而懸浮, 得微脂粒(DPPC 濃度: 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)、由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded)、使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

抗體於微脂粒之結合乃如下施行。將上述上述 hTRA-8 Fab' (4.64mg/ml, 237 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 200 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:1 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對

DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, $2\mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液(pH7.4); 4°C ; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm)來分離, 分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000)施行超濾濃縮, 得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 1 之編號 4, 抗體濃度 $394.5\mu\text{g/ml}$, 磷脂質濃度 1.91mM, 抗體密度 0.224 莫耳%, 平均粒徑 $83.7\pm 40.8\text{nm}$ (HEPES 緩衝液))。

【實施例 5】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

將參考例 -1 調製之 F(ab')_2 溶液(抗體濃度 5mg/ml, HEPES 緩衝液)於 40mM($\pm$)-二硫蘇糖醇($\pm$)-Dithiothreitol, 以下標記為 DTT; 和光純藥工業公司)存在下, 於室溫保溫 30 分, 還原為 Fab'。由凝膠過濾精製(柱; GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱; HEPES 緩衝液)去除 DTT, 得 hTRA-8 Fab' 片段。

(2)微脂粒之調製

於二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之

於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 1762mg、618.6mg、2481.4mg (莫耳比 100:66:1) 加乙醇 (和光純藥工業公司) 90ml 來溶解。將此脂質溶液滴下於 HEPES 緩衝液 (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7.4) 900ml, 得微脂粒之粗分散液。次以超濾 (LabScale TFF 系統 (MILLIPORE 公司))、聚醚磺醯基膜 (Pellicon XL 50, Biomax 300, 分割分子量: 300,000, (MILLIPORE 公司)) 調製微脂粒分散液之濃度為 10mM DPPC, 用高壓連續式勻化機 (EmulsiFlex-C5, AVESTIN 公司), 於 50 nm 之孔大小之聚羧酸酯膜 (Nucleopore Track-Etch Membrane, Whatman 公司) 反復擠壓 (extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (4.86mg/ml, 5.7ml) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 132ml) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:25 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 1.32ml 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以超濾 (LabScale TFF 系統 (MILLIPORE 公司))、聚醚磺醯基膜 (Pellicon XL 50, Biomax 300, 分割分子量: 300,000, (MILLIPORE 公司)) 來

分離，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 5，抗體濃度 $1011.0 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 27.63mM ，抗體密度 0.040 莫耳%，平均粒徑 $53.7 \pm 22.4 \text{ nm}$ (HEPES 緩衝液))。

【實施例 6】

仿實施例 5 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 5 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (4.86mg/ml , 9.05ml)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 49ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal= $1:5$ (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM ， $490 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以超濾(LabScale TFF 系統(MILLIPORE 公司)、聚醚磺醯基膜(Pellicon XL 50, Biomax 300, 分割分子量：300,000, (MILLIPORE 公司))來分離，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 6，抗體濃度 $1363.3 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 8.85mM ，抗體密度 0.167 莫耳%，平均粒徑 $50.3 \pm 23.6 \text{ nm}$ (HEPES 緩衝液))。

【實施例 7】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。抗體於微脂粒之結

合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 66 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC ,300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱 (GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液 (pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 7，抗體濃度 96.8 μ g/ml，磷脂質濃度 1.64mM，抗體密度 0.064 莫耳%，平均粒徑 101.1 ± 44.2 nm(HEPES 緩衝液))。

【實施例 8】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml,16.5 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 20 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對

DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, $3\mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液(pH7.4); 4°C ; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm)來分離, 分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。以 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000)施行超濾濃縮, 得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 1 之編號 8, 抗體濃度 $70.7\mu\text{g/ml}$, 磷脂質濃度 1.39mM, 抗體密度 0.055 莫耳%, 平均粒徑 $83.3\pm 40.3\text{ nm}$ (HEPES 緩衝液))。

【實施例 9】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 -1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2)微脂粒之調製

將卵黃卵磷脂(Egg Yolk Lecithin, 以下標記為 eggPC; Q.P.Corporation, PC-98N)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 24mg、7.73mg、1.26mg(莫耳比 100: 66: 1)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓

蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液 3ml，得微脂粒(eggPC 濃度：10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液以擠壓機(The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公司)，由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 66 μ l)與微脂粒分散液(10mM eggPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280 nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 9，抗體濃度 138.8 μ g/ml，磷脂質濃度 2.32mM，抗體密度 0.065 莫耳%，平均粒徑 90.2 ± 13.3 nm(HEPES 緩衝液))。

【實施例 10】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 9 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 16.5 μ l) 用微脂粒分散液 (10mM eggPC, 300 μ l) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:20 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液 (pH7.4); 4°C; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm) 來分離, 分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000) 施行超濾濃縮, 得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成: 表 1 之編號 10, 抗體濃度 90.9 μ g/ml, 磷脂質濃度 2.98 mM, 抗體密度 0.033 莫耳%, 平均粒徑 83.1 ± 13.0 nm (HEPES 緩衝液))。

【實施例 11】

(1) hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2) 微脂粒之調製

將二肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dimyristoyl Phosphatidyl

choline，以下標記為 DMPC；NOF 公司，COATSOME MC-4040)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司，SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 20.3mg、7.73mg、1.26mg(莫耳比 100：66：1)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液 3ml，得微脂粒(DMPC 濃度：10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)，由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 66 μ l)與微脂粒分散液(10mM DMPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab'：DSPE-PEG3400-Mal=1：5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；

HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 11，抗體濃度 148.5 μ g/ml，磷脂質濃度 2.47mM，抗體密度 0.065 莫耳%，平均粒徑 117.9 ± 47.1 nm(HEPES 緩衝液))。

【實施例 12】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 11 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 16.5 μ l)與微脂粒分散液(10mM DMPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 20 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：

表 1 之編號 12，抗體濃度 $76.8 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 2.94mM ，抗體密度 0.028 莫耳%，平均粒徑 $119.3 \pm 45.0 \text{ nm}$ (HEPES 緩衝液)。

【實施例 13】

(1) hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2) 微脂粒之調製

將二油醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dioleoyl Phosphatidylcholine，以下標記為 DOPC；NOF 公司 COATSOME MC-8181)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 23.6mg、7.73mg、1.26mg (莫耳比 100 : 66 : 1) 量取於茄型燒瓶，加氯仿 (關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液 3ml，得微脂粒 (DOPC 濃度 : 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)，由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓，使微脂粒之粒徑整齊。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml , $66 \mu\text{l}$) 與微脂粒分散液 (10mM DOPC, $300 \mu\text{l}$) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG

3400-Mal=1:5 (莫耳比)之比例,令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l, 於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液(pH7.4); 4°C; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm)來分離,分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮,得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成:表 1 之編號 13,抗體濃度 136.3 μ g/ml, 磷脂質濃度 2.30mM, 抗體密度 0.064 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 14】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 13 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 16.5 μ l)與微脂粒分散液(10mM DOPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:20 (莫耳比)之比例,令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應

之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 14，抗體濃度 $72.9 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 2.13mM ，抗體密度 0.037 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 15】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例-1 將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二硬脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Distearoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DSPC；NOF 公司 COATSOME MC-8080)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司,SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 23.7mg、7.73mg、1.26mg(莫耳比 100：66：1)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司)3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液 3ml，得微脂粒(DSPC 濃度： 10mM)之粗分散液。次

將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公司)，由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 165 μ l)與微脂粒分散液(10mM DSPC,300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:2 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司)100mM,3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 15，抗體濃度 178.9 μ g/ml，磷脂質濃度 1.97mM，抗體密度 0.099 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 16】

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。更仿實施例 15 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 66 μ l)與微脂粒分散液(10mM DSPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液(pH7.4); 4°C ; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm)來分離, 分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000)施行超濾濃縮, 得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 1 之編號 16, 抗體濃度 60.4 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.53mM, 抗體密度 0.043 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 17】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司, COATSOME MC-6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及具有馬來醯亞胺基之二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(以下標記為 DSPE-Mal; NOF 公

司,COATSOME FE-8080MA3)各 11mg、3.9mg、0.69mg(莫耳比 100 : 66 : 5)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司) 1.5ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液 1.5ml，得微脂粒(DPPC 濃度 : 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液以擠壓機(The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公司)，由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (4.64mg/ml, 237 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC,200 μ l)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-Mal=1 : 1 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM,2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司) ; 柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級) ; HEPES 緩衝液(pH7.4) ; 4 $^{\circ}$ C ; 2ml/分 ; 檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 DSPE 結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成 : 表 1 之編號 17，抗體濃度 124.0 μ g/ml，磷脂質濃度 1.34mM，抗體密度 0.100 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 18】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 1 之(1)將 hTRA-8 Fab' 片段用時調製。

(2)DSPE-PEG3400-(hTRA-8 Fab')複合體之調製

對 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 220 μ l)加 20 當量之 DSPE-PEG3400-Mal (16.8mg/ml, 100 μ l), 於 37°C 反應 1 小時。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 40 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液 (pH7.4); 4°C; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm)來分離, 分取 DSPE-PEG3400-(hTRA-8 Fab')複合體劃份(39-54ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司, 分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮, 得 DSPE-PEG3400-(hTRA-8 Fab')複合體。對 DSPE 之 hTRA-8 Fab' 之量為 1428.6 μ g/ μ 莫耳 DSPE。

(3)微脂粒之調製

微脂粒乃將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidylcholine, 以下標記為 DPPC; NOF 公司, COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)各 22.05mg、7.68mg(莫耳比 3:2)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 HEPES 緩衝液 3ml,

得微脂粒(DPPC 濃度：10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公司)，以具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓，使微脂粒之粒徑整齊。

(4)微脂粒與 DSPE-PEG3400-(hTRA-8 Fab')複合體之融合

將上述 DSPE-PEG3400-(hTRA-8 Fab')複合體(抗體濃度 $489.9 \mu\text{g/ml}$, $408 \mu\text{l}$)與微脂粒分散液(10m M DPPC, $200 \mu\text{l}$)混合，於 60°C 保溫 3 小時。未與微脂粒融合之 DSPE-PEG3400-(hTRA-8 Fab')複合體以凝膠過濾層析(柱(GE HEALTHCARE 公司, $10 \times 300\text{mm}$, Sephacryl S-500 HR)；HEPES 緩衝液(pH7.4)； 4°C ； 2ml/分)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 18，抗體濃度 $73.7 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 2.27mM ，抗體密度 0.035 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 19】

(1)hTRA-8 全體(fullbody)之二硫化結合之還原

將 hTRA-8 於抗體濃度 2.5mg/ml 、 30mM L-半胱胺酸(和光純藥工業公司)保溫室溫 90 分，將 hTRA-8 全體之二硫化結合還原。以凝膠過濾精製(柱；GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱；HEPES 緩衝液)去除 L-半胱胺酸，得二硫化結合被還原之 hTRA-8 全體。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 全體 (5mg/ml, 450 μ l)與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 2 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液 (pH7.4); 4°C ; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm)來分離, 分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司, 分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮, 得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成: 表 1 之編號 19, 抗體濃度 23.9 μ g/ml, 磷脂質濃度 3.25mM, 抗體密度 0.0029 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 20】

仿實施例 19 之(1)將 hTRA-8 全體之二硫化結合還原。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 全體 (5mg/ml, 180 μ l)與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之

比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成：表 1 之編號 20，抗體濃度 65.4 μ g/ml，磷脂質濃度 3.07mM，抗體密度 0.0085 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 21】

仿實施例 19 之(1)將 hTRA-8 全體之二硫化結合還原。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 全體(5mg/ml, 45 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 全體：DSPE-PEG3400-Mal=1：20 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE

HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分割分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 21，抗體濃度 $41.2 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 3.11mM ，抗體密度 0.0053 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 22】

(1)hTRA-8 全體之硫醇化

於 hTRA-8 全體(抗體濃度 6mg/ml ， 20mM HEPES， 150mM NaCl， 2mM EDTA，pH8.0)將 4mM Traut 試劑(2-亞胺基噻茂烷·鹽酸，Pierce 生技公司)以 hTRA-8：Traut 試劑=1：4 之莫耳比添加，於室溫反應 90 分。其後以凝膠過濾層析(柱；GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱；HEPES 緩衝液)去除 Traut 試劑，將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 全體 (2mg/ml ， $75 \mu\text{l}$)與微脂粒分散液(10mM DPPC， $150 \mu\text{l}$)混合成 hTRA-8 全體：DSPE-PEG3400-Mal=1：15 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯

亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 1.5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司) ; 柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液 (pH7.4); 4°C ; 2ml/分 ; 檢出波長 UV280nm) 來分離 , 分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份) 。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000) 施行超濾濃縮 , 得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成 : 表 1 之編號 22 , 抗體濃度 70.3 μ g/ml , 磷脂質濃度 1.17mM , 抗體密度 0.024 莫耳 % (HEPES 緩衝液)) 。

【實施例 23】

仿實施例 22 之 (1) 將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 1 之 (2) 將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行
將上述 hTRA-8 全體 (5mg/ml, 300 μ l) 和微脂粒分散液 (10mM DPPC, 150 μ l) 混合成 hTRA-8 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 1.5 (莫耳比) 之比例 , 將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 1.5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體為凝膠過濾層析(AKTA

explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液 (pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm) 來分離，分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份)。將 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分劃分子量 50,000) 施行超濾濃縮，得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成：表 1 之編號 23，抗體濃度 184.4 μ g/ml，磷脂質濃度 1.07mM，抗體密度 0.0685 莫耳 % (HEPES 緩衝液))。

【實施例 24】

仿實施例 22 之 (1) 將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 5 之 (2) 將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 全體 (5mg/ml, 1.1ml) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 16.5ml) 混合成 hTRA-8 全體：DSPE-PEG3400-Mal=1：45 (莫耳比) 之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 165 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體以凝膠過濾層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液 (pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm) 來分離，分取免疫微脂粒劃

份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE 公司,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮,得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成:表 1 之編號 24,抗體濃度 $166.5 \mu\text{g/ml}$,磷脂質濃度 5.25mM ,抗體密度 0.0126 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 25】

仿實施例 22 之(1)將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 5 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 全體 (5mg/ml , 4ml)與微脂粒分散液(10mM DPPC, $1995 \mu\text{l}$)混合成 hTRA-8 全體:DSPE-PEG3400-Mal=1:1.5 (莫耳比)之比例,令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $19.95 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司);柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級);HEPES 緩衝液($\text{pH}7.4$); 4°C ; 2ml/分 ;檢出波長 $\text{UV}280\text{nm}$)來分離、分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra(MILLIPORE INC.,分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮,得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成:表 1 之編號 25,抗體濃度 $314.5 \mu\text{g/ml}$,磷脂質濃度

0.96mM，抗體密度 0.131 莫耳 % (HEPES 緩衝液)。

【實施例 26】

(1) hHFE7A Fab' 之調製

將參考例 -2 調製之 $F(ab')_2$ 溶液 (抗體濃度 2.5mg/ml, HEPES 緩衝液) 於 10mM L-半胱胺酸 (和光純藥工業公司) 存在下，保溫室溫 90 分，還原為 Fab'。以凝膠過濾精製 (柱：GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱；HEPES 緩衝液) 來去除 L-半胱胺酸，得 hHFE7A Fab' 片段。

(2) 微脂粒之調製

仿實施例 1 之 (2) 將微脂粒分散液用時調製。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hHFE7A Fab' (1.5mg/ml, 33 μ l) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 180 μ l) 混合成 hHFE7A Fab' : DSPE-PEG 3400-Mal=1 : 20 (莫耳比) 之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 1.8 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hHFE7A Fab' 以凝膠過濾層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液 (pH7.4)；4°C；2ml/分；檢出波長 UV280nm) 來分離，分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分劃分子量 50,000) 施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫

微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 26，抗體濃度 $47.9 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 2.03mM ，抗體密度 0.026 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 27】

仿實施例 26 之(1)將 hHFE7A Fab' 片段用時調製。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hHFE7A Fab' (1.5mg/ml , $132 \mu\text{l}$)與微脂粒分散液(10mM DPPC, $180 \mu\text{l}$)混合成 hHFE7A Fab' : DSPE-PEG3400-Mal= $1:5$ (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $1.8 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hHFE7A Fab' 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液($\text{pH}7.4$)； 4°C ； 2ml/分 ；檢出波長 $\text{UV}280\text{nm}$)來分離，分取免疫微脂粒劃份($36\text{-}48\text{ml}$ 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分割分子量 $50,000$)施行超濾濃縮，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 27，抗體濃度 $115.0 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 1.54mM ，抗體密度 0.081 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 28】

仿實施例 26 之(1)將 hHFE7A Fab' 片段用時調製。更仿

實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hHFE7A Fab' (1.5mg/ml, 330 μ l) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 180 μ l) 混合成 hHFE7A Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:2 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 1.8 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hHFE7A Fab' 以凝膠過濾層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司); 柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液 (pH7.4); 4°C; 2ml/分; 檢出波長 UV280nm) 來分離, 分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分劃分子量 50,000) 施行超濾濃縮, 得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成: 表 1 之編號 28, 抗體濃度 151.6 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.60mM, 抗體密度 0.103 莫耳 % (HEPES 緩衝液))。

【實施例 29】

(1) hHFE7A 全體之硫醇化

於 hHFE7A 全體 (抗體濃度 6mg/ml, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH8.0) 將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸 Pierce 生技公司) 以 hHFE7A : Traut 試劑 = 1:4 之莫耳比率添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾層析 (柱: GE HEALTHCARE 公司, NAP-5 脫鹽柱; HEPES 緩衝液

)去除未反應之 Traut 試劑，將 hHFE7A 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hHFE7A 全體 (2mg/ml, 75 μ l)與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 150 μ l)混合成 hHFE7A 全體 : DSPE-PEG 3400-Mal=1 : 15 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司)100mM, 1.5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hHFE7A 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S(GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司分劃分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 29，抗體濃度 48.1 μ g/ml、磷脂質濃度 1.06mM，抗體密度 0.018 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 30】

(1)hHFE7A 全體之硫醇化

於 hHFE7A 全體(抗體濃度 6mg/ml,20mM HEPES,150mM

NaCl, 2mM EDTA, pH8.0) 將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司) 以 hHFE7A : Traut 試劑 = 1 : 16 之莫耳比率添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾層析 (柱 : GE HEALTHCARE 公司, NAP-5 脫鹽柱 ; HEPES 緩衝液) 去除未反應之 Traut 試劑, 將 hHFE7A 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2) 微脂粒之調製

仿實施例 1 之 (2) 將微脂粒分散液用時調製。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hHFE7A 全體 (2mg/ml, 75 μ l) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 150 μ l) 混合成 hHFE7A 全體 : DSPE-PEG3400-Mal = 1 : 15 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 1.5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hHFE7A 全體以凝膠過濾層析 (AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司) ; 柱 (GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級) ; HEPES 緩衝液 (pH7.4) ; 4°C ; 2ml/分 ; 檢出波長 UV280nm) 來分離, 分取免疫微脂粒劃份 (36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分劃分子量 50,000) 施行超濾濃縮, 得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成 : 表 1 之編號 30, 抗體濃度 157.6 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.30mM, 抗體密度 0.048 莫

耳%(HEPES 緩衝液))。

【實施例 31】

仿實施例 29 之(1)將 hHFE7A 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hHFE7A 全體 (5mg/ml, 300 μ l) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 150 μ l) 混合成 hHFE7A 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 1.5 (莫耳比) 之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 1.5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hHFE7A 全體以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S (GE HEALTHCARE 公司)；柱(GE HEALTHCARE 公司, HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級)；HEPES 緩衝液(pH7.4)；4℃；2ml/分；檢出波長 UV280nm)來分離，分取免疫微脂粒劃份(36-48ml 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司, 分割分子量 50,000)施行超濾濃縮，得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 1 之編號 31，抗體濃度 227.7 μ g/ml，磷脂質濃度 0.95mM，抗體密度 0.096 莫耳%(HEPES 緩衝液))。

於實施例 1 至 31 製作之免疫微脂粒之成分組成如表 1。

【表 1】

實施例編號	蛋白質	脂質組成	抗體密度(mol%)
1	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.0058
2	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.05
3	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.102
4	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 5	0.224
5	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.040
6	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.167
7	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.064
8	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.055
9	A	eggPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.065
10	A	eggPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.033
11	A	DMPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.065
12	A	DMPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.028
13	A	DOPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.064
14	A	DOPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.037
15	A	DSPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.099
16	A	DSPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.043
17	A	DPPC : Chol : DSPE = 100 : 66 : 5	0.100
18	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.035
19	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.0029
20	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.0085
21	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.0053
22	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.024
23	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.069
24	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.013
25	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.131
26	C	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.026
27	C	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.081
28	C	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.103
29	D	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.018
30	D	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.048
31	D	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.096

A : hTRA-8 Fab'、B : hTRA-8 Fullbody、C : hHFE7A Fab'、D : hHFE7A Fullbody (全體)

【實施例 32】

(1)hTRA-8 F(ab')₂ 之硫醇化

於 F(ab')₂ 溶液(抗體濃度 3mg/ml, 50mM 檸檬酸, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH5.0)將 4mM Traut 試劑(2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司)以 hTRA-8 F(ab')₂ : Traut 試劑 = 1 : 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾精製(柱 : GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱 ; PBS)來

去除 Traut 試劑，將 hTRA-8 F(ab')₂ 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DPPC；NOF 公司,COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司,SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 36.71mg、33.3mg、2.1mg (莫耳比 100 : 66 : 1) 量取於茄型燒瓶，加氯仿 (關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽，150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮，得微脂粒 (DPPC 濃度 : 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)、具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將以上述 hTRA-8 F(ab')₂ (1mg/ml, 400 μ l) 和 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 1000 μ l) 混合成 hTRA-8 F(ab')₂ : DSPE-PEG3400-Mal = 1 : 5 (莫耳比) 之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加

10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 20mM, 10 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 F(ab')₂ 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分割分子量 300,000) 之超濾來分離, 分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 32, 抗體濃度 191 μ g/ml, 磷脂質濃度 3.38mM, 抗體密度 0.031 莫耳%, 平均粒徑 91.5 $\pm$ 23.4 nm (PBS))。

【實施例 33】

(1) hTRA-8 F(ab')₂ 之硫醇化

於 F(ab')₂ 溶液(抗體濃度 3mg/ml, 20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH6.0)將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司)以 hTRA-8 F(ab')₂: Traut 試劑 =1: 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾精製(柱: GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱; PBS)而去除 Traut 試劑, 將 hTRA-8 F(ab')₂ 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2) 微脂粒之調製

仿實施例 32(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 F(ab')₂ (1mg/ml, 400 μ l)和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 300 μ l)混合成 hTRA-8 F(ab')₂: DSPE-PEG3400-Mal=1: 1.5 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal

加 10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 20mM, 3 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 F(ab')₂ 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分割分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 33, 抗體濃度 16 μ g/ml, 磷脂質濃度 0.79mM, 抗體密度 0.011 莫耳%, 平均粒徑 66.4 $\pm$ 36.5 nm (PBS))。

【實施例 34】

(1) hTRA-8 F(ab')₂ 之硫醇化

於 F(ab')₂ 溶液(抗體濃度 3mg/ml, 20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH7.0) 將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司) 以 hTRA-8 F(ab')₂: Traut 試劑 = 1: 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾精製(柱: GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱; PBS) 而去除 Traut 試劑, 將 hTRA-8 F(ab')₂ 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2) 微脂粒之調製

仿實施例 32(2) 將微脂粒分散液用時調製。

(3) 抗體於微脂粒之結合

仿實施例 33(3), 得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 1 之編號 34, 抗體濃度 156 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.16mM, 抗體密度 0.073 莫耳%, 平均粒徑 68.0 $\pm$ 26.2 nm (PBS))。

【實施例 35】

(1) hTRA-8 F(ab')₂ 之硫醇化

於 F(ab')₂ 溶液 (抗體濃度 3mg/ml, 20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA pH7 反.7) 將溶於二甲亞砜之 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司) 以 hTRA-8 F(ab')₂ : Traut 試劑 = 1 : 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾精製 (柱: GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱; PBS) 而去除 Traut 試劑, 將 hTRA-8 F(ab')₂ 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2) 微脂粒之調製

仿實施例 32(2) 將微脂粒分散液用時調製。

(3) 抗體於微脂粒之結合

仿實施例 33(3), 得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 35, 抗體濃度 233 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.16mM, 抗體密度 0.109 莫耳%, 平均粒徑 107.7 $\pm$ 58.9 nm (PBS))。

【實施例 36】

(1) 小鼠抗 -hDR5 抗體 (MAB631) 之硫醇化

於小鼠抗 -hDR5 抗體 (MAB631) (R&D 系統公司 1mg) 加 20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH8.0, 使抗體濃度為 2mg/ml。將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司) 以 MAB631 : Traut 試劑 = 1 : 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾精製 (柱: GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱; PBS) 而去除 Traut 試劑

，將 MAB631 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 32(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 MAB631(1mg/ml, 450 μ l)與以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 750 μ l) 混合成 MAB631 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 20mM, 7.5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 MAB631 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)超濾來分離，得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成：表 2 之編號 36，抗體濃度 232 μ g/ml，磷脂質濃度 4.06mM，抗體密度 0.023 莫耳%，平均粒徑 105.0 ± 42.4 nm (PBS))。

【實施例 37】

仿實施例 36(1)將 MAB631 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 32(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 MAB631 (1mg/ml, 450 μ l)與以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 225 μ l)混合成 MAB631 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 1.5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對

DSPE-PEG3400-Mal 加 10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 20mM, $2.25 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 MAB631 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)超濾來分離, 得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 37, 抗體濃度 $141 \mu\text{g/ml}$, 磷脂質濃度 0.83mM, 抗體密度 0.068 莫耳%, 平均粒徑 $110.2 \pm 44.9 \text{ nm}$ (PBS))。

【實施例 38】

(1)小鼠抗 -hDR5 抗體 (MAB6311)之硫醇化

於小鼠抗 -hDR5 抗體 (MAB6311)(R&D 系統公司 1mg)加 20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH8.0, 使抗體濃度為 2mg/ml 。將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司)以 MAB6311: Traut 試劑=1: 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾精製(柱: GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱; PBS)而去除 Traut 試劑, 將 MAB6311 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 32(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 MAB6311 (1mg/ml , $360 \mu\text{l}$)和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, $600 \mu\text{l}$)混合成 MAB6311: DSPE-PEG3400-Mal=1: 5 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 當量之氫硫基

乙醇(和光純藥工業公司) 20mM, 6 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 MAB6311 以 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)超濾來分離, 得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 38, 抗體濃度 223 μ g/ml, 磷脂質濃度 3.02mM, 抗體密度 0.029 莫耳%, 平均粒徑 124.3 ± 44.6 nm (PBS))。

【實施例 39】

仿實施例 38(1)將 MAB6311 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 32(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合以如下工程施行。將上述 MAB6311(1mg/ml, 360 μ l)與 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液(2mM DPPC, 180 μ l)混合成 MAB6311 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 1.5(莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 20mM, 1.8 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 MAB631 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)超濾來分離, 得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 39, 抗體濃度 101 μ g/ml, 磷脂質濃度 0.54mM, 抗體密度 0.075 莫耳%, 平均粒徑 126.0 ± 49.9 nm (PBS))。

【實施例 40】

(1) 小鼠抗 -hFas 抗體 (DX2) 之硫醇化

將小鼠抗 -hFas 抗體 (DX2) (BD Biosciences Pharmingen 1.5mg) 以 (柱 ; GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱 ; 20mM 磷酸鹽 , 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH8.0) 來媒體交換 , 使抗體濃度為 0.64mg/ml。將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司) 以 DX2 : Traut 試劑 = 1 : 4 之莫耳比添加 , 於室溫 90 分之反應後 , 以凝膠過濾精製 (柱 ; GE HEALTHCARE 公司 NAP-5 脫鹽柱 ; PBS) 而去除 Traut 試劑 , 將 DX2 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2) 微脂粒之調製

仿實施例 32(2) 將微脂粒分散液用時調製。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 DX2 (0.25mg/ml, 1330 μ l) 和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 555 μ l) 混合成 DX2 : DSPE-PEG3400-Mal = 1 : 5 (莫耳比) 之比例 , 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 當量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 10mm, 11.1 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 MAB144 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 超濾來分離 , 得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成 : 表 1 之編號 40 , 抗體濃度 16 μ g/ml

， 磷 脂 質 濃 度 0.87mM， 抗 體 密 度 0.0073 莫 耳 %， 平 均 粒 徑 82.5 ± 33.6 nm (PBS))。

【 實 施 例 41】

(1)hTRA-8 全 體 之 硫 醇 化

於 hTRA-8 全 體 (抗 體 濃 度 3.87mg/ml, 20mm 磷 酸 鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH8.0)將 4mM Traut 試 劑 (2-亞 胺 基 噻 茂 烷 · 鹽 酸, Pierce 生 技 公 司)以 hTRA-8 : Traut 試 劑 =1 : 4 之 莫 耳 比 添 加, 於 室 溫 90 分 之 反 應 後, 以 凝 膠 過 濾 精 製 (柱 ; GE HEALTHCARE 公 司 PD-10 脫 鹽 柱 ; PBS)而 去 除 Traut 試 劑, 將 hTRA-8 全 體 之 一 部 分 之 離 胺 酸 殘 基 之 胺 基 予 以 硫 醇 化。

(2)微 脂 粒 之 調 製

將 二 軟 脂 醯 磷 脂 醯 膽 鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以 下 標 記 為 DPPC ; NOF 公 司, COATSOME MC-6060)、 膽 固 醇 (Sigma-Aldrich 公 司)、 分 子 量 約 2000 之 於 聚 乙 二 醇 之 末 端 具 有 馬 來 醯 亞 胺 基 之 聚 乙 二 醇 丁 二 醯 基 二 硬 脂 醯 磷 脂 醯 乙 醇 胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以 下 標 記 為 DSPE-PEG2000-Mal ; NOF 公 司, SUNBRIGHT DSPE-020MA) 及 Vybrant DiD 細 胞 標 識 溶 液 (1mM 於 溶 液 invitrogen)各 587.2mg、 206.4mg、 23.38mg、 0.8ml(莫 耳 比 100 : 66 : 1 : 0.1)量 取 於 茄 型 燒 瓶, 加 氯 仿 (關 東 化 學 公 司) 30ml 來 溶 解。 次 減 壓 蒸 除 氯 仿, 於 燒 瓶 內 壁 形 成 脂 質 之 薄 層。 於 此 脂 質 薄 層 加 PBS (20mM 磷 酸 鹽, 150mm NaCl, pH7.4) 80ml 來

懸浮，得微脂粒(DPPC 濃度：10mM)之粗分散液。次以此微脂粒分散液用 EmulsiFlex C-5(AVESTIN)、具有 50 nm 之孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

上述 hTRA-8 全體 (1mg/ml, 74.1ml)和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液(2mM DPPC, 123.5ml)混合成 hTRA-8 全體：DSPE-PEG2000-Mal=1：5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG2000-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 247 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體用超濾(LabScale TFF System(MILLIPORE 公司)、聚醚磺醯基膜(PelliconXL50,Biomax300,分劃分子量：300,000,MILLIPORE 公司)來分離，得分取抗體上之半胱氨酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 41，抗體濃度 1819 μ g/ml，磷脂質濃度 10.08mM，抗體密度 0.072 莫耳%，平均粒徑 91.8 nm (PBS))。

【實施例 42】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

將 F(ab')₂ 溶液(抗體濃度 5mg/ml, PBS)於 40mM(±)-二硫蘇糖醇((±)-Dithiothreitol，以下標記為 DTT；和光純藥工業公司)存在下，於室溫保溫 90 分，還原為 Fab'。凝膠過濾精製(柱：GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱；PBS)

而去除 DTT、得 hTRA-8 Fab'。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 41(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (5mg/ml, 6.6ml)和微脂粒分散液 (10mM DPPC, 12ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG2000-Mal=1:2 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG2000-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 0.12ml 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 以超濾(LabScale TFF 系統 (MILLIPORE 公司)、聚醚磺醯基膜(Pellicon XL 50, Biomax 300, 分割分子量: 300,000, MILLIPORE 公司)來分離，得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 2 之編號 42, 抗體濃度 1632 μ g/ml, 磷脂質濃度 10.08mM, 抗體密度 0.176 莫耳%, 平均粒徑 76.7 ± 22.9 nm (PBS))。

【實施例 43】

(1)hTRA-8 F(ab')₂之硫醇化

於 F(ab')₂ 溶液(抗體濃度 3.39mg/ml, 20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH8.0)將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司)以 hTRA-8 F(ab')₂ : Traut 試劑=1:4 之莫耳比添加，於室溫 90 分之反應後，以凝膠過濾精製(柱: GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱

；PBS)而去除 Traut 試劑，將 hTRA-8 F(ab')₂ 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 41(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 F(ab')₂ (1mg/ml, 24.4ml)與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 11ml) 混合成 hTRA-8 F(ab')₂ : DSPE-PEG2000-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG2000-Mal 加 10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 110 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 F(ab')₂ 以超濾(LabScale TFF 系統(MILLIPORE 公司))、聚醚磺醯基膜(Pellicon XL 50,Biomax 300,分割分子量：300,000,MILLIPORE 公司)來分離，得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 43，抗體濃度 1147 μ g/ml，磷脂質濃度 10.08mM，抗體密度 0.062 莫耳%，平均粒徑 83.7 $\pm$ 21.8 nm (PBS))。

【實施例 44】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二癸醯磷脂醯膽鹼(Didecanoyl Phosphatidylcholine，以下標記為 DDEPC；NOF 公司,COATSOME MC-1010)、膽固

醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 282.9mg、128.9mg、21mg (莫耳比 100:66:1) 量取於茄型燒瓶, 加氯仿 (關東化學公司) 30ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 50ml 來懸浮, 得微脂粒 (DDEPC 濃度: 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)、具有 50 nm 之孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.55ml) 和微脂粒分散液 (10mM DDEPC, 0.5ml) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分割分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之半胱氨酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒 (微脂粒組成: 表 2 之編號 44, 抗體濃度 426 μ g/ml

， 磷 脂 質 濃 度 2.31mM， 抗 體 密 度 0.200 莫 耳 %， 平 均 粒 徑 45.7 ± 18.1 nm (PBS))。

【 實 施 例 45】

(1)hTRA-8 Fab' 之 調 製

仿 實 施 例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用 時 調 製。

(2)微 脂 粒 之 調 製

將 二 月 桂 醯 磷 脂 醯 膽 鹼 (Dilauroyl Phosphatidylcholine， 以下 標 記 為 DLPC； NOF 公 司 ,COATSOME MC-2020)、 膽 固 醇 (Sigma-Aldrich 公 司)、 及 分 子 量 約 3400 之 於 聚 乙 二 醇 之 末 端 具 有 馬 來 醯 亞 胺 基 之 聚 乙 二 醇 丁 二 醯 基 二 硬 脂 醯 磷 脂 醯 乙 醇 胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine， 以下 標 記 為 DSPE-PEG3400-Mal； NOF 公 司 ,SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 310.9mg、 128.9mg、 21.7mg(莫 耳 比 100： 66： 1)量 取 於 茄 型 燒 瓶， 加 氯 仿 (關 東 化 學 公 司) 30ml 來 溶 解。 次 減 壓 蒸 除 氯 仿， 於 燒 瓶 內 壁 形 成 脂 質 之 薄 層。 於 此 脂 質 薄 層 加 PBS (20mM 磷 酸 鹽， 150mM NaCl,pH7.4) 50ml 而 懸 浮， 得 微 脂 粒 (DLPC 濃 度： 10mM)之 粗 分 散 液。 次 將 此 微 脂 粒 分 散 液 用 擠 壓 機 (The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公 司)、 具 有 50 nm 孔 大 小 之 聚 羧 酸 酯 膜 (Avanti POLAR LIPID 公 司)反 復 擠 壓 (extruded)， 使 微 脂 粒 之 粒 徑 整 齊。

(3)抗 體 於 微 脂 粒 之 結 合

將 上 述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.55ml)和 微 脂 粒 分 散 液 (10mM DLPC, 0.5ml)混 合 成 hTRA-8 Fab'： DSPE-PEG3400-

Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)超濾來分離，得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 45，抗體濃度 600 μ g/ml，磷脂質濃度 2.31mM，抗體密度 0.135 莫耳%，平均粒徑 65.6 ± 25.7 nm (PBS))。

【實施例 46】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

雙二十二醯磷脂醯膽鹼 (Didocosanoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DDOPC；Sigma-Aldrich 公司)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 45.12mg、12.89mg、2.17mg(莫耳比 100 : 66 : 1)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷

酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮, 得微脂粒(DDOPC 濃度: 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 由具有 400 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded)。其後用探針予以超音波(ULTRASONIC PROCESSOR SH-7600 SEIKO INSTRUMENT & ELECTRONICS LTD), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.55ml)和微脂粒分散液(10mM DDOPC, 0.5ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1: 5 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)超濾來分離, 得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 2 之編號 46, 抗體濃度 183 μ g/ml, 磷脂質濃度 2.11mM, 抗體密度 0.094 莫耳%, 平均粒徑 147.7 ± 56.7 nm (PBS))。

【實施例 47】

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。更仿實施例 44(2)將微脂粒分散液用時調製, 用具有 30 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded),

使微脂粒之粒徑整齊。

抗體於微脂粒之結合乃仿實施例 44(3)施行，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 47，抗體濃度 $458 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 7.29mM ，抗體密度 0.068 莫耳%，平均粒徑 $39.8 \pm 17.9 \text{ nm}$ (PBS))。

【實施例 48】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DPPC；NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司,SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 36.7mg 、 12.89mg 、 2.17mg (莫耳比 100：66：1)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽， 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮，得微脂粒(DPPC 濃度： 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公司)、具有 400 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公

司)反復擠壓(extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.55ml)和微脂粒分散液(10mM DPPC, 0.5ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)超濾來分離，得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 48，抗體濃度 124 μ g/ml，磷脂質濃度 1.14mM，抗體密度 0.118 莫耳%，平均粒徑 75.2 ± 9.1 nm、 232.2 ± 29.3 nm (PBS))。

【實施例 49】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

二芥醯磷脂醯膽鹼(Dierucoyl Phosphatidylcholine，以下標記為 DEPC；NOF 公司 COATSOME MC-2121AL)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal

；NOF 公司,SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 44.92mg、12.89 mg、2.17mg(莫耳比 100:66:1)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司)3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl ,pH7.4) 5ml 而懸浮，得微脂粒(DEPC 濃度: 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder,Avanti POLAR LIPID 公司)、具有 800 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.55ml)和微脂粒分散液(10mM DEPC, 0.5ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比)之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)超濾來分離，得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 2 之編號 49, 抗體濃度 94 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.50mM, 抗體密度 0.068 莫耳%, 平均粒徑 130.0 ± 43.2 nm (PBS))。

【實施例 50】

(1)hTRA-8 全體之調製

仿實施例 41(1)將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 36.7mg、12.89mg、6.3mg (莫耳比 100 : 66 : 3) 量取於茄型燒瓶, 加氯仿 (關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮, 得微脂粒 (DPPC 濃度 : 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 以具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 全體 (1mg/ml, 360 μ l) 和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 200 μ l) 混合成 hTRA-8 全體 : DSPE-PEG3400-Mal = 1 : 5 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之

氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 60mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 50, 抗體濃度 81 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.17mM, 抗體密度 0.027 莫耳%, 平均粒徑 57.3 nm (PBS))。

【實施例 51】

仿實施例 41(1)將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 50(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 全體 (1mg/ml, 1200 μ l) 和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 200 μ l) 混合成 hTRA-8 全體: DSPE-PEG3400-Mal=1: 1.5 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 60mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 51, 抗體濃度 156 μ g/ml, 磷脂質濃度 0.73mM, 抗體密度 0.084 莫耳%, 平均粒徑 60.8 nm (PBS))。

【實施例 52】

(1)hTRA-8 全體之調製

仿實施例 41(1)將 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 36.7mg、12.89mg、21mg (莫耳比 100:66:10) 量取於茄型燒瓶, 加氯仿 (關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮, 得微脂粒 (DPPC 濃度: 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 以具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 全體 (1mg/ml, 1200 μ l) 和以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 200 μ l) 混合成 hTRA-8 全體: DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫

醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 60mM, $6.67\mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 52, 抗體濃度 $161\mu\text{g/ml}$, 磷脂質濃度 0.66mM, 抗體密度 0.092 莫耳%, 平均粒徑 74.1nm (PBS))。

【實施例 53】

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。更仿實施例 50(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml , 0.44ml)與以 PBS 稀釋 5 倍之微脂粒分散液 (2mM DPPC, 0.2ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1: 1.5 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 60mM, $6.67\mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)超濾來分離, 得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 53, 抗體濃度 $125\mu\text{g/ml}$, 磷脂質濃度 0.45mM, 抗體密度 0.297 莫耳%)

，平均粒徑 53.9 nm (PBS))。

【實施例 54】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DPPC；NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 2000 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG2000-Mal；NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-020MA) 各 36.7mg、12.89mg、1.47mg (莫耳比 100 : 66 : 1) 量取於茄型燒瓶，加氯仿 (關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽，150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮，得微脂粒 (DPPC 濃度：10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)、具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.44ml) 與微脂粒分散液 (10mM DPPC, 0.4ml) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG2000-Mal=1 : 5 (莫耳比) 之比例，令抗體之硫醇基與微脂粒上之

PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG2000-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 4 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)超濾來分離,得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成:表 2 之編號 54, 抗體濃度 354 μ g/ml, 磷脂質濃度 4.54mM, 抗體密度 0.085 莫耳%, 平均粒徑 106.5 ± 33.4 nm (PBS))。

【實施例 55】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 5000 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG5000-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-050MA) 各 36.7mg、12.89mg、2.99mg(莫耳比 100:66:1)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮, 得微脂

粒 (DPPC 濃度 : 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 以具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.66ml) 和微脂粒分散液 (10mM DPPC, 0.6ml) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG5000-Mal=1 : 5 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG2000-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 6 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成: 表 2 之編號 55, 抗體濃度 128 μ g/ml, 磷脂質濃度 3.02mM, 抗體密度 0.046 莫耳%, 粒徑 84.9 ± 36.9 nm (PBS))。

【實施例 56】

(1) hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1) 將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2) 微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之

於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 36.7mg、4.84mg、2.17mg (莫耳比 100 : 25 : 1) 量取於茄型燒瓶, 加氯仿 (關東化學公司) 3ml 而溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮, 得微脂粒 (DPPC 濃度 : 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 以具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.44ml) 和微脂粒分散液 (10mM DPPC, 0.4ml) 混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal = 1 : 5 (莫耳比) 之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇 (和光純藥工業公司) 100mM, 4 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分割分子量 300,000) 超濾來分離, 得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成 : 表 2 之編號 56, 抗體濃度 214 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.95mM, 抗體密度 0.156 莫耳 %

，粒徑 78.9 ± 41.4 nm (PBS))。

【實施例 57】

(1) hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2) 微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DPPC；NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA) 各 36.7mg、19.35mg、2.17mg (莫耳比 100 : 100 : 1) 量取於茄型燒瓶，加氯仿 (關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 而懸浮，得微脂粒 (DPPC 濃度 : 10mM) 之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機 (The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)，以具有 50 nm 孔大小之聚羧酸酯膜 (Avanti POLAR LIPID 公司) 反復擠壓 (extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3) 抗體於微脂粒之結合

仿實施例 56(3)結合，得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。(微脂粒組成：表 2 之編號 57，抗體濃度 $456 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 4.88mM，抗

體密度 0.084 莫耳 %，粒徑 89.1 ± 31.9 nm (PBS))。

【實施例 58】

(1)hTRA-8 scFv 之調製

將 hTRA-8 scFv 5B (緩衝液；50mM Tris-鹽酸 (pH7.5), 500mM NaCl, 10% 甘油, 10mM CHAPS, 1mM DTT)用凝膠過濾精製(柱；GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱)，緩衝液交換為磷酸鹽緩衝液，500mM NaCl, pH7.4。

(2)微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼 (L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline，以下標記為 DPPC；NOF 公司 COATSOME MC-6060)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine，以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal；NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 22mg、7.73mg、1.7mg(莫耳比 100：66：1.5)量取於茄型燒瓶，加氯仿(關東化學公司) 3ml 而溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 3ml 之磷酸鹽緩衝液，500mM NaCl, pH7.4 而懸浮，得微脂粒(DPPC 濃度：10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)，由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 scFv ($125\mu\text{g/ml}$, $800\mu\text{l}$)和微脂粒分散液 (10mM DPPC, $200\mu\text{l}$)混合成 hTRA-8 scFv : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 7.5 (莫耳比)之比例,令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $2\mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 scFv 以凝膠過濾層析(AKTA explorer 10S(GE HEALTHCARE 公司);柱(GE HEALTHCARE 公司,HiLoad Superdex 200 16/60 prep 級); HEPES 緩衝液 ($\text{pH}7.4$); 4°C ; 2ml/分 ; 檢出波長 $\text{UV}280\text{nm}$)來分離,分取免疫微脂粒劃份($36\text{-}48\text{ml}$ 之劃份)。用 Amicon Ultra (MILLIPORE 公司,分劃分子量 $50,000$)施行超濾濃縮,得抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成:表 2 之編號 58,抗體濃度 $14\mu\text{g/ml}$, 磷脂質濃度 1.3mM , 抗體密度 0.025 莫耳%, 平均粒徑 $91\pm16\text{ nm}$ (磷酸鹽緩衝液, 500mM NaCl, $\text{pH}7.4$))。

【實施例 59】

· 重組體可溶性 TRAIL 之硫醇化

將 Recombinant soluble TRAIL (Peprotech 公司)(以下標記為 rsTRAIL(P))($150\mu\text{g}$)溶解於 10mM 磷酸鈉, 140mM NaCl, 1mM DTPA, $\text{pH}7.4$ 、調製為 2mg/mL 。將溶解於二甲亞砷之 $400\mu\text{M}$ Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸,Pierce 生技公司)以 rsTRAIL(P): Traut 試劑=1 : 1 之莫耳比添加,於室溫 90 分之反應後,以用 Microcon (MILLIPORE 公司

,分劃分子量 3,000; PBS,pH7.4)之超濾(1000 倍稀釋)去除 Traut 試劑,將 rsTRAIL(P)之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

· 微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)rsTRAIL(P)於微脂粒之結合反應

rsTRAIL(P)於微脂粒之結合乃如下施行。將上述 rsTRAIL(P) (1mg/ml, 19.6 μ l)和微脂粒分散液(10mM DPPC, 50 μ l)混合成 rsTRAIL(P): DSPE-PEG3400-Mal=1:15 (莫耳比)之比例,令 rsTRAIL(P)之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。rsTRAIL(P)未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 10mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 rsTRAIL(P)用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得 rsTRAIL(P)上之離胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成:表 2 之編號 59, 蛋白濃度 6 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.8mM, rsTRAIL(P)密度 0.011 莫耳%, 平均粒徑 62 nm (PBS, pH7.4))。

【實施例 60】

· rsTRAIL(P)之硫醇化

仿實施例 59 將 rsTRAIL(P)之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)rsTRAIL(P)於微脂粒之結合反應

rsTRAIL 於微脂粒之結合乃如下施行。將上述 rsTRAIL(P) (1mg/ml, 58.8 μ l)和微脂粒分散液(10mM DPPC, 50 μ l)混合成 rsTRAIL(P) : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例，令 rsTRAIL(P)之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。rsTRAIL(P)未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 10mM, 5 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 rsTRAIL(P)用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得 rsTRAIL(P)上之離胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 60，蛋白濃度 9 μ g/ml，磷脂質濃度 1.1mM，rsTRAIL(P)密度 0.024 莫耳%，平均粒徑 73 nm (PBS, pH7.4))。

【實施例 61】

(1)重組體可溶性 TRAIL 之硫醇化

將 Recombinant soluble TRAIL (Biodesign)(以下標記為 rsTRAIL(B))(200 μ g) 溶解於 10mM 磷酸鈉，140mM NaCl,1mM DTPA, pH7.4，調製成 2mg/mL。將溶解於二甲亞砷之 400 μ M Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸,Pierce 生技公司) rsTRAIL(B) : Traut 試劑=1 : 1 之莫耳比添加，於室溫 90 分之反應後，以 Microcon (MILLIPORE 公司,分劃

分子量 3,000；PBS,pH7.4)超濾(1000 倍稀釋)而去除 Traut 試劑，將 rsTRAIL(B)之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)rsTRAIL(B)於微脂粒之結合反應

rsTRAIL(B)於微脂粒之結合乃如下施行。將上述 rsTRAIL(B)(1mg/ml, 47 μ l)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 40 μ l)混合成 rsTRAIL：DSPE-PEG3400-Mal=1：5 (莫耳比)之比例，將 rsTRAIL(B)之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。rsTRAIL(B)未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 10m M, 4 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 rsTRAIL(B)用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得 rsTRAIL(B)上之離胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 61，蛋白濃度 4 μ g/ml、磷脂質濃度 1.2mM，rsTRAIL 密度 0.009 莫耳%，平均粒徑 63 nm (PBS, pH7.4))。

【實施例 62】

(1)小鼠抗-hDR4 抗體(m2E12)之硫醇化

於依國際公開小冊 WO2003/37913 記載之融合瘤 2E12 產生之係屬小鼠抗人 DR4 抗體之 m2E12(抗體濃度 1.8mg/ml, 20mM 磷酸鹽 緩衝液, 150mM NaCl, 1mM DTPA, pH8.0)，

將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸,Pierce 生技公司)以 hTRA-8 : Traut 試劑=1 : 4 之莫耳比添加,於室溫 90 分之反應後,以凝膠過濾層析(柱:GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱;PBS, pH7.4)去除 Traut 試劑,將 m2E12 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇。

(2)微脂粒之調製

仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 m2E12(0.77mg/ml, 97.4 μ l)和微脂粒分散液(2mM DPPC, 1000 μ l)混合成 m2E12 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 40 (莫耳比)之比例,將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 m2E12 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成:表 2 之編號 62, 抗體濃度 25 μ g/ml, 磷脂質濃度 1.7mM, 抗體密度 0.0059 莫耳%, 平均粒徑 68 ± 25 nm (PBS, pH7.4))。

【實施例 63】

仿實施例 62 將 m2E12 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 m2E12

(0.77mg/ml, 195 μ l)和微脂粒分散液(2mM DPPC, 1000 μ l)混合成 m2E12 全體：DSPE-PEG3400-Mal=1：20 (莫耳比)之比例，將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 m2E12 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 63，抗體濃度 43 μ g/ml，磷脂質濃度 1.4mM，抗體密度 0.0122 莫耳%，平均粒徑 53 ± 24 nm (PBS, pH7.4))。

【實施例 64】

仿實施例 62 將 m2E12 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。上述 m2E12 (0.77mg/ml, 390 μ l)與微脂粒分散液(2mM DPPC, 1000 μ l)混合成 m2E12：DSPE-PEG3400-Mal=1：10 (莫耳比)之比例，將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 m2E12 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得抗體上之離

胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 64，抗體濃度 $72\mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 1.2mM ，抗體密度 0.0247 莫耳%，平均粒徑 $63\pm 26\text{ nm}$ (PBS, pH7.4))。

【實施例 65】

仿實施例 62 將 m2E12 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。上述 m2E12 (0.77mg/ml , $780\mu\text{l}$)和微脂粒分散液(2mM DPPC, $1000\mu\text{l}$)混合成 m2E12 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例，將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $2\mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 m2E12 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 $300,000$)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 65，抗體濃度 $159\mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 1.2mM ，抗體密度 0.0510 莫耳%，平均粒徑 $65\pm 27\text{ nm}$ (PBS, pH7.4))。

【實施例 66】

仿實施例 62 將 m2E12 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 1 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。上述 m2E12

(0.77mg/ml, 1950 μ l)與微脂粒分散液(2mM DPPC, 1000 μ l)混合成 m2E12 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 2 (莫耳比)之比例, 將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 m2E12 用 VIVASPIN (Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除。得抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成: 表 2 之 No.66, 抗體濃度 281 μ g/ml, 磷脂質濃度 0.86mM, 抗體密度 0.1296 莫耳%, 平均粒徑 76 ± 29 nm (PBS, pH7.4))。

【實施例 67】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

將雙二十二醯磷脂醯膽鹼 (Didocosanoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DDOPC; Sigma-Aldrich 公司)、膽固醇 (Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 45.12mg、12.89mg、2.17mg(莫耳比 100 : 66 : 1)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關

東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿，於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 來懸浮，得微脂粒(DDOPC 濃度：10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司)，以具有 800 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.66ml)與微脂粒分散液(10mM DDOPC, 0.6ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 5 (莫耳比)之比例、抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 6 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)之超濾來分離，得分取抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 67，抗體濃度 77 μ g/ml，磷脂質濃度 0.15mM，抗體密度 0.556 莫耳%，平均粒徑 896.8 ± 70.8 nm (PBS))。

【實施例 68】

(1)hTRA-8 Fab' 之調製

仿實施例 42(1)將 hTRA-8 Fab' 用時調製。

(2)微脂粒之調製

將二芥醯磷脂醯膽鹼(Dierucoyl Phosphatidylcholine, 以下標記為 DEPC; NOF 公司 COATSOME MC-2121AL)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 44.92mg、12.89mg、2.17mg(莫耳比 100:66:1)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 3ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 5ml 來懸浮, 得微脂粒(DEPC 濃度: 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 以具有 100nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反復擠壓(extruded), 使微脂粒之粒徑整齊。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 Fab' (1mg/ml, 0.66ml)與微脂粒分散液(10mM DEPC, 0.6ml)混合成 hTRA-8 Fab' : DSPE-PEG3400-Mal=1:5 (莫耳比)之比例, 令抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 6 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 Fab' 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000)之超濾來分離, 得分取

抗體上之半胱胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 68，抗體濃度 $393 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 5.64mM ，抗體密度 0.076 莫耳%，平均粒徑 $91.7 \pm 33.7 \text{ nm}$ (PBS))。

【實施例 69】

(1)hTRA-8 F(ab')₂ 之硫醇化

仿實施例 43(1)將 F(ab')₂ 之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。更仿實施例 41(2)將微脂粒分散液用時調製。

抗體於微脂粒之結合乃以如下工程施行。將上述 hTRA-8 F(ab')₂ (1mg/ml , 2.686ml)與微脂粒分散液(10mM DPPC, 11ml)混合成 hTRA-8 F(ab')₂ : DSPE-PEG2000-Mal=1 : 45 (莫耳比)之比例，將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基反應。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG2000-Mal 加 10 當量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $110 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 F(ab')₂ 用超濾 (LabScale TFF 系統 (MILLIPORE 公司))、聚醚磺醯基膜 (Pellicon XL 50, Biomax 300, 分割分子量 : $300,000$, MILLIPORE 公司)來分離，得分取抗體上之離胺酸殘基與微脂粒之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒(微脂粒組成：表 2 之編號 69，抗體濃度 $128 \mu\text{g/ml}$ ，磷脂質濃度 10.08mM ，抗體密度 0.0069 莫耳%，平均粒徑 $87.6 \pm 18.1 \text{ nm}$ (PBS))。

【實施例 70】

(1) 2E12 全體及 hTRA-8 全體之硫醇化

於 2E12 全體及 hTRA-8 全體(抗體濃度 1.8mg/ml, 20mM 磷酸鹽緩衝液, 150mM NaCl, 2mM DTPA, pH8.0)將 4mM Traut 試劑 (2-亞胺基噻茂烷·鹽酸, Pierce 生技公司)以各抗體(2E12, hTRA-8): Traut 試劑=1: 4 之莫耳比添加, 於室溫 90 分之反應後, 以凝膠過濾層析(柱: GE HEALTHCARE 公司 PD-10 脫鹽柱; PBS, pH7.4)而去除 Traut 試劑, 將 2E12 全體及 hTRA-8 全體之一部分之離胺酸殘基之胺基予以硫醇化。

(2) 微脂粒之調製

將二軟脂醯磷脂醯膽鹼(L- α -Dipalmitoyl Phosphatidyl choline, 以下標記為 DPPC; NOF 公司, COATSOME MC-6060)、膽固醇(Sigma-Aldrich 公司)、及分子量約 3400 之於聚乙二醇之末端具有馬來醯亞胺基之聚乙二醇丁二醯基二硬脂醯磷脂醯乙醇胺(poly (ethylene glycol) succinyl distearoyl phosphatidyl ethanolamine, 以下標記為 DSPE-PEG3400-Mal; NOF 公司, SUNBRIGHT DSPE-034MA)各 44mg、15.4mg、2.6mg(莫耳比 100: 66: 1)量取於茄型燒瓶, 加氯仿(關東化學公司) 6ml 來溶解。次減壓蒸除氯仿, 於燒瓶內壁形成脂質之薄層。於此脂質薄層加 PBS (20mM 磷酸鹽, 150mM NaCl, pH7.4) 6ml 來懸浮, 得微脂粒(DPPC 濃度: 10mM)之粗分散液。次將此微脂粒分散液用擠壓機(The Mini-Extruder, Avanti POLAR LIPID 公司), 由具有 100 nm 孔大小之聚羧酸酯膜(Avanti POLAR LIPID 公司)反

復擠壓(extruded)，使微脂粒之粒徑整齊。將此 10mM DPPC 分散液以 PBS, pH7.4 調製為 2mM。

(3) 抗體於微脂粒之結合

將上述 2E12 全體 (0.77mg/ml, 195 μ l) 和微脂粒分散液 (2mM DPPC, 1000 μ l) 混合成 2E12 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 20 (莫耳比) 之比例，於室溫反應 2 小時，使抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基結合。將未反應之 m2E12 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除，將分散液之體積調製為 1ml。於此階段採集分散液之一部分，定量結合於微脂粒之 2E12 之蛋白質量及微脂粒之脂質量。次將上述 hTRA-8 全體 (0.77mg/ml, 584 μ l) 與上述微脂粒分散液混合成 hTRA-8 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=3 : 20 (莫耳比) 之比例，於室溫反應 2 小時，使抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基結合。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 hTRA-8 全體用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分劃分子量 300,000) 之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除，得 2 種抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。將本免疫微脂粒分散液之全抗體濃度及脂質濃度定量，由全抗體量及 2E12 之抗體量算出各別之抗體量。(微脂粒組成：表 2 之編號 70，抗體濃度 2E12 : 40 μ g/ml, hTRA-8

: $139 \mu\text{g/ml}$, 抗體比率 $2\text{E}12 : \text{hTRA-8}=22 : 78$, 磷脂質濃度 1.15mM , 全抗體密度 0.062 莫耳 % (PBS))

【實施例 71】

仿實施例 70 之(1)施行 $2\text{E}12$ 全體及 hTRA-8 全體之硫醇化。更仿實施例 70 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 全體 (0.77mg/ml , $195 \mu\text{l}$)和微脂粒分散液 (2mM DPPC, $1000 \mu\text{l}$)混合成 hTRA-8 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=1 : 20 (莫耳比)之比例 , 於室溫反應 2 小時 , 將抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基結合。未反應之 hTRA-8 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除 , 將分散液之體積調製為 1ml 。於此階段採集分散液之一部分 , 將結合於微脂粒之 hTRA-8 之蛋白質量及微脂粒之脂質量定量。次將上述 $2\text{E}12$ 全體 (0.77mg/ml , $584 \mu\text{l}$)和上述微脂粒分散液混合成 $2\text{E}12$ 全體 : DSPE-PEG3400-Mal=3 : 20 (莫耳比)之比例 , 於室溫反應 2 小時 , 使抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基結合。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM , $2 \mu\text{l}$ 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 $2\text{E}12$ 全體用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除 , 得 2 種抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。

將本免疫微脂粒分散液之全抗體濃度及脂質濃度定量，由全抗體量及 hTRA-8 之抗體量算出各別之抗體量。(微脂粒組成：表 2 之編號 71，抗體濃度 2E12：93 μ g/ml，hTRA-8：74 μ g/ml，抗體比率 2E12：hTRA-8=56：44，磷脂質濃度 1.14mM，全抗體密度 0.058 莫耳 % (PBS))

【實施例 72】

仿實施例 70 之(1)施行 2E12 全體及 hTRA-8 全體之硫醇化。更仿實施例 70 之(2)將微脂粒分散液用時調製。

(3)抗體於微脂粒之結合

將上述 hTRA-8 全體 (0.77mg/ml, 78 μ l)與微脂粒分散液 (2mM DPPC, 1000 μ l)混合成 hTRA-8 全體：DSPE-PEG3400-Mal=1：50 (莫耳比)之比例，於室溫反應 2 小時，使抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基結合。將未反應之 hTRA-8 用 VIVASPIN(Sartorius Mechatronics, 分割分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除，將分散液之體積調製為 1ml。於此階段採集分散液之一部分，將於微脂粒結合之 hTRA-8 之蛋白質量及微脂粒之脂質量定量。次將上述 2E12 全體 (0.77mg/ml, 701 μ l)和上述微脂粒分散液混合成 2E12 全體：DSPE-PEG3400-Mal=9：50 (莫耳比)之比例，於室溫反應 2 小時，使抗體之硫醇基與微脂粒上之 PEG 鏈末端之馬來醯亞胺基結合。抗體未結合之馬來醯亞胺基乃對 DSPE-PEG3400-Mal 加 10 等量之氫硫基乙醇(和光純藥工業公司) 100mM, 2 μ l 而於室溫反應 30 分來惰性化。未反應之 2E12 全體用

VIVASPIN(Sartorius Mechatronics,分劃分子量 300,000)之超濾反復施行至原液稀釋 1000 倍來去除，得 2 種抗體上之離胺酸殘基與微脂粒上之 PEG 末端結合之本免疫微脂粒。將本免疫微脂粒分散液之全抗體濃度及脂質濃度定量，由全抗體量及 hTRA-8 之抗體量算出各別之抗體量。(微脂粒組成：表 2 之編號 72，抗體濃度 2E12：155 μ g/ml、hTRA-8：39 μ g/ml，抗體比率 2E12：hTRA-8=80：20，磷脂質濃度 1.57mM，全抗體密度 0.049 莫耳% (PBS))。

於實施例 32 至 72 製作之免疫微脂粒之成分組成如表 2。

【表 2】

實施例編號	蛋白質	脂質組成	抗體密度 (mol%)
32	E	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.031
33	E	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.011
34	E	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.073
35	E	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.109
36	G	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.023
37	G	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.068
38	H	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.029
39	H	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.075
40	I	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.0073
41	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ = 100 : 66 : 1	0.072
42	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ = 100 : 66 : 1	0.176
43	E	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ = 100 : 66 : 1	0.062
44	A	DDEPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.2
45	A	DLPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.135
46	A	DDOPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.094
47	A	DDEPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.068
48	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.118
49	A	DEPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.068
50	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 3	0.027
51	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 3	0.084
52	B	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 10	0.092
53	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 3	0.297
54	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ = 100 : 66 : 1	0.085
55	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₅₀₀₀ = 100 : 66 : 1	0.046
56	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 25 : 1	0.158
57	A	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 100 : 1	0.084
58	F	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.025
59	K	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.011
60	K	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.024
61	L	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.009
62	J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.006
63	J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.012
64	J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.025
65	J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.051
66	J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.13
67	A	DDOPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.556
68	A	DEPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.076
69	E	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.0069
70	B & J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.062 (J : B = 22 : 78)
71	B & J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.058 (J : B = 56 : 44)
72	B & J	DPPC : Chol : DSPE-PEG ₃₄₀₀ = 100 : 66 : 1	0.049 (J : B = 80 : 20)

A : hTRA-8 Fab', B : hTRA-8 Fullbody, C : hHFE7A Fab', D : hHFE7A Fullbody (全體)
 E : hTRA-8 F(ab')₂, F : hTRA-8 scFv, G : MAB631 Fullbody, H : MAB6311 Fullbody
 I : DX2 Fullbody, J : 2E12 Fullbody, K : rsTRAIL (peprotech), L : rsTRAIL (biodesign)

【試驗例 1】

測定實施例 1、2、3 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

將 Jurkat 細胞依錐藍染色法計數後，以含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 DMEM 培養基(Invitrogen 公司製，以下稱 DMEM 培養基)調製成 1×10^5 cells/ml。預先以 DMEM 培養基調製抗體濃度為 2000、200、20、2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1 ng/ml)之免疫微脂粒溶液或以 $1 \mu\text{g/ml}$ 之二次抗體溶液(山羊抗人 IgG Fc 抗體，MPBiomedicals 公司製)調製為 2000、200、20、2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1 ng/ml)之 hTRA-8 溶液以一群 3 連各 $50 \mu\text{l}$ 添加於 96 穴微板(康寧公司製)，將細胞懸浮液各播種 $50 \mu\text{l}$ (5×10^3 cells)。於 37°C 、5%二氧化碳存在下將各板培養 72 小時，測定各穴之 ATP 量。ATP 量測定用蟲螢光素酶發光試藥(CellTiter Glo, Promega 公司製)，依添附之規格書測定。也即將由細胞溶解成分和發光基質成分而成之試液於板之各穴各添加 $100 \mu\text{l}$ 、攪拌後，將上清於 96 穴白色微板(康寧公司製)各移 $100 \mu\text{l}$ ，將各穴之發光以螢光計(分子裝置公司製)測定。將添加 DMEM 培養基和細胞懸浮液之穴作為陰性對照穴，以只添加 DMEM 培養基之穴為背景穴，將各穴之細胞生存率依下式算出。

細胞生存率(%) = $\frac{\text{被驗穴之發光強度} - \text{背景穴之平均發光強度}}{\text{陰性對照穴之平均發光強度} - \text{背景穴之平均發光強度}} \times 100$

其結果如第 1 圖。實施例 1、2、3 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。實施例 2 或 3 製作之免疫微脂粒於 1、10、100、1000 ng/ml 呈示 20%以下細胞生存率。

【試驗例 2】

測定實施例 19、20、21 調製之免疫微脂粒之對 A375 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對人惡性黑色腫細胞株 A375 細胞之細胞凋零誘導活性。但免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20 ng/ml(最終濃度 1000、100、10 ng/ml)、以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 2 圖。實施例 19、20、21 調製之免疫微脂粒對 A375 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。對 A375 細胞雖比 hTRA-8 呈示之細胞凋零誘導活性為弱，但可將 hTRA-8 予以免疫微脂粒化來增強細胞凋零誘導活性。實施例 19、20、21 製作之免疫微脂粒於 100 ng/ml 呈示 80%以下之細胞生存率，於 1000 ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率。實施例 19 製作之免疫微脂粒於 1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 3】

測定實施例 8、10、12、14、16 調製之免疫微脂粒對 A375 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對人惡性黑色腫細胞株 A375 細胞之細胞凋零誘導活性。但免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調

製為抗體濃度 2000、200、20 ng/ml(最終濃度 1000、100、10 ng/ml)，以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 3 圖。實施例 8、10、12、14、16 調製之免疫微脂粒對 A375 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。對 A375 細胞雖比 hTRA-8 呈示之細胞凋零誘導活性為弱，但可將 hTRA-8 予以免疫微脂粒化來增強細胞凋零誘導活性。實施例 8、10、12、14、16 製作之免疫微脂粒於 1000 ng/ml 呈示 60%以下之細胞生存率。實施例 8、16 製作之免疫微脂粒於 1000 ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率。實施例 8 製作之免疫微脂粒於 1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 4】

測定實施例 7、9、11、13、15 調製之免疫微脂粒對 A2058 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對人惡性黑色腫細胞株 A2058 細胞之細胞凋零誘導活性。但免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20 ng/ml(最終濃度 1000、100、10 ng/ml)，以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 4 圖。實施例 7、9、11、13、15 調製之免疫微脂粒對 A2058 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。對 A2058 細胞雖比 hTRA-8 呈示之細胞凋零誘導活性為弱，但可將 hTRA-8 予以免疫微脂粒化來增強細胞凋零誘導活性。實施例 9、11、15 製作之免疫微脂粒於 100 ng/ml 呈示 60%以下之細胞生存率。

實施例 11、15 製作之免疫微脂粒於 100 ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率。實施例 15 製作之免疫微脂粒於 100 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。實施例 7、9、11、13、15 製作之免疫微脂粒於 1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 5】

測定實施例 26、27、28、29、30、31 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基用含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hHFE7A 乃調製為抗體濃度 26、2.6、0.26、0.026 nM(最終濃度 13、1.3、0.13、0.013 nM)。將 hHFE7A 交聯之二次抗體(山羊抗人 IgG Fc 抗體)使用生技源公司製者。

其結果如第 5 圖。實施例 26、27、28、29、30、31 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示與以二次抗體交聯之 hHFE7A 同等或更強之細胞凋零誘導活性。

【試驗例 6】

測定實施例 4、17、18 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

將 Jurkat 細胞依錐藍染色法計數後，以含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)調製成 2×10^5 cells/ml。預先以 RPMI 培養基調製抗體濃度為

2000、200、20、2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1 ng/ml)之免疫微脂粒溶液或以 1 μ g/ml 之二次抗體溶液(山羊抗人 IgG Fc 抗體、MPBiomedicals 公司製)調製為 2000、200、20、2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1 ng/ml)之 hTRA-8 溶液以一群 3 連各 50 μ l 添加於 96 穴微板(康寧公司製)，將細胞懸浮液各播種 50 μ l (1×10^4 cells)。於 37℃、5%二氧化碳存在下將各板培養 72 小時，測定各穴細胞之細胞內脫氫酵素之活性、算出生細胞數。細胞內脫氫酵素活性之測定使用 WST-8 試藥(生細胞數測定試藥 SF, nacalai tesque)，依添附之規格書施行測定。也即將 WST-8 於各穴添加 10 μ l，將 WST-8 由細胞內脫氫酵素還原而生成之甲氈之量，將甲氈於 450 nm 之吸光度以吸光度計(分子裝置公司製)測定來定量。以添加 RPMI1640 培養基和細胞懸浮液之穴為陰性對照穴，以只添加 RPMI1640 培養基之穴為背景穴，將各穴之細胞生存率依如下式算出。

細胞生存率(%)=(被驗穴之吸光度－背景穴之平均吸光度)/(陰性對照穴之平均吸光度－背景穴之平均吸光度) $\times 100$

其結果如第 6 圖。實施例 4、17、18 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。實施例 4,17,18 製作之免疫微脂粒於 10 ng/ml 呈示 60%以下之細胞生存率，於 100 ng/ml 或 1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 7】

實施例 22、23 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之測定

依試驗例 1 記載之方法測定對白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基用含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2、0.02 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1、0.01 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 7 圖。實施例 22、23 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。實施例 22,23 製作之免疫微脂粒於 0.1 ng/ml 呈示 60%以下之細胞生存率，於 1、10、100、1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 8】

測定實施例 24 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 200、20、2、0.2 ng/ml(最終濃度 100、10、1、0.1ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 8 圖。實施例 24 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零

誘導活性。實施例 24 製作之免疫微脂粒於 1 ng/ml 呈示 60%以下之細胞生存率，於 10 ng/ml 或 100 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 9】

測定實施例 25 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 200、20、2、0.2 ng/ml(最終濃度 100、10、1、0.1 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 9 圖。實施例 25 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。實施例 25 製作之免疫微脂粒於 0.1 ng/ml 呈示 70%以下之細胞生存率，於 1、10、100ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 10】

測定實施例 5、6 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定對白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 200、20、2、

0.2 ng/ml(最終濃度 100、10、1、0.1 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 10 圖。實施例 5、6 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。實施例 5 製作之免疫微脂粒於 0.1 ng/ml 呈示 70%以下之細胞生存率。實施例 6 製作之免疫微脂粒於 0.1 ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率。又實施例 5、6 製作之免疫微脂粒於 1、10、100 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 11】

測定實施例 3、20 調製之免疫微脂粒對關節風濕患者由來滑膜細胞之細胞凋零誘導活性

將凍結關節風濕患者由來滑膜細胞(細胞應用公司)懸浮於滑膜細胞增殖培養基(細胞應用公司製，以下稱培養基)，以錐藍染色法計數後，以培養基調製成 2×10^4 cells/ml。於 96 穴微板(康寧公司製)將細胞懸浮液各播種 $50 \mu\text{l}$ (1×10^3 cells)。同時將以培養基稀釋抗體濃度為 2000、200、20、2 ng/ml 之免疫微脂粒溶液及 hTRA-8 各 $50 \mu\text{l}$ 於板添加。於 37°C 、5%二氧化碳存在下培養一晚後，測定 ATP 量。ATP 量測定使用蟲螢光素酶發光試藥(Cell Titer Glo, Promega 公司製)，依添附之規格書測定。也即將由細胞溶解成分和發光基質成分而成之試液於板之各穴各添加 $100 \mu\text{l}$ 、攪拌後，將上清於 96 穴白色微板(康寧公司製)各移 $100 \mu\text{l}$ ，將各穴之發光以螢光計(分子裝置公司製)測定

。免疫微脂粒溶液代之以培養基添加之穴作為陰性對照穴，以不播種細胞而只添加培養基之穴為背景穴，將各穴之細胞生存率依下式算出。

細胞生存率(%)=(被驗穴之發光強度－背景穴之平均發光強度)/(陰性對照穴之平均發光強度－背景穴之平均發光強度) $\times 100$

其結果如第 11 圖。實施例 3、20 之免疫微脂粒對關節風濕患者由來滑膜細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性。實施例 3 製作之免疫微脂粒於 1000 ng/ml 呈示 50%以下之細胞生存率。

【試驗例 12】

測定實施例 5 調製之免疫微脂粒於人大腸癌株 COLO 205 移植裸小鼠之抗腫瘤活性

檢討實施例 5 調製之免疫微脂粒之活體內抗腫瘤活性。將依檢疫確認未檢出小鼠病原微生物之人大腸癌株 COLO 205(購自 American Type Culture Collection) 2×10^6 cells 移植裸小鼠 BALB/cA Jcl-nu(日本可麗兒公司)之腋窩部皮下。將實施例 5 之免疫微脂粒於投與即前以生理食鹽水(大塚製藥)稀釋為抗體濃度 1 及 0.33mg/ml。對移植 7 日後之腫瘤生著之 COLO 205 載癌小鼠開始投與實施例 5 之免疫微脂粒。具體而言，於第 7 及 9、11、14、16、18、21、23、25 日於載癌小鼠之尾靜脈內每小鼠體重 10g 投與 0.1ml 之微脂粒溶液。

將移植腫瘤之長徑及短徑用電子數位尺(CD-15C：三豐公

司)每週計測 2-3 回。以如下計算式求出腫瘤體積。

$$\text{腫瘤體積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{短徑}^2 (\text{mm}) \times \text{長徑 (mm)}$$

又算出各個體之腫瘤增殖速度 (mm^3/day)、用其值施行 Dunnett 檢定來檢定統計學上顯著差異。又 P 值為 0.05 未滿時，視為群間有顯著差異。

試驗之結果如第 12 圖。實施例 5 之免疫微脂粒呈示用量依存之抗腫瘤活性，10mg/kg 之免疫微脂粒由統計學顯著差異呈示抗腫瘤活性。

【試驗例 13】

測定實施例 32、33、34、35 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2、0.02 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1、0.01 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 13 圖。實施例 32、33、34、35 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 0.1 ng/ml 呈示 70%以下之細胞生存率，於 1、10、100、1000 ng/ml 呈示 30%以下之細胞生存率。

【試驗例 14】

測定實施例 44、45、46、47、48、49 調製之免疫微脂粒對

Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2、0.02 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1、0.01 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 14 圖。實施例 44、45、46、47、48、49 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 1 ng/ml 呈示 60% 以下之細胞生存率，於 10、100、1000 ng/ml 呈示 20% 以下之細胞生存率。

【試驗例 15】

測定實施例 50、51、52 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2、0.02 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1、0.01 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 15 圖。實施例 50、51、52 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 0.1 ng/ml 呈示 60% 以下之細胞生

存率，於 1、10、100、1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 16】

測定實施例 53、54、55、56、57 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2、0.02 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1、0.01 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 16 圖。實施例 53、54、55、56、57 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 1ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率，於 10、100、1000 ng/ml 呈示 5%以下之細胞生存率。

【試驗例 17】

測定實施例 58 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 乃調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1 ng/ml)

，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 17 圖。實施例 58 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 1ng/ml 呈示 30%以下之細胞生存率，於 10、100、1000 ng/ml 呈示 5%以下之細胞生存率。

【試驗例 18】

測定實施例 36、37 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒乃調製為抗體濃度 2000、20、0.2 ng/mL(最終濃度 1000、10、0.1 ng/mL)、MAB631 於 1 μ g/mL 之二次抗體溶液(抗小鼠 IgG Fc)調製為 2000、20、0.2 ng/mL(最終濃度 1000、10、0.1 ng/mL)，以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 18 圖。實施例 36、37 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 MAB631 更強之細胞凋零誘導活性，於 0.1 ng/ml 呈示 50%以下之細胞生存率，於 10 ng/ml 或 1000 ng/ml 呈示 5%以下之細胞生存率。

【試驗例 19】

測定實施例 38、39 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10%

牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)，抗體濃度於免疫微脂粒調製為 2000、20、0.2 ng/mL(最終濃度 1000、10、0.1 ng/mL)，MAB6311 於 1 μ g/mL 之二次抗體溶液(抗小鼠 IgG Fc)調製為抗體濃度 2000、20、0.2 ng/mL(最終濃度 1000、10、0.1 ng/mL)，以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 19 圖。實施例 38、39 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 MAB6311 更強之細胞凋零誘導活性，於 0.1 ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率，於 10 ng/ml 或 1000 ng/ml 呈示 5%以下之細胞生存率。

【試驗例 20】

測定實施例 59、60 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 rsTRAIL 調製為蛋白濃度 2000、200、20、2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1 ng/ml)，以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 20 圖。實施例 59、60 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以 rsTRAIL 更強之細胞凋零誘導活性，於 1 ng/ml 呈示 70%以下之細胞生存率，於 10、100、1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 21】

測定實施例 61 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 rsTRAIL 乃調製為蛋白濃度 2000、200、20、2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1 ng/ml)，以一群 2 連施行實驗。

其結果如第 21 圖。實施例 61 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以 rsTRAIL 更強之細胞凋零誘導活性，於 10、100、1000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 22】

測定實施例 41、42、43、69 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)，免疫微脂粒及 hTRA-8 調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2、0.02 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1、0.01 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 22 圖。實施例 41、42、43、69 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 0.1 ng/ml 呈示 80%以下之細胞生存率，於 1ng/ml 呈示 40%以下之細胞生存率，於 10、

100、1000 ng/ml 呈示 10%以下之細胞生存率。

【試驗例 23】

測定實施例 67、68 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性

依試驗例 1 記載之方法測定白血病 T 淋巴腫細胞株 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。但培養基使用含有 10% 牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)、免疫微脂粒及 hTRA-8 調製為抗體濃度 2000、200、20、2、0.2 ng/ml(最終濃度 1000、100、10、1、0.1 ng/ml)，以一群 3 連施行實驗。

其結果如第 23 圖。實施例 68 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞，呈示比以二次抗體交聯之 hTRA-8 更強之細胞凋零誘導活性，於 1ng/ml 呈示 30%以下之細胞生存率，於 10、100、1000 ng/ml 呈示 5%以下之細胞生存率。

【試驗例 24】

測定實施例 40 調製之免疫微脂粒之 WR19L12a 細胞之細胞凋零誘導活性

將 WR19L12a 細胞依錐藍染色法計數後，以含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)調製為 1×10^5 cells/mL。預先以 RPMI 培養基調製為 10、1、0.1、0.01 μ g/mL(最終濃度 5、0.5、0.05、0.005 μ g/mL)之免疫微脂粒溶液或以 0.6 μ g/mL 之 rProteinG (SIGMA 公司製)調製為 10、1、0.1、0.01 μ g/mL(最終濃度 5、0.5、0.05、0.005 μ g/mL)之 DX2 溶液於一群 3 連各添加 50 μ L 之 96

穴微板(康寧公司製)，將細胞懸浮液各播種 $50\mu\text{L}$ (5×10^3 cells)。於 37°C 、5%二氧化碳存在下將板培養 72 小時，各穴之 ATP 量依試驗例 1 記載之方法測定。但以添加含有 PBS 之 RPMI 培養基和細胞懸浮液之穴為陰性對照穴，只添加 RPMI 培養基之穴為背景穴。

其結果如第 24 圖。實施例 40 調製之免疫微脂粒對 WR19L12a 細胞呈示比 DX2 更強之細胞凋零誘導活性，於 500、5000 ng/ml 呈示 20%以下之細胞生存率。

【試驗例 25】

測定實施例 62、64、65、66 調製之免疫微脂粒之亞歷山大細胞之細胞凋零誘導活性

將亞歷山大細胞依錐藍染色法計數後，以含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)調製為 2×10^4 cells/mL。預先以 RPMI 培養基調製為 2000、200、20、2 ng/mL(最終濃度 1000、100、10、1 ng/mL)之免疫微脂粒溶液或以 $3.6\mu\text{g/mL}$ 之二次抗體溶液(山羊抗小鼠 IgG Fc、Jackson 公司製)調製為 2000、200、20、2 ng/mL(最終濃度 1000、100、10、1 ng/mL)之 2E12 溶液於一群 3 連各添加 $50\mu\text{L}$ 之 96 穴微板(康寧公司製)，將細胞懸浮液各播種 $50\mu\text{L}$ (1×10^3 cells)。於 37°C 、5%二氧化碳存在下將板培養 72 小時，各穴之 ATP 量依試驗例 1 記載之方法測定。

其結果如第 25 圖。實施例 62、64、65、66 調製之免疫微脂粒對亞歷山大細胞，呈示比 2E12 更強之細胞凋零誘

導活性，於 100 ng/ml 呈示 70%以下之細胞生存率，於 1000 ng/ml 呈示 50%以下之細胞生存率。

【試驗例 26】

實施例 70、71、72 調製之免疫微脂粒之亞歷山大細胞之細胞凋零誘導活性之測定

將亞歷山大細胞依錐藍染色法計數後，以含有 10%牛胎血清(海克隆公司製)之 RPMI 培養基(Invitrogen 公司製)調製為 2×10^4 cells/mL。將預先以 RPMI 培養基調製為 2000、200、20、2 ng/mL(最終濃度 1000、100、10、1 ng/mL)之免疫微脂粒溶液、或以 $3.6 \mu\text{g/mL}$ 之二次抗體溶液(山羊抗小鼠 IgG Fc、Jackson 公司製)調製為 2000 ng/mL 之 2E12 溶液、及以 $1 \mu\text{g/mL}$ 之二次抗體溶液(山羊抗人 IgG Fc、MPBiomedicals 公司製)調製為 2000 ng/mL 之 hTRA-8 溶液，依 22:78、56:44 或 80:20 之比率混合，調製為 2000、200、20、2 ng/mL(最終濃度 1000、100、10、1 ng/mL)之 2E12 與 hTRA-8 之混合溶液於一群 3 連各添加 $50 \mu\text{L}$ 之 96 穴微板(康寧公司製)，將細胞懸浮液各播種 $50 \mu\text{L}$ (1×10^3 cells)。於 37°C 、5%二氧化碳存在下將板培養 24 小時，各穴之 ATP 量依試驗例 1 記載之方法測定。其結果如第 26 圖。實施例 70、71、72 調製之免疫微脂粒對亞歷山大細胞，比調整為對應比率之抗體呈示更強之細胞凋零誘導活性，於 10 ng/ml 呈示 60%以下，於 100、1000 ng/ml 呈示 10%以下之細胞生存率。

【試驗例 27】

由試驗例 1 至 26，計算依免疫微脂粒及對照抗體使細胞生存率降低為 50%之濃度。結果如表 3(只記載可求出對照抗體之 50%細胞生存率之試驗例 1、6 至 10、12 至 22、25)。表中之 EC_{50} 乃示呈示 50%細胞生存率之濃度，更將對照抗體之 50%細胞生存濃度除以各免疫微脂粒之 50%細胞生存濃度之價以 $EC_{50} \text{ Ab/IL}$ 記載。殆全免疫微脂粒中，該免疫微脂粒呈示之 50%細胞生存濃度，比對照抗體之 50%細胞生存濃度降低為 1/10 以下。即使由免疫微脂粒之細胞凋零誘導活性低之試驗例 19 等場合，也降低為 1/2.5 以下。試驗例 7、9、12 至 15、17、21 中，降低為 1/100 以下。

【表 3】

表3 專利實施例化合物 EC₅₀

實驗例 No.	實施例化合物編號	EC ₅₀ (ng/mL)	EC ₅₀ Ab/IL	交聯抗體 EC ₅₀ (ng/mL)
1	3	0.57	30.9	17.6
	2	0.93	18.9	
	1	9.2	1.9	
6	4	8.61	31.4	270.4
	17	6.33	42.7	
	18	10.7	25.3	
7	22	0.075	228.0	17.1
	23	0.1	171.0	
8	24	1.32	55.8	73.7
9	25	0.168	186.9	31.4
10	5	0.189	77.2	14.6
	6	0.079	184.8	
12	32	0.048	614.6	29.5
	33	0.158	186.7	
	34	0.0514	573.9	
	35	0.274	107.7	
13	44	0.0627	575.8	36.1
	45	0.211	171.1	
	46	0.477	75.7	
	47	0.0276	1308	
	48	0.158	228.5	
	49	1.02	35.4	
14	50	0.128	230.5	29.5
	51	0.0757	389.7	
	52	0.125	236.0	
15	53	0.235	153.7	36.12
	54	0.13	277.8	
	55	0.332	108.8	
	56	0.489	73.9	
	57	0.127	284.4	
16	58	0.343	99.7	34.19
17	36	0.069	193.6	13.36
	37	0.089	150.1	
18	38	0.075	31.9	2.39
	39	0.083	28.8	
19	59	1.9	2.8	5.24
	60	1.24	4.2	
20	61	4.24	3.7	15.5
21	41	0.057	378.8	21.59
	42	0.144	149.9	
	43	0.094	229.7	
	69	0.371	58.2	
22	67	7.04	2.7	18.7
	68	0.233	80.3	
25	70	1.69	21.5	36.3
	71	2.93	26.6	77.8
	72	10.7	8.2	87.4

【產業上之利用可能性】

本發明提供由於其中含有與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體之免疫微脂粒之癌治療用醫藥組成物、自體免疫疾病或炎症性疾病治療用醫藥組成物。

【圖式簡單說明】

【第 1 圖】第 1 圖乃示實施例 1、2、3 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附點線○為實施例 1、附點線●為實施例 2、附實線○為實施例 3、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 2 圖】第 2 圖乃示實施例 19、20、21 調製之免疫微脂粒之 A375 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 19、附點線○乃示實施例 20、附點線●乃示實施例 21、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 3 圖】第 3 圖乃示實施例 8、10、12、14、16 調製之免疫微脂粒之 A375 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線△乃示實施例 8、附點線▲乃示實施例 10、附實線○乃示實施例 12、附點線●乃示實施例 14、附點線○乃示實施例 16、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 4 圖】第 4 圖乃示實施例 7、9、11、13、15 調製之免疫微脂粒之 A2058 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線△乃示實施例 7、附點線▲乃示實施例 9、附實線○

乃示實施例 11、附點線●乃示實施例 13、附點線○乃示實施例 15、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 5 圖】第 5 圖乃示實施例 26、27、28、29、30、31 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。圖中附點線△乃示實施例 26、附實線△乃示實施例 27、附實線▲乃示實施例 28、附點線○乃示實施例 29、附實線○乃示實施例 30、附點線●乃示實施例 31、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hHFE7A 之活性。

【第 6 圖】第 6 圖乃示實施例 4、17、18 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 4、附點線●乃示實施例 17、附點線○乃示實施例 18、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 7 圖】第 7 圖乃示實施例 22、23 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 22、附點線●乃示實施例 23、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 8 圖】第 8 圖乃示實施例 24 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 24 中所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 9 圖】第 9 圖乃示實施例 25 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示

實施例 25 中所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 10 圖】第 10 圖乃示實施例 5、6 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 5、附點線●乃示實施例 6、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 11 圖】第 11 圖乃示實施例 3、20 調製之免疫微脂粒之關節風濕患者由來滑膜細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 3、附點線●乃示實施例 20、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 12 圖】第 12 圖乃示實施例 5 調製之免疫微脂粒之人大腸癌株 COLO 205 移植裸小鼠中抗腫瘤活性之圖。圖中無符號之實線乃示無投與抗體時之腫瘤體積、附實線○為將 3.3mg/kg、附實線△乃示將 10mg/kg 之抗體投與時之腫瘤體積。

【第 13 圖】第 13 圖乃示實施例 32、33、34、35 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 32、附點線○乃示實施例 33、附點線●乃示實施例 34、附實線▲乃示實施例 35、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 14 圖】第 14 圖乃示實施例 44、45、46、47、48、49 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中附實線○乃示實施例 44、附點線○乃示實施例 45

、附實線■乃示實施例 46、附實線□乃示實施例 47、附實線▲乃示實施例 48、附點線●乃示實施例 49、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 15 圖】第 15 圖乃示實施例 50、51、52 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 50、附點線○乃示實施例 51、附點線■乃示實施例 52、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 16 圖】第 16 圖乃示實施例 53、54、55、56、57 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性。圖中之附點線○乃示實施例 53、附實線■乃示實施例 54、附實線○乃示實施例 55、附點線●乃示實施例 56、附實線△乃示實施例 57、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hHFE7A 之活性。

【第 17 圖】第 17 圖乃示實施例 58 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 58 中所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 18 圖】第 18 圖乃示實施例 36、37 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 36、附點線●乃示實施例 37、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 MAB631 之活性。

【第 19 圖】第 19 圖乃示實施例 38、39 調製之免疫微脂粒

對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 38、附點線●乃示實施例 39、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 MAB6311 之活性。

【第 20 圖】第 20 圖乃示實施例 59、60 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 59、附點線●乃示實施例 60、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 rsTRAIL(P)之活性。

【第 21 圖】第 21 圖乃示實施例 61 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 61 中所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 rsTRAIL(B)之活性。

【第 22 圖】第 22 圖乃示實施例 41、42、43、69 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 41、附點線○乃示實施例 42、附點線●乃示實施例 43、附實線■乃示實施例 69、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 23 圖】第 23 圖乃示實施例 67、68 調製之免疫微脂粒對 Jurkat 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附點線●乃示實施例 67、附實線○乃示實施例 68、各示所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次交聯之 hTRA-8 之活性。

【第 24 圖】第 24 圖乃示實施例 40 調製之免疫微脂粒之 W19L12a 細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線○乃示實施例 40 中所得微脂粒之活性、附實線●乃示二次

交聯之 DX2 之活性。

【第 25 圖】第 25 圖乃示實施例 62、64、65、66 調製之免疫微脂粒之亞歷山大細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附點線 ○ 乃示實施例 62、附點線 ● 乃示實施例 64、附實線 ○ 乃示實施例 65、附點線 ■ 乃示實施例 66、各示所得微脂粒之活性、附實線 ● 乃示二次交聯之 2E12 之活性。

【第 26 圖】第 26 圖乃示實施例 70、71、72 調製之免疫微脂粒之亞歷山大細胞之細胞凋零誘導活性之圖。圖中之附實線 ● 乃示實施例 70、附點線 ◆ 乃示實施例 71、附實線 ■ 乃示實施例 72、各示所得微脂粒之活性、附實線 ○ 乃示以 22：78 之比率混合之 2E12 及 hTRA-8、附點線 ◇ 乃示以 56：44 之比率混合之 2E12 及 hTRA-8 之活性、附實線 □ 乃示以 80：20 之比率混合之 2E12 及 hTRA-8 之活性。

【序列表項目】

序列編號 1-人工序列之說明：人化之 TRA-8 之重鏈胺基酸序列

序列編號 2-人工序列之說明：人化之 TRA-8 之輕鏈胺基酸序列

序列編號 3-人工序列之說明：人化之 HFE7A 之重鏈胺基酸序列

序列編號 4-人工序列之說明：人化之 HFE7A 之輕鏈胺基酸序列

【 序 列 表 】

<110> 第一三共股份有限公司

<120> 對表現含死亡功能域受體之細胞誘導細胞凋零之免疫微脂粒

<130> FP0830

<160> 4

<170> 專利第 3.4 版

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人化 TRA-8 之重鏈胺基酸序列

<220>

<223> 發明人：森田浩司；丹羽貴子；市川公久

<223> 發明人：好田宏子

<220>

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 2
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人化 TRA-8 之輕鏈氨基酸序列

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 470
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人化 HFE7A 之重鏈氨基酸序列

<400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 4
<211> 237
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人化 HFE7A 之輕鏈胺基酸序列

<400> 4

Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly
1 5 10 15

Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

五、中文發明摘要：

本發明為有關對癌、自體免疫疾病或炎症性疾病具有治療效果之免疫微脂粒製劑。也即本發明為有關以對含有死亡功能域之受體表現細胞有可能誘導細胞凋零作用之抗體為構成成分之免疫微脂粒。

六、英文發明摘要：

The present invention relates an immunoliposome preparation, which have the therapeutical effect for the cancer, the autoimmune disease or the inflammatory disease. That is the present invention relates an immunoliposome which contains, as the composing component, the antibody which can induce apoptosis to the cells expressing death domain-containing receptors.

十、申請專利範圍：

- 1.一種免疫微脂粒，其與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合而含有如下(a)及(b)：
 - (a)與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體、該抗體之機能性片段、或含有該抗體之重鏈及輕鏈之相補性決定部位而與該細胞表面受體專一地結合之多肽；
 - (b)兩親媒性小胞形成脂質。
- 2.如申請專利範圍第 1 項之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞呈示細胞凋零誘導活性。
- 3.如申請專利範圍第 1 或 2 項之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞，若於該細胞表面受體專一地結合之抗體之全長分子由二次抗體或蛋白質 G、A 等抗體結合蛋白質來交聯時呈示與於活體外呈示細胞凋零誘導活性同等、或於活體外呈示更強細胞凋零誘導活性。
- 4.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞，若於該細胞表面受體專一地結合之抗體之全長分子由二次抗體或蛋白質 G、A 等抗體結合蛋白質來交聯時，與於活體外呈示之 50%細胞生存濃度比較，呈示 1/2.5 以下之 50%細胞生存濃度。
- 5.如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之免疫微脂粒，其係對表現參與細胞凋零誘導之細胞表面受體之細胞，若於該

細胞表面受體專一地結合之抗體之全長分子由二次抗體或蛋白質 G、A 等抗體結合蛋白質來交聯時，與於活體外呈示之 50%細胞生存濃度比較，呈示 1/10 以下之 50%細胞生存濃度。

- 6.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之免疫微脂粒，其係含有與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體，而該抗體為抗體之全長分子。
- 7.如申請專利範圍第 6 項之免疫微脂粒，其係含有抗體之全長分子對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 0.23 莫耳%之抗體密度。
- 8.如申請專利範圍第 7 項之免疫微脂粒，其係含有抗體之全長分子對總脂質莫耳數為 0.002 莫耳%至 0.14 莫耳%之抗體密度。
- 9.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體之機能性片段為 $F(ab')_2$ 。
- 10.如申請專利範圍第 9 項之免疫微脂粒，其中含有 $F(ab')_2$ 對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 0.23 莫耳%之抗體密。
- 11.如申請專利範圍第 10 項之免疫微脂粒，其中含有 $F(ab')_2$ 對總脂質莫耳數為 0.006 莫耳%至 0.11 莫耳%之抗體密度。
- 12.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗

體之機能性片段為 Fab' 。

- 13.如申請專利範圍第 12 項之免疫微脂粒，其中含有 Fab' 對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 0.94 莫耳%之抗體密度。
- 14.如申請專利範圍第 13 項之免疫微脂粒，其中含有 Fab' 對總脂質莫耳數為 0.005 莫耳%至 0.56 莫耳%之抗體密度。
- 15.如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體為嵌合體抗體。
- 16.如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體為人化抗體。
- 17.如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之抗體為人抗體。
- 18.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之免疫微脂粒，其中與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合之多肽為單鏈可變部位抗體。
- 19.如申請專利範圍第 18 項之免疫微脂粒，其中含有單鏈可變部位抗體對總脂質莫耳數為 0.000014 莫耳%至 1.8 莫耳%之抗體密度。
- 20.如申請專利範圍第 19 項之免疫微脂粒，其中含有單鏈可變部位抗體對總脂質莫耳數為 0.005 莫耳%至 0.56 莫耳%

之抗體密度。

- 21.如申請專利範圍第 1 至 20 項中任一項之免疫微脂粒，其中參與細胞凋零誘導之細胞表面受體為含有死亡功能域之受體。
- 22.如申請專利範圍第 21 項之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為由 Fas、DR4、DR5 及 TNF 受體而成之群選擇。
- 23.如申請專利範圍第 22 項之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為 DR5。
- 24.如申請專利範圍第 22 項之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為 DR4。
- 25.如申請專利範圍第 22 項之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為 Fas。
- 26.如申請專利範圍第 23 項之免疫微脂粒，其中抗體分子或該抗體之機能性片段為含有由序列表記載之序列編號 1 之胺基酸序列之 1~118 號胺基酸殘基而成重鏈可變領域序列及序列表記載之序列編號 2 之胺基酸序列 1~107 號之胺基酸殘基而成之輕鏈可變領域序列。
- 27.如申請專利範圍第 24 項之免疫微脂粒，其中抗體分子或該抗體之機能性片段為含有由融合瘤 2E12 產生之抗體、與該抗體同一抗原決定部位結合之抗體或由該抗體之人化抗體選擇之抗體之重鏈及輕鏈可變領域。
- 28.如申請專利範圍第 25 項之免疫微脂粒，其中抗體分子或該抗體之機能性片段為含有由序列表記載之序列編號 3

之胺基酸序列之 1~139 號之胺基酸殘基而成重鏈可變領域序列及序列表記載之序列編號 4 之胺基酸序列 1~131 號之胺基酸殘基而成輕鏈可變領域序列。

29.一種免疫微脂粒，其與參與細胞凋零誘導之細胞表面受體專一地結合而含有如下(a)及(b)：

(a)與該細胞表面受體專一地結合，且具有仲介該受體而於細胞誘導細胞凋零之活性之內因性配體或該內在性配體之機能性片段；

(b)兩親媒性小胞形成脂質。

30.如申請專利範圍第 29 項之免疫微脂粒，其係對表現該細胞表面受體之細胞，呈示比該內在性配體更強之細胞凋零誘導活性。

31.如申請專利範圍 29 或 30 項之免疫微脂粒，其中細胞表面受體為含有死亡功能域之受體。

32.如申請專利範圍第 31 項之免疫微脂粒，其中含有死亡功能域之受體為由 Fas、DR4、DR5 及 TNF 受體而成之群選擇。

33.如申請專利範圍第 32 項之免疫微脂粒，其中對含有死亡功能域之受體之內在性配體為 TRAIL 或 Fas 配體。

34.如申請專利範圍第 1 至 33 項中任一項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質含有固醇類、磷脂質。

35.如申請專利範圍第 34 項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之一之固醇類為膽固醇。

36.如申請專利範圍第 35 項之免疫微脂粒，其中構成免疫微

脂粒之脂質之一之膽固醇以對總脂質莫耳數為 20 莫耳 % 至 50 莫耳 % 之比例含有。

37.如申請專利範圍第 34 至 36 項中任一項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之一之磷脂質為磷脂醯膽鹼。

38.如申請專利範圍第 37 項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之磷脂醯膽鹼中之醯基為碳數 14 至 22。

39.如申請專利範圍第 38 項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之磷脂醯膽鹼中之醯基為碳數 14 至 18。

40.如申請專利範圍第 34 至 39 項中任一項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質更含有親水性聚合物或該親水性聚合物之脂質衍生物。

41.如申請專利範圍第 40 項之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物中親水性聚合物之平均分子量為 500 至 20000。

42.如申請專利範圍第 41 項之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物中親水性聚合物之平均分子量為 2000 至 5000。

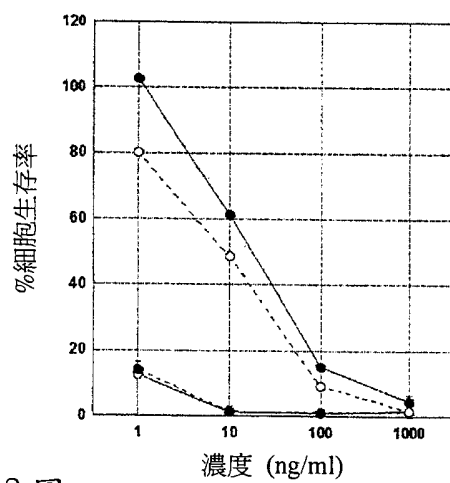
43.如申請專利範圍第 40 至 42 項中任一項之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物以對總脂質莫耳數為 0.1 莫耳 % 至 10 莫耳 % 之比例含有。

44.如申請專利範圍第 43 項之免疫微脂粒，其中親水性聚合物之脂質衍生物以對總脂質莫耳數為 1 莫耳 % 至 6 莫耳 % 之比例含有。

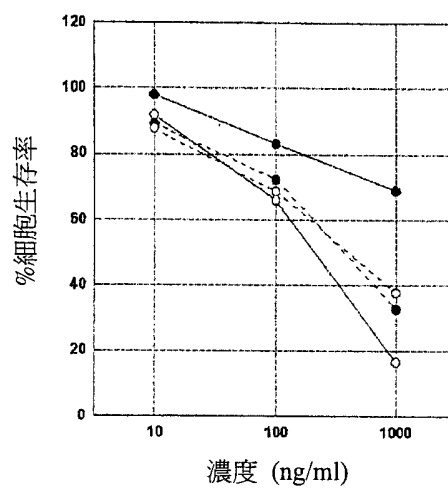
- 45.如申請專利範圍第 40 至 44 項中任一項之免疫微脂粒，其中構成免疫微脂粒之脂質之一之親水性聚合物之脂質衍生物為聚乙二醇修飾脂質。
- 46.如申請專利範圍第 34 至 44 項中任一項之免疫微脂粒，其中使用末端具有馬來醯亞胺基之脂質或親水性聚合物，使微脂粒和抗體伸介硫醚結合來結合。
- 47.如申請專利範圍第 1 至 46 項中任一項之免疫微脂粒，其中免疫微脂粒之平均粒徑為 30-1000nm。
- 48.如申請專利範圍第 47 項之免疫微脂粒，其中免疫微脂粒之平均粒徑為 30-200nm。
- 49.如申請專利範圍第 1 至 48 項中任一項之免疫微脂粒，其微脂粒中封入具有抗腫瘤活性之藥劑。
- 50.如申請專利範圍第 1 至 48 項中任一項之免疫微脂粒，其微脂粒中封入具有自體免疫疾病或炎症性疾病之治療作用之藥劑。
- 51.一種醫藥組成物、含有如申請專利範圍第 1 至 50 項中任一項之免疫微脂粒為有效成分。
- 52.一種抗腫瘤劑、含有如申請專利範圍第 1 至 49 項中任一項之免疫微脂粒為有效成分。
- 53.一種自體免疫性疾病或炎症性疾病之治療劑、含有如申請專利範圍第 1 至 48 項或第 50 項之免疫微脂粒為有效成分。

十一、圖式：

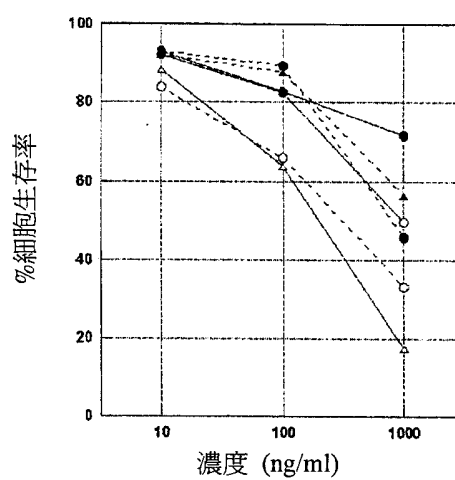
第 1 圖



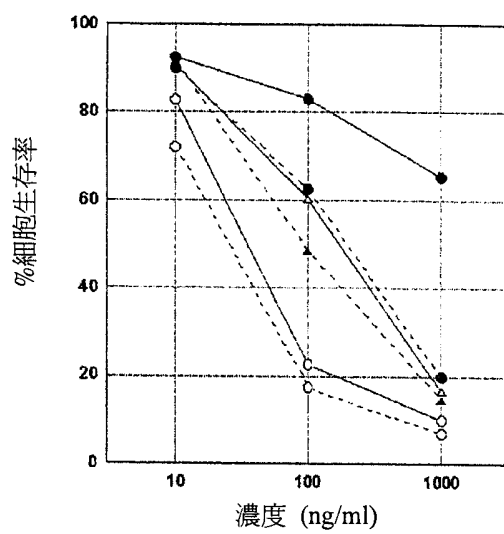
第 2 圖



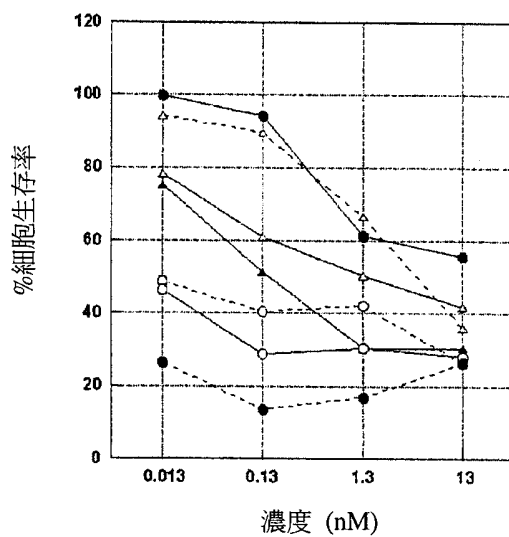
第 3 圖



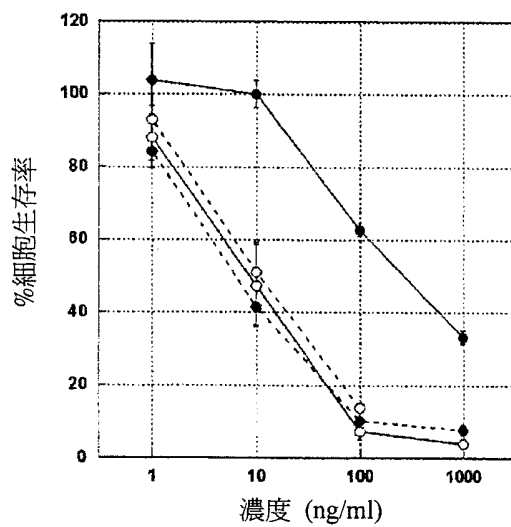
第 4 圖



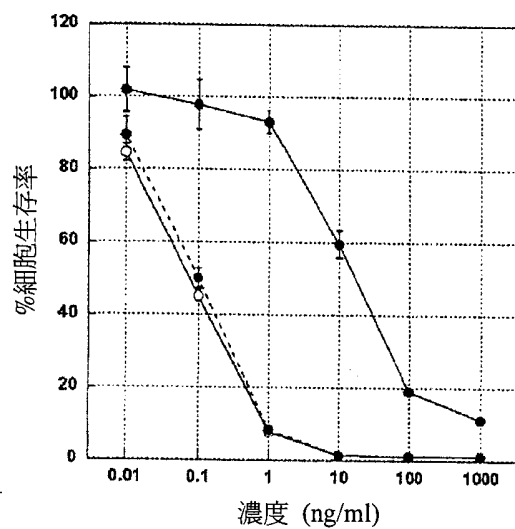
第 5 圖



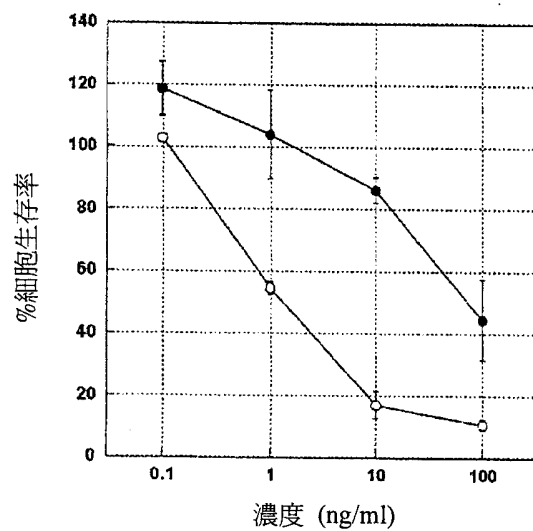
第 6 圖



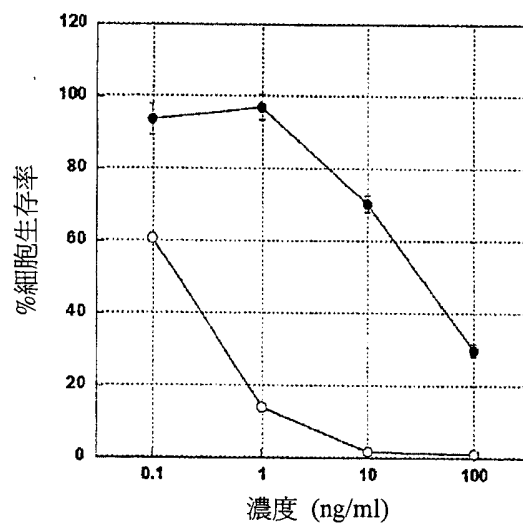
第 7 圖



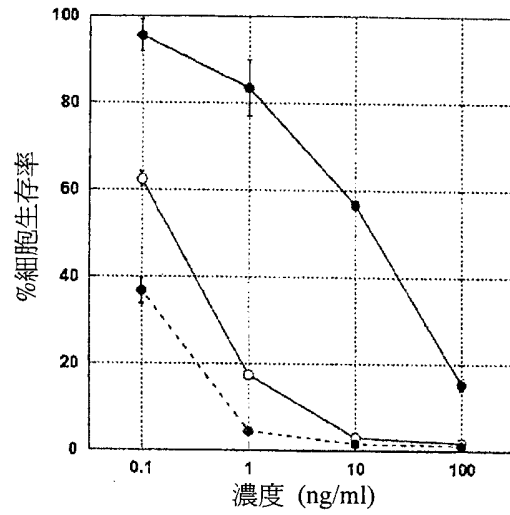
第 8 圖



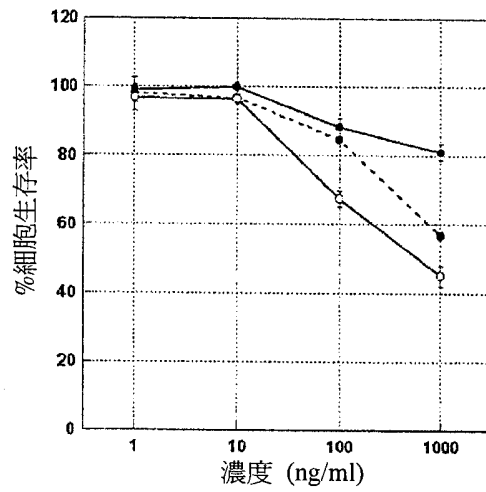
第 9 圖



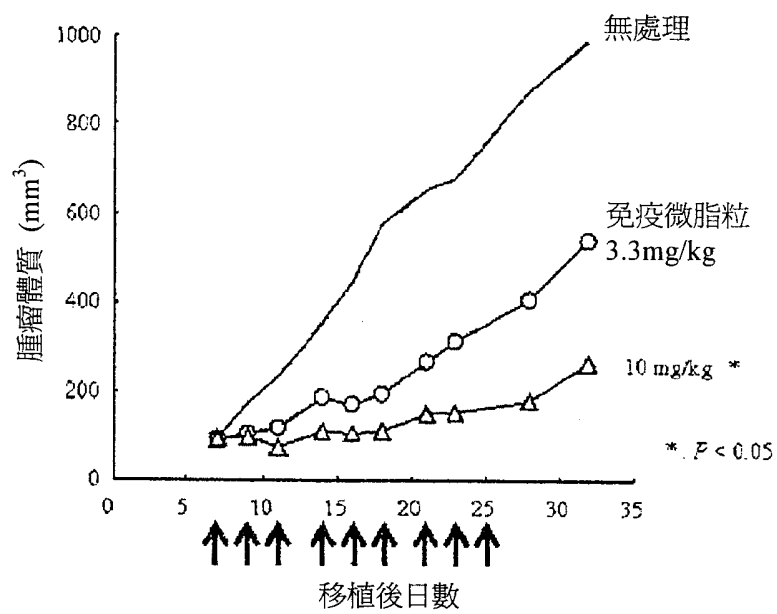
第 10 圖



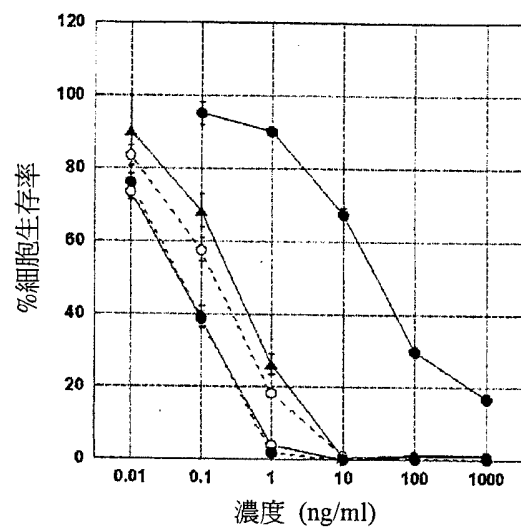
第 11 圖



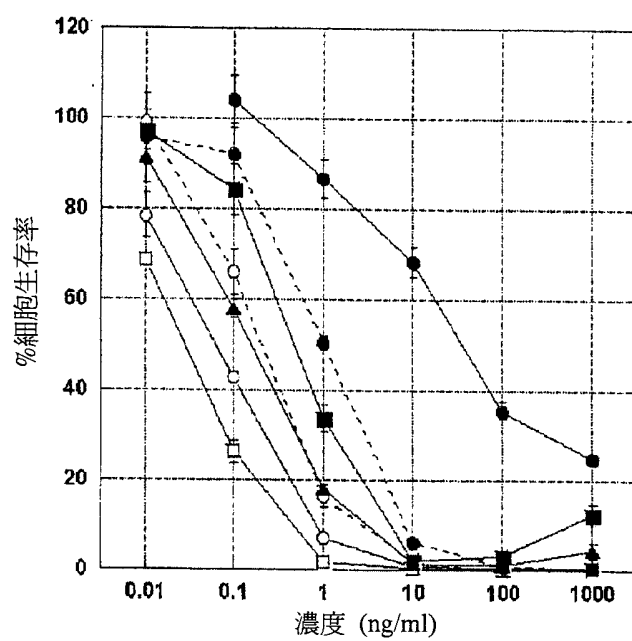
第 12 圖



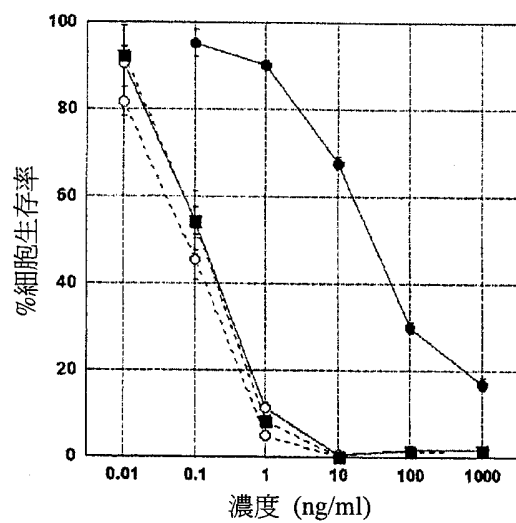
第 13 圖



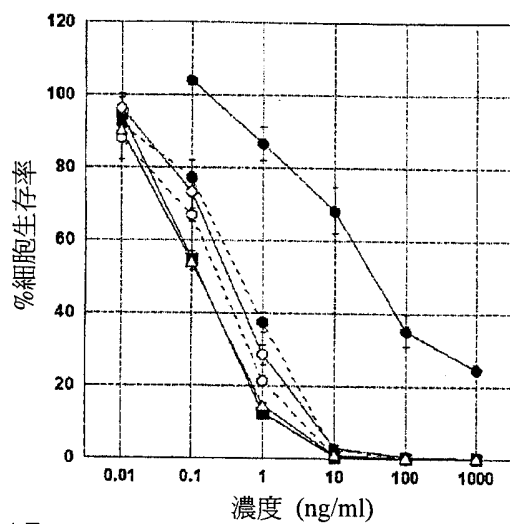
第 14 圖



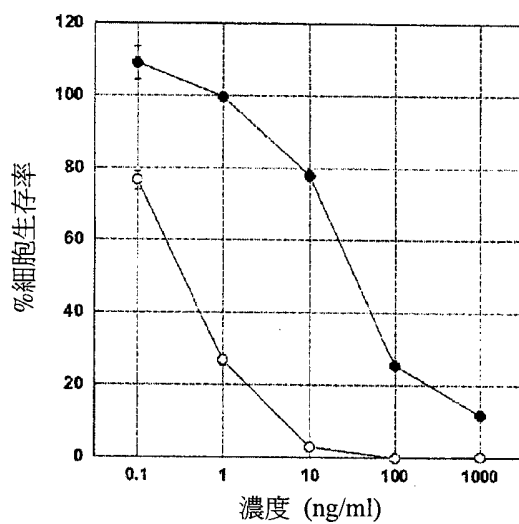
第 15 圖



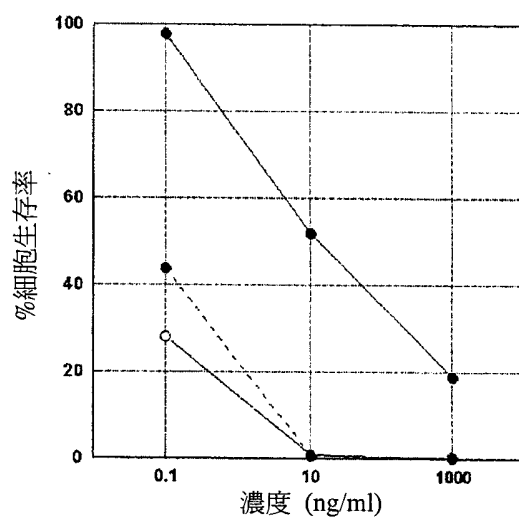
第 16 圖



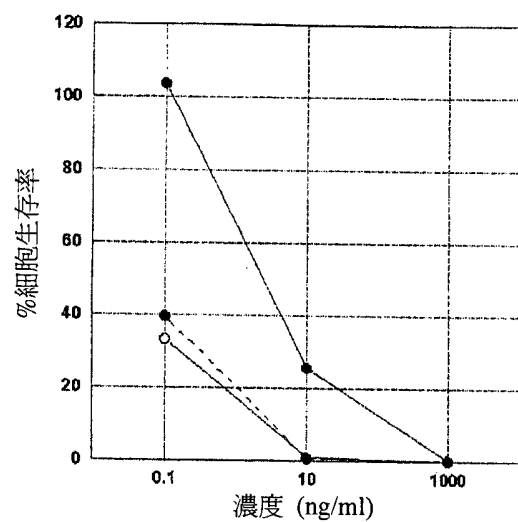
第 17 圖



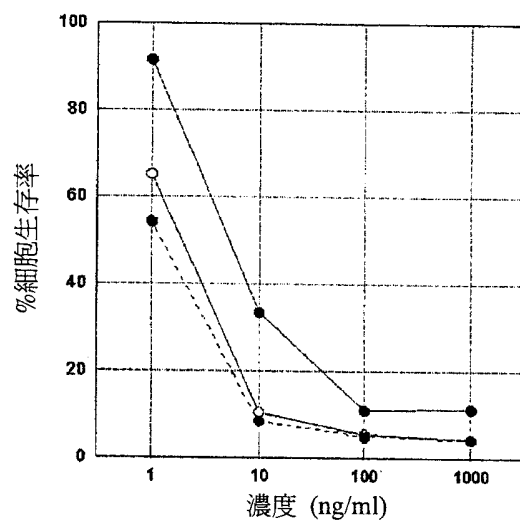
第 18 圖



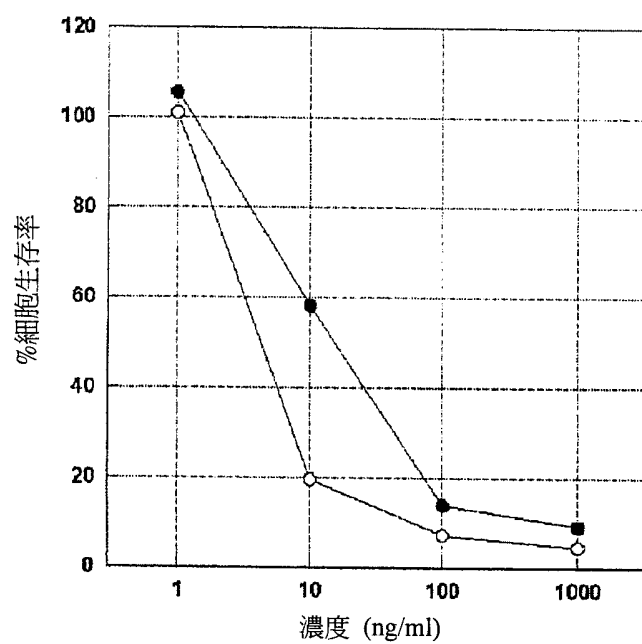
第 19 圖



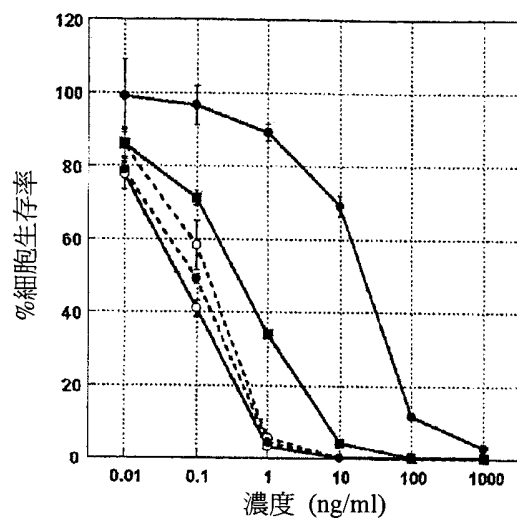
第 20 圖



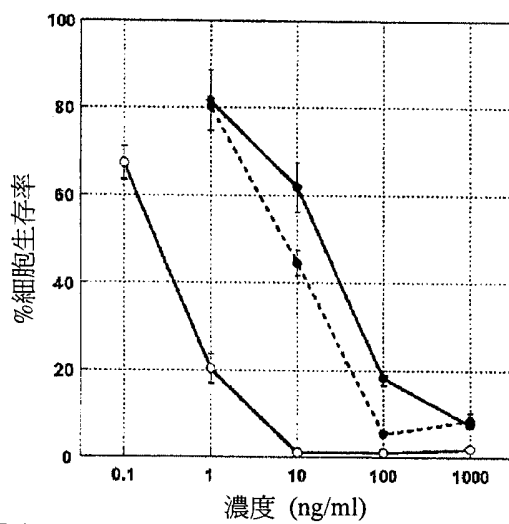
第 21 圖



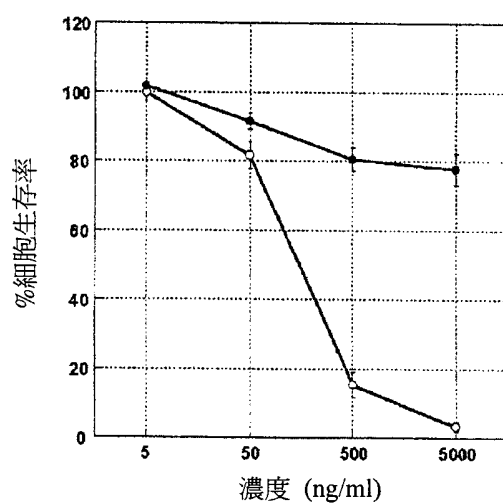
第 22 圖



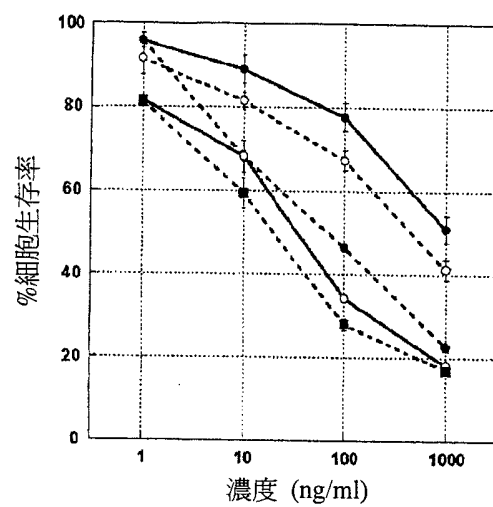
第 23 圖



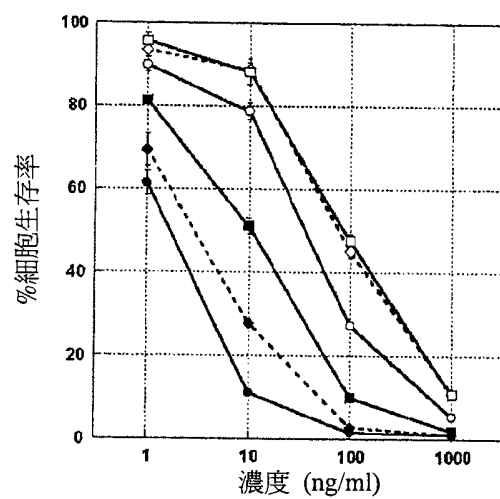
第 24 圖



第 25 圖



第 26 圖



七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無。

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明

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。