

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 堤姆斯 D 歐斯魯德
OSSLUND, TIMOTHY D.
2. 克利絲丁 L 克魯頓
CLOGSTON, CHRISTI L.
3. 湘 李 克萊普頓
CRAMPTON, SHON LEE
4. 瑞戴爾 B 貝斯
BASS, RANDAL B.

國 籍：(中文/英文)

- 1.-4. 均 美國 U. S.A.

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003 年 08 月 01 日；60/491,827

2. 美國；2004 年 07 月 29 日；10/901,735

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 本案在向中華民國提出申請前未曾向其他國家提出申請專利。

2.

☐ 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】

本發明係關於晶性多肽及製造晶性多肽的方法；關於包含晶性多肽之醫藥組合物；及關於該等多肽及組合物之治療用途。

【先前技術】

許多治療分子係多肽，一些多肽易於變性、降解及/或聚集。不希望出現多肽之聚集，因其可導致免疫抗原性 (Cleland 等人，1993, Crit Rev Therapeutic Drug Carrier Systems, 10: 307-377; 及 Robbins 等人，1987, Diabetes, 36: 838-845)。藉由已投與多肽之有機體的自然生物學過程，多肽亦經受催化作用或轉化為非活性形式。此外，治療性多肽可生成非均勻混合物形式，變化在於糖基化程度或其三維構型之其他態樣。

治療性多肽之結晶化提供產生該等多肽之穩定及均勻調配物的優勢。晶體之特定優勢包括在製備醫藥產物中更易於處理治療性化合物；減少降解、變性及/或聚集；創造持續釋放形式之治療性多肽以降低服藥頻率的潛在優勢；及使用晶性治療性多肽形成具有極高濃度治療性多肽之醫藥組合物的能力。另外，結晶化方法可產生調配物中更均勻之多肽群，因為僅加入相似組態之多肽分子會增加晶體之持續生長-當有限量之多肽變體結構已並入晶格中時，所得晶體中結構弱點將阻止其進一步生長。因為並入晶形中可保證更大百分比多肽將處於活性形式，投與較少量晶性治

療性肽可產生等同於投與較大量更加非均勻之多肽調配物的治療效應。

因此，存在治療性多肽之晶性調配物的需要。

【發明內容】

本發明提供 TNFR2 多肽之晶形，其包括晶性 TNFR2：Fc 多肽及晶性依那西普(etanercept)。本發明之一實施例為依那西普晶體；在特定實施例中，依那西普晶體為桿狀形式，及/或具有在 0.5 毫米與 1.5 毫米之間或 0.05 毫米與 0.3 毫米之間的最大長度。

本發明亦提供製造 TNFR2 多肽(例如 TNFR2-Ig 稠合多肽或依那西普)晶體之方法。在特定實施例中，TNFR2 多肽為單體；在額外實施例中，TNFR2 多肽為多聚體，例如二聚體、三聚體、寡聚物。在其他實施例中，TNFR2 多肽共用沿 SEQ ID NO：1 之胺基酸 39 至 162 長度的至少 90% 胺基酸一致性。

本發明亦係關於所揭示晶性 TNFR2 多肽(例如晶性 TNFR2：Fc 多肽或晶性依那西普)在製造用於預防或治療本文所揭示之各種醫學病症之藥物上的用途。

【實施方式】

本發明係針對晶形 TNFR2 多肽，及製造並使用該等晶性 TNFR2 多肽之方法。該等多肽晶體優勢為在較寬範圍儲存及處理條件下，晶性多肽較非晶形多肽可儲存較長時期且可顯示出較強物理穩定性並保持生物活性。

定義

"多肽"在本文定義為天然、合成及重組蛋白質或一般具有超過10個胺基酸之肽。"多肽連接體(polypeptide linker)"可為一連串短至一個胺基酸長度的胺基酸所形成之多肽。

如本文所使用，"經分離"係指已自其天然發生之環境移除之多肽或其他分子。

如本文所使用，"大體上經純化"係指在其天然發生或生成之環境中存在大體上不含其他多肽之多肽；一種已大體上經純化之多肽製劑含有以重量計至少90%(或以重量計至少95%，至少98%，或至少99%)之多肽，其中多肽之重量包括任何碳水化合物、脂類或其他共價連接至多肽之殘基。大體上經純化之多肽製劑可含有該製劑內多肽分子間關於糖基化或其他轉譯後改質之程度及類型，或關於構型或多聚化程度的變體。

如本文所使用，"經純化多肽"係指基本上均勻的多肽製劑；但是，基本上均勻之多肽製劑可含有該製劑內多肽分子間關於糖基化或其他轉譯後改質之程度及類型，或關於構型或多聚化程度的變體。

"全長多肽"係彼等具有多肽之如同初始轉譯之完整初級胺基酸序列的多肽；例如，全長形式之人類TNFR2如SEQ ID NO：1所示。多肽之"成熟型"係指經受轉譯後處理步驟(例如裂解訊號序列或蛋白質裂解)以移除前結構域(prodomain)之多肽。特定全長多肽之多成熟型可藉由(例如)在多處裂解訊號序列，或藉由差異調節(differential regulation)裂解多肽之蛋白酶來產生。該(等)成熟型之多肽可藉由在適當哺乳

動物細胞或其他宿主細胞中的核酸分子之表現來獲得，該核酸分子編碼全長多肽。成熟型多肽之序列亦可經由識別訊號序列或蛋白酶裂解位點自全長型胺基酸序列來確定。在特定實施例中，成熟型人類TNFR2多肽具有N末端胺基酸殘基，其選自SEQ ID NO：1之胺基酸23、27及28組成之群，或具有N末端胺基酸，其選自SEQ ID NO：1之胺基酸1與胺基酸39間的每個胺基酸組成之群。

兩種胺基酸序列之"百分比一致性"可藉由目視檢查(visual inspection)及數學計算來確定，且亦可使用電腦程式比較序列資訊來進行比較。確定百分比一致性之第一步係比對胺基酸序列以最大化重疊與一致性，同時最小化比對中之間隙。確定百分比一致性之第二步係計算經比對序列間之一致性的數目，該數目除以比對中之胺基酸總數即得百分比一致性。當確定胺基酸序列已"跨越目標胺基酸序列之長度"的百分比一致性時，目標胺基酸序列之長度為比對中的總鹼基數目的最小值。例如，當確定50個胺基酸之第一胺基酸序列跨越SEQ ID NO：X之胺基酸1至100之第二胺基酸序列長度的百分比一致性時，若第一胺基酸序列與SEQ ID NO：X之胺基酸1至50一致，百分比一致性將為50%：50個胺基酸等同物除以該比對的總長度(100個胺基酸)。用於比對胺基酸序列及計算百分比一致性之例示性電腦程式為BLASTP程式，其經由National Library of Medicine(網頁：ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi)或UW-BLAST 2.0演算法能夠使用。UW-BLAST 2.0的標準默

認參數設置如以下網址中所述：sapiens.wustl.edu/blast/blast/README.html。另外，BLAST演算法使用了BLOSUM62胺基酸計分矩陣(scoring matrix)及可選參數，其可使用如下：(A)包括過濾法來遮罩具有低成份複雜性的查詢序列(query sequence)的區段(segment)(Wootton及Federhen之SEG程式來測定(Computers and Chemistry, 1993)；亦參見Wootton及Federhen, 1996, Analysis of compositionally biased regions in sequence databases, Methods Enzymol. 266: 554-71)或遮罩由短周期內在重複所組成之區段(由Claverie and States之XNU程式來確定(Computers and Chemistry, 1993))，及(B)用於報導與資料庫序列相反之匹配的統計顯著性臨限值，或E-score(根據Karlin及Altschul(1990)之隨機性模型，僅僅偶然發現匹配之預期可能性；若統計顯著性歸於大於E-score臨限值之匹配，則不會報導該匹配)；E-score臨限值為0.5、0.25、0.1、0.05、0.01、0.001、0.0001、1e-5、1e-10、1e-15、1e-20、1e-25、1e-30、1e-40、1e-50、1e-75或1e-100。熟習此序列比較之技術者所使用之其他程式亦可用來比對胺基酸序列，例如，Genetics Computer Group(GCG; Madison, WI)Wisconsin package version 10.0 program, 'GAP'(Devereux等人，1984, Nucl. Acids Res. 12: 387)。「GAP」程式之默認參數包括：(1)核苷酸之一元比較矩陣(含有1值表示一致及0表示非一致)，及Gribskov與Burgess之經稱重胺基酸比較矩陣，Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986，如Schwartz及Dayhoff所述，eds.,

Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979 ; 或其他可進行比較之比較矩陣的GCG實施 ; (2)胺基酸序列每個間隙罰30及每個間隙中之每個符號額外罰1 , 或核苷酸序列每個間隙罰50及每個間隙中之每個符號額外罰3 ; (3)不處罰末端間隙 ; 及(4)不最大處罰長間隙。

本發明之TNFR2多肽之"可溶解型"包含該等多肽之特定片斷或域。可溶解型多肽係能夠自在其中表現該等多肽的細胞分泌之多肽。經分泌可溶解性多肽可藉由例如離心來分離完整細胞, 該等細胞將所需多肽自培育介質中表現出來, 及檢定存在所需多肽之介質(上清液)來識別(且與非溶解性膜結合之對應物加以區別)。介質中所需多肽之存在表明多肽自該等細胞分泌且因此為多肽之可溶解型。本發明之細胞激素多肽之可溶解型的用途在許多應用中有利。因為可溶解性多肽自該等細胞分泌, 所以可促進源自重組宿主細胞之多肽的純化。此外, 可溶解性多肽一般較膜結合型更適用於非經腸投藥及更適用於許多酶程式。在本發明之特定實施例中, 成熟可溶解型TNFR2多肽並不含有跨膜或膜錨定域例如SEQ ID NO: 1之胺基酸258至87, 或含有該域之不足部分(例如10個胺基酸或更少), 導致保持多肽為膜結合形式。

"基本由胺基酸序列所組成之經分離多肽"意謂多肽可視情況具有(除胺基酸序列之外)共價連接至多肽之一端或兩端的額外物質, 該額外物質在1與10,000個共價連接至多肽

之一端或兩端的額外胺基酸之間；或在1與1,000個共價連接至多肽之一端或兩端的額外胺基酸之間；或在1與100個共價連接至多肽之一端或兩端的額外胺基酸之間。根據本發明多肽之一端或兩端之額外胺基酸的共價鍵導致非天然產生之組合胺基酸序列。

TNFR2多肽結晶化

TNFR2多肽系包含至少一部分TNFR2(腫瘤壞死因子受體2)多肽或至少一部分其變體之多肽。TNFR2多肽包括TNFR2稠合多肽，例如如下所述之TNFR2-Ig稠合多肽，以及TNFR2：Fc多肽、依那西普及其變體、單體或多聚體形式，經改質型式及接合物。

TNFR2多肽亦稱為TNFRSF1B(腫瘤壞死因子受體超家族成員1B)、p75，及CD120b；TNFR2多肽之全長胺基酸序列顯示於SEQ ID NO：1中(亦參見Swiss-Prot Database Accession Number P20333)。另一相關但截然不同的腫瘤壞死因子受體系TNFR1，亦稱為TNFRSF1A及p55(亦參見Swiss-Prot Database Accession Number P19438)。已知TNFR2及TNFR1與多效性細胞激素腫瘤壞死因子 α (TNF- α 或僅"TNF")結合，其與發炎有關。除了與TNF- α 結合外，TNFR2及TNFR1多肽可調節與TNF- β (通常稱為"淋巴毒素- α "或LT- α ，其係另一種與發炎有關的細胞激素，且與TNF- α 享有結構相似度)之同型三聚體細胞的結合(例如，參見Cosman, Blood Cell Biochem 7：51-77, 1996)。如本文所使用，"TNFR"或"TNFR多肽"係指能夠與TNF- α 或LT- α 結合

之多肽；TNFR多肽之具體實例為TNFR2及TNFR1。如本文所使用，"結合"或"配位體結合"或"具有配位體結合活性"意謂當為單體形式時以至少 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 之親合性(即以抑制常數或 K_i)與諸如TNF- α 或LT- α 之配位體結合，或在另一實施例中，當為單體形式時以至少 $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 之親合性結合，或在另一實施例中，當為多聚體時(例如二聚體或三聚體)以至少 $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 之親合性結合，或當為多聚體形式時(例如二聚體或三聚體)以至少 $8 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 之親合性結合。TNFR2多肽或其變體之TNF- α -結合親合性(抑制常數)可使用結合檢定來確定，例如如下實例6所示之檢定(亦參見Mohler等人，1993, J Immunol 151: 1548-1561及Peppel等人，1991, J Exp Med 174: 1483-1489)。類似檢定相似地可用來確定TNFR2多肽或其變體對LT- α 或任何其他潛在配位體之結合親合性。如本文所使用"TNFR相關"係指與TNFR多肽胺基酸序列相似或三維結構相似的相關多肽，但其不必與TNF- α 或LT- α 結合。TNFR相關多肽之實例為CD40(Swiss-Prot Database Accession Number P25942)及OX40(Swiss-Prot Database Accession Number P43489)多肽。

TNFR1及一些TNFR相關多肽之三維結構已測定出；例如，p55 TNFR1之細胞外域已結晶且已提交至蛋白質資料庫(PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>)登錄號為1EXT，且與其配位體LT- α 相關聯之p55 TNFR1多肽已作為1TNR提交PDB。同樣，在Structural Classification of Proteins資源中(SCOP, scop.berkeley.edu)，定義SCOP TNF受體類蛋白質折

疊之 TNFR 及 TNFR 相關多肽結構上相關，其共用具有至少三個相似富二硫化物域的細胞外域。例如，如 SEQ ID NO: 1 所示 TNFR2 具有四個該等域，最多 N 末端三個域共用經保存半胱胺酸殘基之特徵圖案，該等殘基涉及二硫鍵之形成。四個富二硫化物域位於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 39 至 76，位於胺基酸 77 至 118，位於胺基酸 119 至 162，及位於胺基酸 163 至 201。二硫鍵形成於下列胺基酸位置之半胱胺酸殘基對之間：40 與 53、54 與 67、57 與 75、78 與 93、96 與 110、100 與 118、120 與 126、134 與 143、137 與 161 及(第四域中) 164 與 179；第四二硫鍵域亦含有另一位於 SEQ ID NO: 1 胺基酸 184 與 200 之半胱胺酸殘基對。

TNFR2 多肽及其變體可使用例如 GeneFold(Triplos, Inc., St. Louis, MO; Jaroszewski 等人, 1998, Prot Sci 7: 1431-1440) 之電腦程式，蛋白資料庫(PDB)內將查詢蛋白質序列覆蓋在結構代表物上之蛋白質穿過程式(protein threading program)(Berman 等人, 2000, Nucleic Acids Res 28: 235-242)來分析其與結構上特徵化之 TNFR 多肽及 TNFR 相關多肽的三維相似性。為使用 GeneFold 來評價 TNFR2 多肽或其變體之結構，多肽序列進入該程式，其賦予一可能分值，該分值反映其折疊於已知蛋白質結構("模板"結構)上之程度，該等結構存在於基因折疊(GeneFold)資料庫中。為了給分，基因折疊依賴於初級胺基酸序列相似性、殘基之埋入圖案、局部相互作用，及二級結構比較。基因折疊程式可折疊(或穿過)胺基酸序列至所有蛋白質折疊資料庫之模

板結構上，其包括幾種人類 TNFR 多肽，例如 p55 TNFR1(模板 "ltmrR" 及 TNFR 相關多肽 CD40(模板 "lcdf_") 之溶解結構。對於每次比較，計算三種不同分值，其基於(i)僅序列；(ii)序列加上局部構型參數選擇加上埋入期限；及(iii)序列加上局部構型參數加上埋入期限加上二級結構。在每種情況下，該程式決定其最佳比對，計算該比對程度偶然出現之可能性(P值)，且報導P值之倒數作為分值。該等分值因此反映查詢多肽序列匹配各種參照結構(例如 TNFR 多肽結構)之程度。當使用 GeneFold 來比較 TNFR2 多肽或其變體(查詢多肽)與其他 TNFR 或 TNFR 相關多肽時，查詢多肽將與 lcdf_、ltmrR 或另一 TNFR 或 TNFR 相關模板匹配作為三個得分類別中之一的最高分，及/或與 TNFR 模板以至少 500，或至少 700，或至少 900，或至少 990，或 999.9(最大分值)之任何分值匹配。另一分析 TNFR2 多肽或其變體之方法為用彼等 TNFR 或 TNFR 相關蛋白質藉由同源模型之熟知方法來比對查詢多肽之結構。一種可用於同源模型之有用軟體程式係獲自 Accelrys, PharmacoPeia Inc. 子公司 (Princeton, NJ) 之 "模型者" 程式。

用於結晶化之 TNFR2 多肽包含 SEQ ID NO: 1 之至少一部分細胞外區域之 TNFR2 多肽及其變體。在特定實施例中，TNFR2 多肽之全部細胞外區域包括於 TNFR2 多肽中。作為特定實例，TNFR2 多肽可包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 28 至 257，或胺基酸 27 至 257，或胺基酸 23 至 257。在其他實施例中，將 TNFR2 多肽之細胞外區域截斷以刪除至少一潛在 N-

鏈結之糖基化位元點(例如 SEQ ID NO: 1之胺基酸 171及 193)及/或富脯胺酸區域(例如 SEQ ID NO: 1之胺基酸 24至 36或 SEQ ID NO: 1之胺基酸 217至 261)，但留下完整的最多三個具有分子內二硫橋鍵之N-末端域。例如，在一實施例中，TNFR2多肽包含 SEQ ID NO: 1之胺基酸 39至 162，或 SEQ ID NO: 1之胺基酸 39至 179，或 SEQ ID NO: 1之胺基酸 39至 200，或任何前述變體。

根據本發明用於結晶化之TNFR2多肽包括胺基酸序列長度為 SEQ ID NO: 1之TNFR2多肽之長度的至少 20%(或至少 25%，或至少 30%，或至少 35%，或至少 40%，或至少 50%)之多肽，且具有與彼TNFR2多肽至少 60%之序列一致性(或至少 70%，或至少 75%，或至少 80%，或至少 85%，或至少 90%，或至少 95%，或至少 97.5%，或至少 99%，或至少 99.5%)。本發明亦包括TNFR2多肽及多肽片斷，其含有包含至少 80，或至少 90，或至少 100，或至少 110，或至少 120，或至少 130個 SEQ ID NO: 1之鄰接胺基酸的區段，或其變體。該等多肽及多肽片斷亦可含有與 SEQ ID NO: 1之TNFR2多肽共用至少 70%序列一致性(或至少 70%，或至少 75%，或至少 80%，或至少 85%，或至少 90%，或至少 95%，或至少 97.5%，或至少 99%，或至少 99.5%)的區段。

當使該等TNFR2多肽之變體結晶時，可考慮幾個方面來指導熟習此項技術者製造保持諸如TNF- α -結合活性之生物活性的變體。在特定實施例中，需要保持至少三個N-末端二硫鍵區，或至少所有上述 SEQ ID NO: 1之TNFR2多肽

之四個二硫鍵區。此外，可擴充涵蓋N-末端三個二硫鍵區的TNFR2細胞外域之部分以包括所有或部分第四個二硫鍵區，且在特定實施例中不包括第四個二硫鍵區的任何半胱胺酸，或包括第四個二硫鍵區之包含第一對半胱胺酸(位於SEQ ID NO：1之胺基酸164及179)的區域，及/或包括第四個二硫鍵區之包含第二對半胱胺酸(位於SEQ ID NO：1之胺基酸185及200)的區域。因此，涵蓋於本發明之範疇中的變體保留半胱胺酸殘基，該殘基涉及該等域之二硫鍵的形成，且亦在彼等半胱胺酸之間保留近似的間距(意即初級胺基酸序列之殘基數目)。例如，在形成二硫鍵之半胱胺酸對之間並不插入或刪除五個以上胺基酸的變體在本發明之範疇內，同樣在該等半胱胺酸之間不插入或刪除四個以上胺基酸的變體、及在該等半胱胺酸之間不插入或刪除三個以上胺基酸的變體、在該等半胱胺酸之間不插入或刪除兩個以上胺基酸的變體、在該等半胱胺酸之間不插入或刪除一個以上胺基酸的變體亦在本發明之範疇內。

另一將指導熟習此項技術者製造TNFR2多肽之變體的考慮為所製得之胺基酸取代物的特性；該等取代物可為保守取代物，意謂存在於變體中特定位置之胺基酸與未改變之TNFR2多肽中相應位置之胺基酸具有相同的化學及/或尺寸特性。表2總結認為具有相似特性的胺基酸群，以至於用表2相同列之另一胺基酸取代任何胺基酸的取代物將為保守取代物。在特定實施例中，TNFR2多肽變體在沿著SEQ ID NO：1之胺基酸39至162長度方向上，或SEQ ID NO：1之胺

基 酸 39 至 179 長 度 方 向 上 ， 或 SEQ ID NO：1 之 胺 基 酸 39 至 200 長 度 方 向 上 具 有 20% 或 更 少 胺 基 酸 取 代 物 (或 15% 或 更 少 ， 或 10% 或 更 少 ， 或 7.5% 或 更 少 ， 或 5% 或 更 少 ， 或 2.5% 或 更 少 ， 或 1% 或 更 少) 。 在 特 定 實 施 例 中 ， TNFR2 多 肽 變 體 在 沿 著 SEQ ID NO：1 之 胺 基 酸 39 至 162 長 度 方 向 上 ， 或 SEQ ID NO：1 之 胺 基 酸 39 至 179 長 度 方 向 上 ， 或 SEQ ID NO：1 之 胺 基 酸 39 至 200 長 度 方 向 上 具 有 20% 或 更 少 保 守 胺 基 酸 取 代 物 (或 15% 或 更 少 ， 或 10% 或 更 少 ， 或 7.5% 或 更 少 ， 或 5% 或 更 少 ， 或 2.5% 或 更 少 ， 或 1% 或 更 少) 。

在 特 定 實 施 例 中 ， 待 結 晶 之 TNFR2 多 肽 或 其 變 體 具 有 TNF- α - 結 合 活 性 ， 且 / 或 LT- α - 結 合 活 性 。

表 2

保守胺基酸取代物

鹼 性：	精 胺 酸； 離 胺 酸； 組 胺 酸
酸 性：	穀 胺 酸； 天 冬 胺 酸
極 性：	穀 胺 醯 胺； 天 冬 醯 胺
疏 水 性：	亮 胺 酸； 異 亮 胺 酸； 纈 胺 酸
芳 香 性：	苯 丙 胺 酸； 色 胺 酸； 酪 胺 酸
小：	甘 胺 酸； 丙 胺 酸； 絲 胺 酸； 蘇 胺 酸； 蛋 胺 酸

TNFR2 稠合蛋白質

在 特 定 實 施 例 中 ， 用 於 本 發 明 之 結 晶 化 方 法 的 TNFR2 多 肽 包 括 與 部 分 Ig(免 疫 球 蛋 白) 多 肽 或 其 變 體 稠 合 之 TNFR2 多 肽 ， 視 情 況 在 TNFR2-Ig 稠 合 多 肽 之 TNFR2 部 分 與 Ig 部 分 間 存 在 多 肽 連 接 體 。 (當 可 選 多 肽 連 接 體 存 在 於 TNFR2 稠 合

多肽中時，其在長度上可與一個胺基酸同樣短。)免疫球蛋白(Ig)多肽與胺基酸序列有關且亦與三維結構有關。如SCOP中定義，多肽之Ig超家族為具有蛋白質折疊"免疫球蛋白類 β 夾層"之蛋白質的子集，該夾層一般描述為具有在兩片層中排列七股之夾層，分管一些該折疊之成員具有額外股。將Ig超家族細分為蛋白質域的四個家族：V集合域(抗體可變域類)；C1集合域(抗體恒定域類)；C2集合域；及I集合域。

TNFR2-Ig稠合多肽包含至少一部分Ig多肽，例如，Ig多肽之恒定區的至少10個連續胺基酸，或包含至少14個胺基酸之多肽，該多肽在長度上與Ig多肽之恒定區的至少20個連續胺基酸共用至少70%胺基酸一致性。本發明之TNFR2-Ig稠合多肽較佳可包含至少一重鏈恒定區且在特定實施例中可包含至少一輕鏈恒定區。

在特定實施例中，Ig多肽包含IgG類型重鏈或片斷及/或其變體之恒定區，且在其他實施例中，其他免疫球蛋白同種型之恒定區可用於產生該等TNFR2-Ig稠合物。例如，包含IgM類型重鏈或片斷及/或其變體之恒定區的TNFR2-Ig稠合多肽可用於產生十價型TNFR2-Ig稠合多肽。SEQ ID NO：2所提供之人類IgG1種類重鏈恒定域之具體實例為免疫球蛋白重鏈之恒定區包含CH1域(SEQ ID NO：2之胺基酸1至98)、鉸鏈區(SEQ ID NO：2之胺基酸99至110)、CH2域(SEQ ID NO：2之胺基酸111至223)及CH3域(SEQ ID NO：2之胺基酸224至330)。SEQ ID NO：3提供IgG1種類重鏈恒定域之

變體的具體實例，其中兩種胺基酸取代物已產生(Glu已在位置239取代Asp，且Met已在位置241取代Leu)。本發明之特定實施例包括包含所有或部分細胞外域之TNFR2多肽(SEQ ID NO：1)(其與所有或部分SEQ ID NO：2或SEQ ID NO：3稠合)的TNFR2-Ig稠合多肽，視情況在TNFR2-Ig稠合多肽之TNFR2部分與Ig部分之間存在連接體多肽。在本發明之其他實施例中，包含至少部分之CH₁的重鏈恒定區係TNFR2-Ig稠合多肽之Ig部分。特定實施例亦可包括(例如)C-末端半鉸鏈區以在重鏈之間提供二硫橋鍵。在本發明之特定實施例中，TNFR2多肽係共價連接(視情況經由多肽連接體)至重鏈恒定域之至少部分之CH₁區的N末端以形成TNFR2-Ig稠合多肽。

在其他特定實施例中，至少部分鉸鏈區連接至CH₁區。作為一實例，CH₁及CH₂存在於分子中，且整個鉸鏈區亦存在。作為另一實例，CH₁連同鉸鏈(SEQ ID NO：2或3之胺基酸99至105)之首先七個胺基酸一起存在。熟習此項技術者將瞭解本發明之TNFR2-Ig稠合多肽可為(例如)單體或二聚體，且若需要二聚體TNFR2-Ig稠合多肽，重要的是包括在重鏈之間二硫鍵之形成中所蘊涵的部分鉸鏈區(例如，包括SEQ ID NO：2或3之胺基酸109之SEQ ID NO：2或3之部分胺基酸99至110)。在本發明其他實施例中，TNFR2-Ig稠合多肽可包含部分CH3域，其不包括C-末端離胺酸殘基(SEQ ID NO：2或3之胺基酸330)，已觀測到該殘基在Ig重鏈多肽之轉譯後處理中被移除。

Fc域

如本文所使用之Fc可含有一或全部上述重鏈CH1、鉸鏈、CH2及CH3域，或片斷或其變體，且可為藉由包含Fc域之TNFR2-Ig稠合多肽之組份所確定之單體、二聚體或多聚體。

根據本發明具體涵蓋用於結晶化之特定多肽包括包含至少部分Fc域之TNFR2-Ig稠合多肽。較佳適於治療人類及其他哺乳動物之疾病的TNFR2多肽為TNFR2：Fc，其在本文中用來指與免疫球蛋白多肽之Fc部分稠合之TNFR2多肽或其變體之所有或部分細胞外域，視情況在TNFR2：Fc多肽之TNFR2部分與Fc部分之間存在多肽連接體。

其他多聚化域

本發明之多聚體包括用於結晶化之TNFR2多肽，其中TNFR2多肽為二聚體、三聚體、十聚體或其他多聚體形式。另一製備本發明之多聚體的方法涉及使用亮胺酸拉鏈。發現於多肽中之亮胺酸拉鏈域為促進該等多肽寡聚作用之肽。亮胺酸拉鏈最初在幾種DNA結合之多肽中識別出來(Landschulz等人，Science 240：1759, 1988)，且已經在各種不同多肽中發現。已知亮胺酸拉鏈為天然產生之肽及其二聚化或三聚化之衍生物。拉鏈域(此處亦指多聚化域或多聚體形成域)包含重複性的七個為一組之重複，通常用其他胺基酸來點綴四或五個亮胺酸殘基。亮胺酸拉鏈之用途及使用亮胺酸拉鏈製備多聚體在此項技術中為人熟知。其他多聚化域包括發現於肺介面活性劑D蛋白質中之三聚化域

(Kovacs等人，2002, J Biomol NMR 24: 89-102)及此項技術中已知的其他域。

依那西普

在一實施例中，已結晶之TNFR2多肽為"依那西普"，其為兩種各自由235個胺基酸組成之多肽的二聚體，該等多肽衍生自細胞外部分之TNFR2多肽(其稠合至232個胺基酸部分的人類IgG1)。依那西普之單體組份的胺基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。在該分子之二聚體形式中，該等稠合多肽(或"單體")中之兩者藉由三個二硫鍵結合在一起，二硫鍵在兩個單體之間的免疫球蛋白部分間形成。依那西普二聚體因此由934個胺基酸組成，且具有大約為150千道爾頓(kilodalton)的表觀分子量(Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc., pp. 1752-1755)。依那西普目前以商標名ENBREL[®]出售(Amgen Inc., Thousand Oaks, CA)。

糖基化及接合

本發明包括與天然模式之糖基化作用相關或不相關的本發明之TNFR2多肽。表現於酵母或哺乳動物表現系統(例如COS-1或CHO細胞)中之多肽視表現系統之選擇而定可與天然人類多肽在分子量及糖基化模式上相似或顯著有別。本發明之多肽在細菌表現系統中的表現(例如大腸桿菌)提供非糖基化分子。此外，給定製劑可包括多肽之多重差異糖基化物質。糖基可經由習知方法移除，詳言之為彼等利用糖肽酶之方法。一般而言，本發明之糖基化多肽可用一莫

耳過量糖肽酶(Boehringer Mannheim)來培育。

如本文所述用於結晶化及用來治療之TNFR2多肽可與聚乙二醇接合(聚乙二醇化)以延長其血清半衰期或提高蛋白質投遞。衍生自TNFR p55之聚乙二醇化之TNFR多肽的實例為重組之與聚乙二醇接合的可溶解TNFR p55(PEG-s TNFR 類型I)，其含有TNFR p55之細胞外域；TNFR2多肽及其片斷可與聚乙二醇以相似方式來接合。用於多肽聚乙二醇化之試劑及方法描述於(例如)WO 92/16221；WO 99/102330；及U.S. 專利號為Nos. 6,420,339；6,433,158；6,441,136；6,451,986；6,548,644；及6,552,170的專利中；所有上述專利以引用的方式並入本文中。

本發明亦涵蓋與細胞毒性物質或發光物質接合之TNFR2多肽之晶形。該等物質包括：美登素(maytansine)衍生物(例如DM1)；腸毒素(例如葡萄球菌素腸毒素)；其他毒性蛋白質及化合物(例如蓖麻毒素-A(Ricin-A)、假單胞菌毒素、白喉毒素、道諾黴素(daunorubicin)、阿黴素(doxorubicin)、甲胺喋呤(methotrexate)及絲裂黴素C)；碘同位素(例如碘-125)；鐳同位素(例如Tc-99m)；其他同位素(^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 及 ^{90}Y)；花青(cyanine)螢光物(例如Cy5.5.18)；及核糖體-非活性多肽(例如波甘寧(bouganin)、介樂寧(gelonin)或沙泊寧(saporin)-S6)。

生成並純化用於結晶化之多肽

TNFR2多肽可藉由表現多肽之活性宿主細胞(例如已遺傳設計來生成多肽之宿主細胞)來生成。遺傳設計細胞來生

成多肽之方法在此項技術中為人熟知。參見例如 Ausubel 等人於 Molecular Biology 中編著 (1990) 之 Current Protocols(Wiley, New York)。該等方法包括引入核酸，核酸編碼且容許表現多肽於活性宿主細胞中。該等宿主細胞可為培養生長中的細菌細胞、真菌細胞、昆蟲細胞或動物細胞。細菌宿主細胞包括(但不限於)大腸桿菌細胞。適當之大腸桿菌株的實例包括：HB101、DH5 α 、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539及任何不能裂解異質DNA之大腸桿菌株。可供使用之真菌宿主細胞包括(但不限於)釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、甲醇酵母 (*Pichia pastoris*)及曲黴菌細胞。動物細胞株可供使用之少量實例為 CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3及 WI38。新穎動物細胞株可使用熟習此項技術者所熟知的方法來建立(例如，藉由轉換、病毒感染，及/或選擇)。宿主細胞視情況可分泌多肽至介質中。

經表現之 TNFR2 多肽之純化可藉由標準方法來執行。當 TNFR2 多肽在細胞內生成時，將微粒碎片 (particulate debris) 藉由(例如)離心或超過濾來移除。當多肽分泌至介質中時，自該等表現系統之上清液可首先使用標準多肽濃度篩檢程式來濃縮。亦可加入蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解且包括抗生素以預防微生物生長。為了獲得所要多肽構型，可在陪伴蛋白或輔助蛋白存在下生成 TNFR2 多肽，或為了誘發多肽構型重新折疊或變化，使 TNFR2 在生成後經受例如氧化及/或還原條件的條件(參見例如，WO 02/068455)。

TNFR2多肽可使用(例如)羧磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析法及親合層析法，及任何已知或仍待發現之純化技術的組合來純化。例如，蛋白質A可用來純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之TNFR2-Ig多肽(Lindmark等人，1983, J. Immunol. Meth. 62: 1-13)，其中TNFR2-Ig稠合多肽之Ig部分含有涉及結合於蛋白質A的恒定域部分。向所有小鼠同種型及人類 $\gamma 3$ 推薦蛋白質G(Guss等人，1986, EMBO J. 5: 1567-1575)。可根據需要使用其他用於TNFR2多肽純化的技術，包括(但不限於)經離子交換管柱分餾、用乙醇或其他醇類沈澱、逆相HPLC、FPLC、經矽石層析法、經肝素SEPHAROSE™層析法、經陰離子或陽離子交換樹脂層析法(例如聚天冬氨酸管柱)、疏水性相互作用層析法、層析聚焦法、SDS-PAGE，且硫酸銨沈澱亦可根據需要使用。

晶體生成、晶體調配物及組合物：

多肽晶體係藉由自水溶液或含有機溶劑或添加劑的水溶液之多肽的受控結晶化來生長。可控制的溶液條件包括(例如)溶劑、有機溶劑或添加劑之蒸發率，適當助溶質(co-solute)及緩衝液的存在，pH值及溫度。影響蛋白質結晶化的各種因子的綜合評論已由McPherson出版，1985, Methods Enzymol 114: 112-120。此外，McPherson及Gilliland, 1988, J Crystal Growth, 90: 51-59已編輯了已結晶之多肽以及其結晶條件的綜合列表。晶體及結晶化配方之概要以及已解決之蛋白質結構的座標庫藉由Brookhaven National Laboratory的蛋白質資料庫來保存(www.rcsb.org/pdb/;

Bernstein等人，1977, J Mol Biol 112: 535-542)。可使用該等參考文獻來決定多肽結晶化所需條件，作為形成適當多肽晶體的前奏且可指導其他多肽的結晶化策略。但是應當注意大多數上述參考文獻所報導之條件已最優化以得到(在大多數情況下)少量大的、繞射品質晶體。因此，熟習此項技術者應當瞭解有必要對該等條件作一定程度的調整以提供高產率方法從而用於多肽晶體的大規模生產。

一般而言，藉由組合待結晶之多肽與適當水性溶劑或含有適當結晶化試劑(例如鹽)之水性溶劑或有機溶劑或添加劑來結晶化生成晶體。該溶劑與多肽組合且可在藉由實驗所決定之溫度下經受攪拌，以適於誘發結晶化且可接受保持多肽活性及穩定性。該溶劑可視情況包括助溶質，例如二價陽離子、輔助因子或離液劑(chaotrope)，以及緩衝液物質來控制pH值。用於結晶化之"助溶質手段"包括可提供助溶質以促進多肽結晶化之化合物。助溶質手段的實例包括乙酸銨、氯化銨、氟化銨、甲酸銨、硝酸銨、磷酸銨、硫酸銨、氯化鎘、硫酸鎘、乙酸鈣、氯化鈣、氯化銻、氯化亞鈷、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Br}^-$ (CTAB)、檸檬酸二銨、磷酸氫二銨、磷酸二銨、酒石酸二銨、磷酸二鉀、磷酸二鈉、酒石酸二鈉、DL-蘋果酸、氯化鐵、L-脯氨酸、乙酸鋰、氯化鋰、硝酸鋰、硫酸鋰、乙酸鎂、氯化鎂、甲酸鎂、硝酸鎂、硫酸鎂、氯化鎳、乙酸鉀、溴化鉀、氯化鉀、檸檬酸鉀、氟化鉀、甲酸鉀、硝酸鉀、磷酸鉀、酒石酸鈉鉀、硫酸鉀、硫氰酸鉀、乙酸鈉、溴化鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、

氯化鈉、甲酸鈉、丙二酸鈉、硝酸鈉、磷酸鈉、硫酸鈉、硫氰酸鈉、丁二酸、他希美特(tacsimate)、檸檬酸三銨、檸檬酸三鋰、N-氧化三甲胺、檸檬酸三鉀、檸檬酸三鈉、乙酸鋅、硫酸鋅及其他功能為提供助溶質之化合物。"結晶化緩衝手段"包括保持溶液pH值在所需範圍內以促進多肽結晶化的化合物。結晶化緩衝手段之實例包括ACES (N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙磺酸)、BES(N,N-雙(2-羥乙基)-2-胺基乙磺酸)、二甘胺酸(N,N-雙(2-羥乙基)甘胺酸)、BIS-TRIS(2,2-雙-(羥甲基)-2,2',2''-次氮基三乙醇)、硼酸、CAPS(3-[環己胺基]-1-丙烷-磺酸)、EPPS(HEPPS, 4-(2-羥乙基)六氫吡啶-1-丙磺酸)、Gly-Gly(NH₂CH₂CONHCH₂COOH, 甘胺醯甘胺酸)、HEPES(4-(2-羥乙基)六氫吡啶-1-乙磺酸)、咪唑、MES(2-嗎啉基乙磺酸)、MOPS(3-(N-嗎啉基)-丙磺酸)、PIPES(六氫吡啶-1,4-雙(2-乙磺酸))、乙酸鈉、重碳酸鈉、磷酸鈉單價鹼(磷酸二氫鈉)、TAPS(N-[三-(羥甲基)甲基]-3-胺基丙磺酸)、TAPSO(N-[三(羥甲基)甲基]-3-胺基-2-羥基丙磺酸)、TES(N-[三(羥甲基)甲基]-2-胺基乙磺酸)、Tricine(N-[三(羥甲基)甲基]甘胺酸)、Tris-HCl、TRIZMA(2-胺基-2-(羥甲基)-1,3-丙二醇)及其他功能為將溶液保持在指定pH值左右的化合物。

助溶質、緩衝液等的需要及其濃度通過實驗來確定從而促進結晶化。一些適於多肽之結晶化條件的實例如下在實例1、2及3中描述。

在工業規模的方法中，導致結晶化的受控沈澱最佳可藉

由簡單組合多肽、沈澱劑、助溶質及視情況之緩衝液在分批過程中進行。作為另一種選擇，可使用多肽沈澱物作為起始材料("晶種")來結晶化。在該情況下，將多肽沈澱物添加至結晶化溶液並培育直至晶體形成。替代之實驗室結晶化方法亦可採用，例如透析或氣相擴散。McPherson, *supra* 及 Gilliland, *supra* 在其結晶化文獻之評論中包括適當條件之綜合列表。偶爾在將結晶化多肽交聯之情況下，預期之交聯劑與結晶化介質之間的不相容可能要求交換晶體至更適當之溶劑系統。

根據本發明之一實施例，多肽晶體、晶體調配物及組合物藉由下列方法來製備：首先，將多肽結晶化。其次，將賦形劑或本文所述成份直接添加至母液。或者，在母液移除最少1小時最多24小時後，將晶體懸浮在賦形劑或其他調配成份之溶液中。賦形劑濃度通常在約0.01至30% W/W之間，該濃度分別對應於多肽晶體濃度99.99%至70% W/W。在一實施例中，賦形劑濃度在約0.1至10%之間，該濃度分別對應於晶體濃度99.9%至90% W/W。可藉由過濾或離心方法自晶體漿料移除母液。隨後，視情況用50%至100%一或多種有機溶劑或添加劑(例如乙醇、甲醇、異丙醇或乙酸乙酯)之溶液在室溫下或溫度-20°C至25°C之間來洗滌晶體。藉由將氮氣流、空氣流或惰性氣體流通過晶體來使晶體乾燥。或者，晶體藉由空氣乾燥法(*air drying*)或藉由凍幹法或藉由真空乾燥法來乾燥。在洗滌後進行最少1小時至最多72小時的乾燥，直至最終產物的濕含量低於10重量%，最

佳低於5%。最後，若有必要則可執行晶體微粉化。多肽晶體之乾燥係藉由以下方法來移除水、有機溶劑或添加劑，或液態聚合體，該等方法包括用 N_2 、空氣或惰性氣體乾燥；真空爐乾燥；凍幹法；用揮發性有機溶劑或添加劑洗滌，隨後蒸發溶劑；或在通風櫥中蒸發。通常當晶體成為自由流動粉末時達成乾燥。可藉由將氣體流通過濕晶體來進行乾燥。氣體可選自由下列各物組成之群：氮、氫、氦、二氧化碳、空氣或其組合。本發明之多肽晶體可進一步藉由在適當碾磨機(例如噴射碾磨機)中微粉化來處理以達成所需之粒子尺寸分佈，且粒子或粉末調配物之組份可在微粉化之前或之後混合。所達成之粒子直徑可在0.1至100微米範圍內，或在0.2至10微米範圍內，或在10至50微米範圍內，或在0.5至2微米範圍內。對於藉由吸入法待投與之調配物而言，在一實施例中自多肽晶體形成的粒子在0.5至1微米範圍內。

根據本發明之一實施例，當製備蛋白質晶體時，在結晶化期間並不添加蛋白質晶體調配物或組合物、增強劑，例如介面活性劑。在結晶化後添加賦形劑或成份至母液，濃度在約1-10% W/W之間，或者在濃度約0.1-25% W/W之間，或者在濃度0.1-50% W/W之間。該等濃度分別對應於晶體濃度99-90% W/W、99.9-75% W/W及99.9-50% W/W。將賦形劑或成份與晶體在母液中培育約0.1-3小時，或者進行0.1-12小時培育，或者進行0.1-24小時培育。

在本發明之另一實施例中，將成份或賦形劑在溶液中而

非母液中溶解，將蛋白質晶體自母液移除且懸浮於賦形劑或成份溶液中。成份或賦形劑濃度及培育時間與上述相同。

多肽晶體

如本文所使用"晶體"或"晶性"係指一種固態形式的物質，其與第二種形式-非晶體固態截然不同。晶體顯示特徵要素，包括晶格結構、特徵形狀及光學特性例如折射指數及雙折射。晶體由三維空間中以周期性重複之圖案所排列的原子組成(C. S. Barrett, Structure of Metals, 第二版, McGraw-Hill, New York, 1952, p.1)。相反，非晶體材料為非晶性固態形式物質，有時係指非晶體沈澱物。該等沈澱物不具有晶性固態之分子晶格結構特徵且不顯示雙折射或其他晶形物質之典型的光譜特徵。

多肽晶體係以晶格排列的多肽分子。多肽晶體含有在三維空間中周期性重複的特異性多肽-多肽相互作用圖案。本發明之多肽晶體與多肽之非晶體固態形式或沈澱物有別，諸如由凍幹多肽溶液所獲得之多肽。

在多肽晶體中，多肽分子形成非對稱單元，其排列在一起形成對稱單元。多肽晶體之對稱單元的幾何結構可為立方形、六邊形、單斜晶系、斜方晶系、四方晶系、三斜晶系或三角形。完整晶體的總體結構可為雙錐形、立方形、針形、盤形、棱形、偏菱形、杆形或球形或其組合。"立方形"結構類之晶體更加特定具有十八面體或十二面體晶形。晶體直徑定義為馬丁(Martin)直徑。其量測為平行於視覺尺度之線的長度，該線將隨機化取向之晶體劃分為兩相

等投影面積。諸如針形或杆形之晶體亦會具有本文所指的
最大直徑作為晶體長度。

用於治療投藥之調配物

如本文所使用之"組合物"理解為意謂包含至少兩種組份
的混合物。詳言之，本發明提供包含晶性TNFR2多肽之組
合物，或使用晶性TNFR2多肽所製備之組合物。在本發明
之一實施例中，製備包含晶性TNFR2多肽或使用晶性
TNFR2多肽所製備之組合物或調配物使得其適用於注射及
/或投與需要其的患者。為醫藥學目的投與患者之組合物大
體上無菌且並不含有任何對受體有不當毒性或易使其感染
的試劑。

在本發明之一實施例中，晶性TNFR2多肽(例如晶性依那
西普)以生理學上可接受之組合物形式(本文亦稱作醫藥組
合物或醫藥調配物)來投與，其包含用一或多種下列各物調
配之晶性TNFR2多肽：生理學上可接受之載劑、賦形劑或
稀釋劑。該等載劑、賦形劑或稀釋劑所採用之劑量及濃度
對受體無毒。通常該等組合物之製備需要將晶性TNFR2多
肽與一或多種下列各物組合：緩衝液、抗氧化劑(例如抗壞
血酸)、低分子量多肽(例如彼等具有小於10個胺基酸之分
子)、蛋白質、胺基酸、碳水化合物(例如葡萄糖、蔗糖或糊
精)、螯合劑(例如EDTA)、穀胱胺肽及其他穩定劑及賦形
劑。在液體調配物中，中性緩衝鹽或與同種血清白蛋白所
混合之鹽為例示性之適用稀釋劑。根據適當的工業標準，
亦可添加防腐劑，例如苺醇。其他可以醫藥調配物形式採

用之組份的實例呈現於以下資料：Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980及Handbook of Pharmaceutical Excipients, 由American Pharmaceutical Association及Pharmaceutical Society of Great Britain聯合出版。

在一實施例中，涵蓋本發明之調配物以大量調配物來製備，且因而調整醫藥組合物之組份使得其高於投藥要求，並在投藥之前適當地稀釋。

本發明之多肽晶體可調配為適於儲存與處理及適於吸入投藥或肺部投藥的固態晶性或粉末調配物形式，例如以用於製備氣溶膠調配物之粉末形式。在其他實施例中，多肽晶體可調配為該等晶體之液態溶液，或該等晶體之漿料。在另一實施例中，多肽晶體用來製備用於治療投藥之液態調配物，例如水性調配物。

固態晶性調配物

晶體之固態調配物理想地適合於肺部投藥，其特別用於難以藉由其他投藥途徑投遞之生物學高分子。(例如參見PCT專利申請案WO 96/32152、WO 95/24183及WO 97/41833)。

多肽晶體之固態調配物包括已大體上自液態溶液離析或乾燥之晶體，且以自由晶體或以(例如)粉末形式之粒子呈現。本文中之表述"粉末"係指基本上乾燥之粒子的集合，意即，濕含量低於約10重量%，或低於約6重量%，或低於約4重量%。在一實施例中本發明提供氣溶膠化一定劑量晶

性 TNFR2 多肽之方法，其包含提供乾燥粉末之晶性 TNFR2 多肽，將一定量乾燥粉末分散至氣流中形成氣溶膠，且將氣溶膠捕捉至一腔室中用於隨後的吸入。

多肽晶體或粉末可視情況與載劑或介面活性劑組合。適當載劑包括 1) 碳水化合物，例如單糖(例如果糖、半乳糖、葡萄糖、山梨糖及其類似物)；2) 二糖(例如乳糖、海藻糖及其類似物)；3) 多糖(例如棉子糖、麥芽糊精、葡聚糖及其類似物)；4) 糖醇(例如甘露糖醇、木糖醇及其類似物)；5) 無機鹽(例如氯化鈉及其類似物)；及 6) 有機鹽(例如檸檬酸鈉、抗壞血酸鈉及其類似物)。在特定實施例中，載劑係選自由下列各物組成之群：海藻糖、棉子糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、肌醇、蔗糖、氯化鈉及檸檬酸鈉。介面活性劑可選自由脂肪酸鹽、膽汁鹽或磷脂組成之群。脂肪酸鹽包括 C₁₀₋₁₄ 脂肪酸之鹽，例如癸酸鈉、月桂酸鈉及肉豆蔻酸鈉。膽汁鹽包括熊去氧膽酸(ursodeoxycholate)鹽、牛磺膽酸鹽、甘膽酸鹽及牛磺二氫夫西地酸鹽(Taurodihydrofusidate)。在一實施例中，介面活性劑係牛磺膽酸鹽，例如牛磺膽酸鈉。可用作介面活性劑之磷脂包括溶血磷脂醯膽鹼(lysophosphatidylcholine)。晶性多肽與介面活性劑在本發明之粉末調配物中的莫耳比率為例如 9：1 至 1：9，或在 5：1 至 1：5 之間，或在 3：1 至 1：3 之間。

溶液或漿料中之晶體

在一實施例中，本發明提供一種使得多肽晶體適於儲存在懸浮液中之方法，其包含用非水性溶劑置換結晶化緩衝

液(母液)。在另一實施例中，藉由旋壓出第一溶劑及使用第二有機溶劑或添加劑洗滌剩餘晶性固體來移除水，隨後蒸發非水性溶劑，來使得晶性漿料固化。晶性治療性蛋白質之非水性漿料尤其適用於皮下投遞。

在一個該等實施例中，本發明之多肽晶體與液態有機添加劑組合，目的是穩定多肽晶體。該混合物特徵可為水性有機混合物，其包含n%有機添加物，其中n在1及99之間，且包含m%水性溶液，其中m為100-n。有機添加劑之實例包括酚類化合物，例如間-甲酚或苯酚或其混合物，及丙酮、甲醇、甲基異丁基酮、氯仿、1-丙醇、異丙醇、2-丙醇、乙腈、1-丁醇、2-丁醇、乙醇、環己烷、二惡烷、乙酸乙酯、二甲基甲醯胺、二氯乙烷、己烷、異辛烷、二氯甲烷、第三丁醇、甲苯、四氯化碳或其組合。

液態調配物

本發明之一實施例係針對水性調配物，其使得醫藥組合物長期穩定儲存，該醫藥組合物中晶性TNFR2多肽係用於製備醫藥組合物之活性成份。該調配物部分有用，因為患者使用更加方便，該調配物並不要求任何諸如再水化作用之額外步驟。如本文所使用，溶液或液態調配物意謂含有一或多種溶於適當溶劑或相互溶混之溶劑混合物之化學物質的液態製劑。

重建係將多肽晶體或晶體調配物或組合物溶解於適當緩衝液或醫藥調配物中。

醫藥調配物之組份

本醫藥組合物係藉由組合(除上述晶性TNFR2多肽之外)以下段落中所列舉之一或多種下列類型成份或賦形劑來製備，其中許多或全部可購自商業供應商。一般技術者將瞭解：組合包括在組合物中之各種組分可按照任何適當順序來完成，意即，緩衝液可在首先、當中或最後添加，且張力改質劑亦可在首先、當中或最後添加。一般技術者亦將瞭解某些該等化學物質在特定組合中不相容，且因而易以具有相似特性但在相關混合物中相容的不同化學物質取代。此項技術中已了解其中存在之賦形劑及其他成份或材料之各種組合的適宜性，例如，用來儲存醫藥組合物之容器及/或用來治療投藥之設備(例如參見Akers, 2002, J Pharm Sci 91: 2283-2300)。

酸化劑("酸化手段")：乙酸、冰醋酸、檸檬酸、反丁烯二酸、鹽酸、稀鹽酸、蘋果酸、硝酸、磷酸、稀磷酸、硫酸、酒石酸及其他適用之酸。

活性成份：額外活性成份亦可包括在本文所述組合物中(例如)以減輕注射處不適。該等活性成份包括(但不限於)適當劑量之非類固醇抗發炎藥，例如緩血酸胺。

氣溶膠推進劑("推進手段")：丁烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙烷、異丁烷、丙烷、三氯單氟甲烷。

聚集抑制劑("聚集抑制手段")降低多肽與不當或非吾人所樂見之三元或四元錯合物締合之趨勢。適當之聚集抑制劑包括胺基酸L-精胺酸及/或L-半胱胺酸，其可長時期做用以降低含有Fc域之多肽聚集，例如兩年或更長。聚集抑制

劑在調配物中的濃度可在約1 mM至1 M之間，或約10 mM至約200 mM之間，或約10 mM至約100 mM之間，或約15 mM至約75 mM之間，或約25 mM。

醇類變性劑("變性手段")：地那銨苯甲酸鹽(denatonium benzoate)、甲基異丁基酮、八乙酸蔗糖酯(sucrose octacetate)。

鹼化劑("鹼化手段")：強氨水溶液、碳酸銨、二乙醇胺、二異丙醇胺、氫氧化鉀、重碳酸鈉、硼酸鈉、碳酸鈉、氫氧化鈉、三乙醇胺。

抗結塊劑("抗結塊手段")：矽酸鈣、矽酸鎂、膠體二氧化矽、滑石。

防沫劑("防沫手段")：二甲聚矽氧烷(dimethicone)、聚二甲矽氧烷(simethicone)。

抗氧化劑("抗氧化手段")可包括在本發明之調配物中。涵蓋用於製備調配物之抗氧化劑包括胺基酸，例如甘胺酸及離胺酸；螯合劑，例如EDTA及DTPA；及自由基清除劑，例如山梨糖醇及甘露糖醇。額外抗氧化劑包括抗壞血酸、棕櫚酸抗壞血酸酯、丁基化羥基大茴香醚、丁基化羥基甲苯、次磷酸、單硫代甘油、沒食子酸丙酯、亞硫酸氫鈉、甲醛合次硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、硫代硫酸鈉、二氧化硫、生育酚及生育酚賦形劑。亦涵蓋用於抑制氧化的為氮或二氧化碳覆蓋物。可將氮或二氧化碳覆蓋物在填充期間引入小瓶或預填充之注射器的頂部空間。

緩衝液("調配物緩衝手段")將醫藥調配物pH值保持在所

需範圍內。當醫藥組合物之pH值設定在生理水平或其附近時，患者一旦經投藥舒適程度達到最大。詳言之，在特定實施例中，醫藥組合物之pH值在約4.0至8.4之pH值範圍內，或約5.0至8.0之pH值範圍內，或約5.8至7.4之pH值範圍內，或約6.2至7.0之pH值範圍內。應瞭解pH值可根據需要調整以使特定調配物中多肽之穩定性及溶解度最大化，且因而在生理範圍之外但患者仍可忍受的pH值亦在本發明之範疇內。各種適用於本發明之醫藥組合物的緩衝液包括組胺酸、鹼性鹽(磷酸鈉或鉀，或其氫鹽或二氫鹽)、檸檬酸鈉/檸檬酸、乙酸鈉/乙酸、檸檬酸鉀、馬來酸、乙酸銨、三-(羥甲基)-胺基甲烷(tris)，各種形式乙酸鹽及二乙醇胺、碳酸銨、磷酸銨、硼酸、乳酸、磷酸、偏磷酸鉀、磷酸二氫鉀、乳酸鈉溶液及任何其他此項技術中已知的醫藥學上可接受pH值之緩衝液。諸如鹽酸、氫氧化鈉或其鹽之pH值調節劑亦可包括在內以獲得所需pH值。一種適當緩衝液為磷酸鈉，其用來保持醫藥組合物pH值在6.2或附近。在另一實例中，乙酸鹽係在pH 5較pH 6更有效的緩衝液，所以在pH 5時較pH 6可使用較少乙酸鹽。調配物中緩衝液之濃度可在約1 mM至約1 M之間，或約10 mM至約200 mM之間。

螯合劑("螯合手段"，亦稱為錯隔劑)：乙二胺四乙酸二鈉、乙二胺四乙酸及鹽、依地酸(edetic acid)。

塗覆劑("塗覆手段")：羧甲基纖維素鈉、乙酸纖維素、鄰苯二甲酸醋酸纖維素、乙基纖維素、明膠、醫藥學凍膠、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素鄰

苯二甲酸酯、甲基丙烯酸共聚物、甲基纖維素、聚乙二醇、聚乙酸乙烯酯鄰苯二甲酸酯、蟲膠、蔗糖、二氧化鈦、巴西棕櫚蠟、微晶蠟、玉米蛋白。

顏料("染色手段")：焦糖；赤蘚紅(FD&C紅色No. 3)；FD&C紅色No. 40；FD&C黃色No. 5；FD&C黃色No. 6；FD&C藍色No. 1；紅色、黃色、黑色、藍色或混合色；氧化鐵。

錯合劑("形成錯合物之手段")：乙二胺四乙酸及鹽(EDTA)、依地酸、龍膽酸、乙醇胺、羥喹啉硫酸鹽。

乾燥劑("乾燥手段")：氯化鈣、硫酸鈣、二氧化矽。

過濾助劑("過濾手段")：粉末狀纖維素、純化矽質土。

調味劑及芳香劑("調味手段")：大茴香腦、大茴香油、苯甲醛、肉桂油、可可、乙基香蘭素、薄荷醇、水楊酸甲酯、谷胺酸單鈉、橙花油、橙油、薄荷、薄荷油、薄荷精、玫瑰油、濃玫瑰水、瑞香草酚、吐魯香脂酊、香草、香草蘭酊、香蘭素。

潤濕劑("保持潮濕之手段")：甘油、己二醇、丙二醇、山梨糖醇。

軟膏基質("軟膏手段")：羊毛脂、無水羊毛脂、親水性軟膏、白色軟膏、黃色軟膏、聚乙二醇軟膏、礦脂、親水性礦脂、白色礦脂、玫瑰水軟膏、角鯊烷。

增塑劑("增塑手段")：蓖麻油、二乙醯化單酸甘油酯、鄰苯二甲酸二乙酯、甘油、單乙醯化及二乙醯化單酸甘油酯、聚乙二醇、丙二醇、三醋精、檸檬酸三乙酯。

聚合物膜：乙酸纖維素

聚合載劑("載劑手段")為用於多肽晶體之封膠以投遞(包括生物投遞)多肽之聚合物。該等聚合物包括生物相容性聚合物及生物可降解聚合物。該聚合載劑可為單一聚合物類型或可包含聚合物類型之混合物。用作聚合載劑之聚合物包括(例如):聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酸酐)、聚(縮肽)(poly(depsipeptide))、聚(酯)例如聚(乳酸)或PLA、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(B-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)及聚(二惡烷);聚(乙二醇)、聚((羥丙基)甲基丙烯鹽胺)、聚[(有機)磷氮烯]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡咯啉酮)、馬來酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、普路羅尼克(pluronic)多元醇、白蛋白、天然及合成多肽、褐藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、透明質酸、寡糖、甘胺基聚糖(glycaminoglycans)、硫酸化多糖或任何將封膠多肽晶體之習知材料。

防腐劑(或"防腐手段"),例如抗微生物防腐劑,涵蓋用於本發明之調配物,例如多劑量調配物,包括氯苄烷銨、氯苄烷銨溶液、氯苄硫銨(benzelthonium chloride)、苯甲酸、苄醇、對羥基苯甲酸丁酯、氯化十六烷基吡啶鎘、氯代丁醇、氯甲酚、甲酚、脫氫乙酸、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸甲酯鈉、苯酚、苯乙醇、乙酸苯汞、硝酸苯汞、苯甲酸鉀、山梨酸鉀、對羥基苯甲酸丙酯、對羥基苯甲酸丙酯鈉、苯甲酸鈉、脫氫乙酸鈉、丙酸鈉、山梨酸、硫柳汞及瑞香草酚。所包括之防腐劑的

量將在0%至2%(w/v)範圍內或為約1%(w/v)。

增溶劑及穩定劑("增溶手段"或"穩定手段", 亦係指乳化劑、助溶質或助溶劑), 其當多肽在溶液中(或為乾燥或凍結形式)時增加多肽之溶解度及/或穩定多肽, 亦可添加至醫藥組合物。增溶劑及穩定劑之實例包括(但不限於): 糖/多元醇例如: 蔗糖、乳糖、甘油、木糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、麥芽糖、肌醇、海藻糖、葡萄糖; 聚合物, 例如血清白蛋白(牛血清白蛋白(BSA)、人類SA(HSA)或重組HA)、葡聚糖、PVA、羥丙基甲基纖維素(HPMC)、聚乙二亞胺、明膠、聚乙基吡咯啉酮(PVP)、羥乙基纖維素(HEC); 非水性溶劑, 例如多元醇(例如PEG、乙二醇及甘油)、二甲基亞砷(DMSO)及二甲基甲醯胺(DMF); 胺基酸, 例如脯胺酸、L-蛋胺酸、L-絲胺酸、穀胺酸鈉、丙胺酸、甘胺酸、離胺酸氫氯化物、肌胺酸及 γ -胺基丁酸; 介面活性劑, 例如Tween-80、Tween-20、SDS、聚山梨酸酯、聚氧乙烯共聚物; 及混雜之穩定賦形劑, 例如磷酸鉀、乙酸钠、硫酸銨、硫酸鎂、硫酸鈉、N-氧化三甲胺、甜菜鹼、金屬離子(例如鋅、銅、鈣、錳及鎂)、CHAPS、單月桂酸酯、2-O- β -甘露甘油酸酯(mannoglycerate); 或任何下列物: 阿拉伯樹膠、膽固醇、二乙醇胺(附屬)、單硬脂酸甘油酯、羊毛脂醇、卵磷脂、單酸或二酸甘油酯、單乙醇胺(附屬)、油酸(附屬)、油醇(穩定劑)、泊洛沙姆(poloxamer)、聚氧化乙烯50硬脂酸酯、聚烴氧35蓖麻油、聚烴氧40氫化蓖麻油、聚烴氧10油醚、聚烴氧20十六基十八基醚(cetostearyl ether)、硬脂酸聚烴氧40

酯、聚山梨酸酯20、聚山梨酸酯40、聚山梨酸酯60、聚山梨酸酯80、丙二醇二乙酸酯、丙二醇單硬脂酸酯、月桂基硫酸鈉、硬脂酸鈉、單月桂酸山梨聚糖、單油酸山梨聚糖、單棕櫚酸山梨聚糖、單硬脂酸山梨聚糖、硬脂酸、三乙醇胺、乳化蠟；增濕及/或增溶劑，例如氯苄烷銨、氯苄硫銨、氯化十六烷基吡啶鎘、多庫酯鈉(docusate sodium)、壬苯醇醚(nonoxynol)9、壬苯醇醚10、辛苯昔醇(octoxynol)9、硬脂酸聚煙氧50酯、泰洛沙泊(tyloxapol)；或任何上述物之組合。調配物中增溶劑/穩定劑之濃度可在約0.001至5重量百分比之間，或約0.1至2重量百分比之間。在一實施例中，增溶劑係選自山梨聚糖單-9-十八烯酸酯聚(氧基-1,2-乙烷二基(ethanediyl))衍生物，包括(但不限於)聚山梨酸酯80或聚山梨酸酯20。用於該實施例中之聚山梨酸酯20或80之量在0.001%至0.1%(w/v)範圍內，例如0.005%(w/v)，單獨使用或以多劑量調配物形式使用。在另一實施例中，0.05 mM至50 mM之間範圍內之游離L-蛋胺酸係包括於調配物中：游離L-蛋胺酸的量在0.05 mM至5 mM之間用於單獨使用之調配物，及1 mM至10 mM之間用於多劑量調配物。

溶劑("溶解手段")：丙酮、醇類、經稀釋醇類、水合戊烯、苯甲酸苄酯、丁醇、四氯化碳、氯仿、玉米油、棉籽油、乙酸乙酯、甘油、己二醇、異丙醇、甲醇、二氯甲烷、甲基異丁基酮、礦物油、花生油、聚乙二醇、碳酸丙烯、丙二醇、芝麻油、注射用水、注射用無菌水、沖洗用無菌水、純化水。

吸著劑(亦稱作吸附劑, "吸附手段"): 粉末狀纖維素、木炭、純化矽質土; 及二氧化碳吸著劑; 氫氧化鋇石灰; 蘇打石灰。

硬化劑("硬化手段"): 氫化蓖麻油、十六十八混合醇、十六醇、十六酯蠟、硬脂、石蠟、聚乙烯賦形劑、十八醇、乳化蠟、白蠟、黃蠟。

栓劑基質("栓劑手段"): 可可油、硬脂、聚乙二醇。

懸浮劑及/或黏性增強劑("增強黏性手段"): 阿拉伯樹膠、瓊脂、褐藻酸、單硬脂酸鋁、膨潤土、經純化膨潤土、糊狀膨潤土、卡波姆934p、羧甲基纖維素鈣、羧甲基纖維素鈉、羧甲基纖維素鈉12、角叉菜膠、微晶及羧甲基纖維素鈉纖維素、糊精、明膠、瓜爾豆膠、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、矽酸鋁鎂、甲基纖維素、果膠、聚氧化乙烯、聚乙烯醇、聚烯吡酮、丙二醇褐藻酸酯、二氧化矽、膠體二氧化矽、褐藻酸鈉、黃芪膠、黃原膠。

甜味劑("甜味手段"): 阿斯巴甜(aspartame)、葡萄糖結合劑(dextrates)、右旋糖、賦形劑右旋糖、果糖、甘露糖醇、糖精、鈣糖精、鈉糖精、山梨糖醇、溶液山梨糖醇、蔗糖、可壓縮糖、糖果點心用糖、糖漿。

錠劑膠著劑("錠劑膠著手段"): 阿拉伯樹膠、褐藻酸、羧甲基纖維素鈉、微晶纖維素、糊精、乙基纖維素、明膠、液態葡萄糖、瓜爾豆膠、羥丙基甲基纖維素、甲基纖維素、聚氧化乙烯、聚烯吡酮、預膠凝化澱粉、糖漿。

錠劑及/或膠囊稀釋劑("稀釋手段")：碳酸鈣、二鹼式磷酸鈣、三鹼式磷酸鈣、硫酸鈣、微晶纖維素、粉末狀纖維素、葡萄糖結合劑、糊精、右旋糖賦形劑、果糖、高嶺土、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、澱粉、預膠凝化澱粉、蔗糖、可壓縮糖、糖果點心用糖。

錠劑崩散劑("錠劑崩散手段")：褐藻酸、微晶纖維素、交聯羧甲基纖維素鈉、交聯聚烯吡酮、泊拉可林(polacrillin)鉀、乙醇酸澱粉鈉、澱粉、預膠凝化澱粉。

錠劑及/或膠囊潤滑劑("潤滑手段")：硬脂酸鈣、山嶺酸甘油酯、硬脂酸鎂、輕礦物油、聚乙二醇、硬脂酸反丁烯二酸鈉、硬脂酸、經純化硬脂酸、滑石、氫化植物油、硬脂酸鋅。

張力改質劑("張力改質手段")被認為是有助於溶液莫爾滲透壓濃度之分子。為了最大化活性成份之穩定性且亦最小化對於投藥患者之不適程度，較佳對醫藥組合物之莫爾滲透壓濃度加以調整。血清大約為300+/-50毫莫爾滲透壓每千克。醫藥組合物通常最好與血清等壓(意即具有相同或相近莫爾滲透壓濃度)，其藉由加入張力改質劑來達成，因此涵蓋莫爾滲透壓濃度自約180至約420毫莫爾滲透壓，但是，應瞭解莫爾滲透壓濃度可比特定條件要求偏高或偏低。適於改質莫爾滲透壓濃度之張力改質劑的實例包括(但不限於)胺基酸(例如精胺酸、半胱胺酸、組胺酸及甘胺酸)、鹽(例如氯化鈉、氯化鉀及檸檬酸鈉)及/或糖類(例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、甘油及甘露糖醇)。調配物中張力改質劑

的濃度可在約 1 mM至 1 M之間，或約 10 mM至約 200 mM之間。在一實施例中，張力改質劑係氯化鈉，其濃度範圍為 0 mM至 200 mM。在另一實施例中，張力改質劑為山梨糖醇或海藻糖及不存在氯化鈉。

媒劑("媒劑手段")：調味及增甜(芳香酒劑、化含苯甲醛酒劑、異醇系酒劑、薄荷水、山梨糖醇溶液、糖漿、吐魯香脂糖漿)；油質(杏仁油、玉米油、棉花籽油、油酸乙酯、豆蔻酸異丙酯、棕櫚酸異丙酯、礦物油、輕礦物油、豆蔻醇、辛基十二烷醇、橄欖油、花生油、桃仁油、芝麻油、大豆油、角鯊烷)；固態載劑，例如糖球、無菌(注射用抑菌水、注射用抑菌氯化鈉)。

防水劑("防水手段")：二甲聚矽氧烷(dimethicone)、聚二甲矽氧烷(simethicone)。

在特定實施例中，醫藥組合物包含選自下列各物之化合物或其任意組合：1)胺基酸(例如甘胺酸、精胺酸、天冬胺酸、穀胺酸、離胺酸、天冬醯胺、穀胺醯胺、脯胺酸)之鹽；2)碳水化合物，例如單糖(例如葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、核糖)；3)二糖，例如乳糖、海藻糖、麥芽糖、蔗糖；4)多糖，例如麥芽糊精、葡聚糖、澱粉、糖原；5)糖醇，例如甘露醇、木糖醇、乳糖醇、山梨糖醇；6)葡糖醛酸、半乳糖醛酸；7)環糊精，例如甲基環糊精、 γ -環糊精及其類似物；8)無機鹽，例如氯化鈉、氯化鉀、氯化鎂、磷酸鈉及磷酸鉀、硼酸碳酸銨(boric acid ammonium carbonate)及磷酸銨；9)有機鹽，例如乙酸鹽、

檸檬酸鹽、抗壞血酸鹽、乳酸鹽；10)乳化或增溶劑，如阿拉伯樹膠、二乙醇胺、單硬脂酸甘油酯、卵磷脂、單乙醇胺、油酸、油醇、泊洛沙姆、聚山梨酸酯、月桂基硫酸鈉、硬脂酸、單月桂酸山梨聚糖、單硬脂酸山梨聚糖及其他山梨聚糖衍生物、聚烴氧基衍生物、蠟、聚氧乙烯衍生物、山梨聚糖衍生物；11)黏性增強劑，如瓊脂、褐藻酸及其鹽、瓜爾豆膠、果膠、聚乙烯醇、聚氧化乙烯、纖維素及其衍生物、碳酸丙烯、聚乙二醇、己二醇、泰洛沙泊；及12)特殊成份，例如蔗糖、海藻糖、乳糖、山梨糖醇、乳糖醇、肌醇、諸如乙酸、磷酸、檸檬酸、硼酸之鈉鹽及鉀鹽、甘胺酸、精胺酸、聚氧化乙烯、聚乙烯醇、聚乙二醇、己二醇、甲氧基聚乙二醇、明膠、羥丙基- β -環糊精。

持續釋放型

在本發明一較佳實施例中，使用晶性TNFR2多肽之持續釋放型(亦稱為"控制釋放"型)，包括晶性TNFR2:Fc持續釋放型；持續或控制釋放型包含晶性多肽及一種延長晶性多肽在一段所需時間內之物理釋放或生物可用性的物質("持續釋放手段")。適用於該揭示方法之持續釋放型包括(但不限於)晶性TNFR2多肽，其以持續釋放手段來封膠，例如緩慢溶解之可生物相容聚合物(例如，本文所描述之聚合載劑、U.S. 6,036,978所述之褐藻酸鹽微粒子或U.S. 6,083,534所述之聚乙烯-乙酸乙烯酯及聚(乳酸-乙醇酸)組合物)，其與該聚合物混合(包括局部施加之水凝膠)及/或包入可生物相容半滲透植入體。本發明之其他實施例包括額外持續釋

放型例如聚合微粒，其中活性成份及持續釋放手段(例如聚合物，例如PLGA)之混合物以連續相分散，且將所得分散體直接凍幹以移除水及有機溶劑或添加劑並形成該微粒子(美國專利案第6,020,004號)；形成可注射之凝膠組合物，其包含生物可降解陰離子多糖，例如褐藻酸酯，多肽及至少一種所結合之多價金屬離子(美國專利案第6,432,449號)；形成可注射、生物可降解的聚合基質，其具有逆相熱凝膠化特性及視情況回應pH值之凝膠化/去凝膠化特性(美國專利案第6,541,033號及第6,451,346號)；形成可生物相容多元醇：油懸浮液，例如其中所包含之多元醇範圍以重量計自約15%至約30%的懸浮液(美國專利案No. 6,245,740)。該等持續釋放型適於經由儲槽形式投與來連續投遞多肽，其中該儲槽可為植入物，或可為可注射微球、奈米球或凝膠形式。上述美國專利案(美國專利案號為No. 6,036,978、6,083,534、6,020,004、6,432,449、6,541,033、6,451,346及6,245,740的專利)全文以引用的方式並入本文中。另外，本發明之持續或控制釋放型晶性多肽包含持續釋放手段之類型，例如Kim, C., 2000, "Controlled Release Dosage Form Design", Technomic Publishing Co., Lancaster PA中所述類型，其包括下列：中性聚合物(明膠、褐藻酸鈉、黃原膠、阿拉伯膠或殼聚糖)、半合成聚合物或纖維素衍生物(甲基纖維素、乙基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥乙基甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、乙酸纖維素、乙酸丁酸纖維素、乙酸丙酸纖維素、乙酸鄰苯

二甲酸纖維素或鄰苯二甲酸羥丙基甲基纖維素)及合成聚合物(離子交換樹脂(甲基丙烯酸、磺化聚苯乙烯/二乙烯基苯)、聚丙烯酸(卡巴浦爾(Carbopol))、聚(MMA/MAA)、聚(MMA/DEAMA)、聚(MMA/EA)、聚(鄰苯二甲酸乙酸乙烯酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡咯啉酮)、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸/乙醇酸)、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚(二甲基矽樹脂)、聚(甲基丙烯酸羥乙酯)、聚(乙烯/乙酸乙烯酯)、聚(乙烯/乙烯醇)、聚丁二烯、聚(酸酐)、聚(原酸酯)及聚(穀胺酸))。

本發明之其他實施例包括封膠於至少一種聚合載劑中之TNFR2多肽晶體，其藉由在聚合載劑之基質內封膠來形成微球從而保存其天生及生物學活性三級結構，如美國專利案第6,541,606號中所述，其全文以引用方式並入本文中。待封膠之TNFR2多肽晶體或其調配物懸浮於諸如PLGA之聚合載劑中，該載劑溶於有機溶劑或添加物中。當儲存於可比較條件下時，該經封膠TNFR2多肽晶體保持TNFR2多肽之生物活性較溶液中之TNFR2多肽更長時期。

說明性實施例

該調配物可包含約25至約50 mg TNFR2多肽或依那西普(其中TNFR2多肽或依那西普自晶形重建)、約10 mM至約100 mM L-精胺酸、約10 mM至約50 mM磷酸鈉、約0.75%至約1.25%蔗糖、約50 mM至約150 mM NaCl，pH值約6.0至pH值約7.0。在另一實施例中，調配物中L-精胺酸可由L-半胱胺酸置換(約1至約500莫爾濃度)。在另一實施例中，pH

值可為約7.0。在另一實施例中，醫藥組合物包含25 mg/mL 晶性TNFR2，約25 mM L-精胺酸，約25 mM磷酸鈉，約98 mM氯化鈉，及約1%蔗糖，pH值為6.2。在另一實施例中，其中晶性依那西普或自晶形重建之依那西普具有每單位依那西普較非結晶依那西普製劑更高水準的生物活性，該調配物可包含約10至約50 mg之晶性依那西普或自晶形重建之依那西普，或約15至約25 mg之晶性依那西普或自晶性重建之依那西普。

測試多肽調配物之穩定性及生物活性

在另一實施例中，本發明提供一種加速穩定性測試本發明之醫藥組合物中的晶性TNFR2多肽之穩定性的方法，其包含以下步驟：測試根據本發明所調配之多肽儲存前(意即，時間為0)的活性；將組合物儲存在37°C下一個月並量測多肽之穩定性；且比較0時間與一個月時間之穩定性。該資訊對分批或分堆處理之早期清除有效，該等處理似乎最初具有良好穩定性，但長期儲存不佳。

此外，本醫藥組合物提供經改良長期儲存使得活性成份(例如晶性TNFR2多肽)在儲存期間無論為液態或冷凍狀態皆穩定。如本文所使用之術語"長期"儲存理解為意謂醫藥組合物可儲存3個月或更長，6個月或更長且較佳為一年或更長。長期儲存亦理解為意謂醫藥組合物可作為液體儲存在2-8°C下或冷凍儲存(例如-20°C或更冷)。亦涵蓋組合物可冷凍及解凍一次以上。關於長期儲存之術語"穩定"理解為意謂醫藥組合物之活性多肽未失去相對於儲存之初組合物

的活性之20%以上或較佳15%或更佳10%且最佳5%。TNFR2多肽之活性可藉由許多檢定中之任何一種來檢定，包括配位體結合檢定，例如ELISA檢定，其中配位體結合於固態載體，加入TNFR2多肽之測試製劑及對照製劑，且使用針對TNFR2多肽之Ig組份的經標記抗Ig抗體來偵測TNFR2多肽與配位體的結合。另外，諸如實例6中所描述之檢定可用來偵測與TNF結合之TNFR2多肽之生物活性，或可經改質以測試與其他配位體結合之TNFR2多肽之活性。

投藥及劑量

如本文所使用之"晶性TNFR2之投藥"或"晶性TNFR2多肽之投藥"意謂投與包含晶性TNFR2多肽之醫藥組合物或投與使用晶性TNFR2多肽所製備之醫藥組合物。

任何有效投藥途徑可用來治療性地投與晶性TNFR2。若以注射方式，則晶性TNFR2可經由(例如)關節內、靜脈內、肌肉內、疾病部位內、腹膜內或皮下途徑藉由彈丸注射或藉由連續灌注來投與。其他適當之投藥手段包括自植入物、儲槽(植入或注射入)、栓劑、氣溶膠吸入劑、眼藥水、口服製劑(包括藥丸、糖漿、錠劑或口香糖)及局部製劑(例如洗液、凝膠、噴霧、藥膏)或其他適用技術來持續釋放。當晶性TNFR2與一或多種其他生物活性化合物組合投與時，該等可以相同或不同途徑來投與，且可同時、獨立或依序投與。

適當劑量可用標準劑量試驗來確定，且可根據選定之投藥途徑來變化。投藥量及頻率將視下列因素而定：待治療

適應症之性質及嚴重性、所需反應、患者年齡及症狀等等。在下列劑量療法中，所投與晶性TNFR2之量可理解為包含晶性TNFR2之醫藥組合物的晶性TNFR2之量，或使用晶性TNFR2所製備之醫藥組合物的TNFR2多肽之量。

在本發明之一實施例中，晶性TNFR2每周投與一次以治療本文所揭示之醫學病症或症狀，在另一實施例中每周至少投與兩次且在另一實施例中每周至少投與三次。18歲或更大年齡之人為成年患者。若注射，則每個成人劑量的晶性TNFR2的有效量在1-20 mg/m²之人體表面面積的範圍內，且較佳為約5-12 mg/m²。或者，可投與均一劑量(flat dose)，其量可在5-100 mg/劑範圍內。藉由皮下注射投與均一劑量之例示性劑量範圍為5-25 mg/劑，25-50 mg/劑及50-100 mg/劑之間。在本發明之一實施例中，各種如下描述之適應症藉由投與可接受作為注射的製劑來治療，該製劑含有晶性TNFR2或由晶性TNFR2製得，每劑量25 mg TNFR2，或者，每劑量含有50 mg。25 mg或50 mg劑量可重複投與，尤其對於慢性症狀而言。若使用注射以外的投藥途徑，則可根據標準醫學實務來適當調整劑量。儘管長期治療可能係必要的以誘發所需程度之改善，但在許多情況中，患者症狀的改善將藉由經至少三周每周注射一至三次約25 mg劑量之晶性TNFR2來得到，或藉由每周注射一或兩次50 mg劑量之晶性TNFR2歷時至少三周來得到。對於不可治癒之慢性症狀而言，療法可無限期地持續，若確實需要，則患者的醫師會對劑量及頻率作出調整。

對於兒科患者(年齡4-17)而言，適當療法涉及皮下注射0.4 mg/kg體重，高達每劑量最大值25 mg之晶性TNFR2，藉由每周皮下注射一或多次來投與。

除人類患者外，晶性TNFR2多肽可用於治療折磨非人類動物之本文所述醫學症狀，例如寵物(狗、貓、鳥、靈長類等)、農場家畜(馬、牛、羊、豬、鳥等)，或用於治療遭受比得上本文所述症狀之症狀的任何動物。在該等實例中，適當劑量可根據動物體重來決定。例如，可使用0.2-1 mg/kg之劑量。或者，根據動物表面積來決定劑量，例示性劑量在0.1-20 mg/m²身體表面積或更佳在5-12 mg/m²身體表面積的範圍內。對於諸如狗或貓之小動物而言，適當劑量為0.4 mg/kg之體重。在另一實施例中，晶性TNFR2(其中TNFR2多肽較佳自基因來表現，該等基因衍生自與患者相同之種類)藉由注射或其他適當途徑每周投藥一或多次直至動物症狀得到改善，或將其無限期投藥。

在另一實施例中，其中晶性TNFR2多肽或由晶形重建之TNFR2多肽較非結晶TNFR2多肽製劑具有每單位TNFR2多肽更高水準之生物活性，上述給定劑量可根據晶性TNFR2多肽之生物活性的增長程度來適當減少。例如，若結晶化可增加每單位TNFR2多肽之生物活性兩倍，則上述劑量可減少至上述劑量及劑量範圍的50%；在其他實施例中，劑量可減少至上述劑量之10至95%，或至上述劑量之25至75%，或至上述劑量之60%或70%或80%。

本發明進一步包括同時投與晶性TNFR2與一或多種與該

醫藥組合物組合投與相同患者之其他藥物，該醫藥組合物包含晶性TNFR2多肽或使用晶性TNFR2多肽所製備，根據適用於該藥品之療法來投與每種藥物。"同時投藥"涵蓋用組合之組份同時或依序治療，以及變換該等藥物之療法，或其中一種組份長期投與及其他組份間歇投與。組份可以相同或獨立組合物且藉由相同或不同投藥途徑來投與。

治療性用途

本發明係關於藉由投與晶性TNFR2多肽來治療各種醫學病症之方法。晶性TNFR2多肽可與其他生物活性分子以例示性之方式組合投與，如(但不限於)以本文所述之組合及/或同時治療方式。本發明提供治療遭受醫學病症之哺乳動物患者(包括人類患者)之化合物、組合物及方法。為了本揭示內容，術語"病情(illness)"、"疾病(disease)"、"醫學症狀(medical condition)"、"反常症狀(abnormal condition)"及類似術語與"醫學病症(medical disorder)"交替使用。

依據本發明，投與具有醫學病症之患者治療有效量之晶性TNFR2多肽。晶性TNFR2多肽可為TNF- α -結合的可溶性TNF- α 受體之晶形，例如晶性TNFR2:Fc。如本文所使用之術語"投與治療有效量"治療劑意謂用足以誘發超過基線之持續改良的量及時間來治療患者，至少一種指標反映該症狀嚴重性。若患者顯示出一或多周分離之至少兩個時刻的改善，則可認為是"持續"的改善。改善程度基於徵兆或症狀來決定，且決定亦可採用投與患者之問卷來進行，例如生活品質問卷。可評定各種反映患者病情程度的指標以

決定治療量及時間是否足夠。該或該等選定指標之基線值係藉由在投與第一劑量之晶性依那西普或其他晶性TNFR2多肽之前檢測患者來建立。基線檢測較佳在投與第一劑量約60天以內完成。若投與晶性TNFR2多肽治療急性症狀，例如治療創傷性膝傷，第一劑量事實上盡可能在創傷發生後立即投與。

改善藉由投與晶性TNFR2多肽來誘發直至患者表明該或該等選定指標超過基線的改善。在治療慢性病症中，藉由經至少一個月或更長時期(例如一、二、三個月或更長)或無限期重複投與該藥物來獲得該種程度之改善。一至六周的時期或者甚至單劑量通常足以治療急性病症。對於創傷或急性病症，單劑量可能足夠。雖然患者病情在治療後的程度根據一或多個指標似乎得以改善，但仍可以相同水平或以減少的劑量或頻率來無限期持續治療。一旦治療已減少或中斷，若症狀再出現，則隨後可以初始水平重新開始治療。

在一實施例中，用晶性TNFR2多肽待治療之醫學病症特徵為反常或過量TNF- α 含量。已有提議TNF- α 全身或局部過量有助於眾多醫學病症的發展。例如，患有慢性心臟衰竭之患者血清TNF- α 含量較高，其已顯示出增加疾病的發展(例如見Levine等人，N Eng J Med 323：236-241, 1990)。多種其他疾病與TNF- α 含量增加有關(例如參見Feldman等人，Transplantation Proceedings 30：4126-4127, 1998)。已表明抑制TNF- α 可能對遭受特徵為反常或過量TNF- α 表

現之病症的患者有益。但是，儘管對該等疾病有效治療方法的設計已取得進步，但仍需要改良治療藥品及方法。

本文提供藉由投與晶性 TNFR2 多肽(例如可溶性 TNF- α 受體之晶形，例如 TNFR2:Fc)一段時間足以誘發患者症狀持續改善來治療許多特徵為反常 TNF- α 表現之醫學病症之方法。本方法涉及投與患者一種調配物，其包含晶性 TNFR2 多肽或使用晶性 TNFR2 多肽製得，晶性 TNFR2 多肽能夠例如藉由預防 TNF- α 與其細胞表面受體(TNFR)結合來減少內源性生物活性 TNF- α 之有效量。

心血管病症

心血管病症用所揭示之晶性 TNFR2 多肽、其醫藥組合物及/或組合療法係可治療的。可用晶性 TNFR2 多肽(例如晶性 TNFR2:Fc)治療之心血管病症之實例包括：主動脈瘤；動脈炎；血管阻塞包括大腦動脈阻塞；冠狀搭橋手術之並發症；局部缺血/再灌注損傷；心臟疾病，包括動脈粥樣硬化心臟疾病，心肌炎，包括慢性自體免疫心肌炎及病毒性心肌炎；心臟衰竭，包括慢性心臟衰竭(CHF)，心臟衰竭之惡病質；心肌梗塞；心臟手術後再狹窄；無症狀心肌缺血；左心室輔助器之移植後並發症；雷諾現象(Raynaud's phenomena)；血栓靜脈炎；血管炎，包括川崎(Kawasaki)血管炎；巨細胞性動脈炎，韋格納肉牙腫病(Wegener's Granulomatosis)；及絲奇恩賴-亨諾(Schoenlein-Henoch)紫癜。

另外，TNFR2:Fc或其他本文所揭示之晶性 TNFR2 多肽

可用於與骨髓或血管幹細胞治療組合以治療心血管疾病(包括局部缺血或非局部缺血引起之心肌症)、後心肌梗塞血管生成治療或治療週邊動脈疾病。用於該目的之幹細胞包括間葉系幹細胞及內皮前驅細胞，例如在脾、胎兒肝臟、骨髓或迴圈血液中所發現的細胞(美國專利第5,486,359號；Deisher T, *Drugs* 3(6): 649-53(2000); Huss R, *Stem Cells* 18: 1-9(2000); Huss等人, *Stem Cells* 18: 252-60(2000))。晶性TNFR2多肽可與幹細胞移植以及用增生性或分化性幹細胞生長因子所進行的治療同時給出。

含有TNF- α 及IL-8作為動脈粥樣硬化腹部主動脈瘤中的趨化因子(Szekanecz等人, *Pathobiol* 62: 134-139(1994))。腹部主動脈瘤可藉由投與人類患者晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)來治療，TNFR2多肽可與IL-8抑制劑組合投與，該治療具有減少與此病症相關的病理性血管新生的效應。

研究已顯示金屬蛋白酶(MMP)係心肌重塑及纖維化的關鍵要素。因此，投與晶性TNFR2多肽以抑制TNF- α 及發炎反應與直接抑制MMP協力將減輕、預防或反轉諸如左心室泵機能不良之病症。藉由共同投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)及連同MMP抑制劑來達成上述效應。或者，治療左心室泵機能不良可包括投與晶性TNFR2多肽而不同時使用MMP抑制劑。

任何所揭示之晶性TNFR2多肽或本文所揭示之組合療法亦可用來治療家族性混合型高脂血症(FCH)。FCH係一種遺

傳性異常脂血症，其特徵為早期冠心病。FCH患者在其TNFR II基因中遺傳上有缺陷，體內具有低水平之sTNFR II含量，且似乎對內源性TNF- α 之有害效應過度反應(van Greevenbroek等人，2000, Atherosclerosis 153: 1-8)。與FCH相關之冠心病、胰島素抵抗力及肥胖可藉由向FCH患者投與任何一種本文所揭示之晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc或晶性依那西普)來改善或預防。另外，可投與治療FCH之晶性TNFR2多肽同時減少飲食脂肪及膽固醇及/或與一或多種其他用於治療該症狀之藥物同時投與，該等藥物包括膽汁酸螯合樹脂(消膽胺(cholestyramine)及考來替潑(colestipol))、煙鹼酸、尼克新(niacin)、降低膽固醇藥物(例如吉非羅齊(Gemfibrozil)或普羅布可(probucol))或一種降低膽固醇之"斯達汀(statin)"或HMG-CoA還原酶抑制劑，例如洛伐他汀(Lovastatin)或普伐他汀(Pravastatin)。在本發明之另一態樣中，晶性TNFR2多肽用於治療C-反應蛋白(CRP)之血清含量升高的患者及因此有患心臟病危險的患者，即使其膽固醇可能較低(Ridker等人，2001, New Eng J Med 344: 1959-1965)。

感染及損傷

所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或本文所述之組合療法係用於治療細菌、病毒或原生動物感染及由此所得並發症的藥劑中。一種此類疾病係支原體肺炎(Mycoplasma pneumonia)。另外，本文提供晶性TNFR2多肽治療AIDS及相關症狀(例如歸因於抗逆轉錄病毒治療的AIDS癡呆綜合

症、AIDS相關消耗症、脂質萎縮症(lipidistrophy)；及卡波西氏(Kaposi)肉瘤)之用途。本文提供晶性TNFR2多肽用於治療原生動物疾病之用途，包括瘧疾(包括腦瘧疾)及血吸蟲病。此外提供晶性TNFR2多肽治療麻瘋結節性紅斑；細菌或病毒腦膜炎；結核，包括肺結核；及繼發於細菌或病毒感染之局部肺炎。本文亦提供晶性TNFR2多肽用於製備治療人虱型回歸熱(例如由包柔氏螺旋體菌(*Borrelia recurrentis*)所引起之回歸熱)之藥品的用途。晶性TNFR2多肽亦可用於製備供治療由皰疹病毒(例如皰疹性基質角膜炎、角膜損傷及病毒誘發之角膜病症)所引起之症狀的藥品。另外，晶性TNFR2多肽可用於治療人體乳頭狀瘤病毒感染，以及治療感染性單核細胞增多症。晶性TNFR2多肽亦用於製備治療下列疾病的藥品：流行性感冒以及重病多發性神經病及肌病(CIPNM)，有時與延長之敗血病情伴發之發炎症候群。本品性TNFR2多肽亦用於治療可遺傳之海綿狀腦病，據信其由朊病毒調節。

另一可用任何所揭示之晶性TNFR2多肽、其醫藥組合物及/或組合療法來治療的病症係熱帶痙攣性下身輕癱/與HTLV-1相關之脊髓病(TSP/HAM)。該疾病因受人類逆轉錄HTLV-1感染引起。最近研究表明TNF- α 可對由HTLV感染細胞所展示的穀胺酸鹽攝入降低起作用(Szymocha等人，2000, J Virol 74: 6433-6441)。TSP/HAM係脊髓之緩慢進行性症狀，其導致虛弱及大腿肌肉僵硬，通常伴隨腳的感覺喪失。該症狀的已知治療包括皮質類固醇及去血漿法。

TSP/HAM可用本文所揭示之任何晶性TNFR2多肽來治療，任何TNFR2多肽可與皮質類固醇、去血漿法或二者同時投與。用於治療TSP/HAM之例示性晶性TNFR2多肽系晶性TNFR2：Fc。治療的充分性係藉由監測患者腿部力量的改善或患者惡化的停止來決定，或藉由任何其他患者的醫師所認為之適當手段來決定。

其他可藉由所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療的症狀包括頭部或脊髓損傷所導致的病症，及包括歸因於頭部外傷的硬腦膜下血腫。

神經病症、疼痛及發熱

頸椎病變性頭痛係頸部區域機能不良引起之普通形式的頭痛且該頭痛與TNF- α 含量上升有關，據信其調節對患者不適起作用的發炎症狀(Martelletti, Clin Exp Rheumatol 18(2 Suppl 19): S33-8(Mar-Apr, 2000))。頸椎病變性頭痛可藉由投與如本文所述之晶性TNFR2多肽來治療，藉此降低發炎反應及相關頭痛。

另外，本晶性TNFR2多肽、組合及/或組合療法用於治療慢性疼痛症狀，例如慢性骨盆痛，包括慢性前列腺炎/骨盆痛症候群。作為另一實例，本發明之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法用於治療皰疹後疼痛。

本發明之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法於治療原發性澱粉樣變性病。另外，繼發性澱粉樣變性病特徵為：各種症狀亦可用本文所述之晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2：Fc)，及組合物及/或組合療法來治療。該等病症包

括：阿茲海默氏症(Alzheimer's Disease)、繼發性反應澱粉樣變性病；唐氏症候群(Down's Syndrome)；及透析相關之澱粉樣變性病。亦可用本發明之化合物、組合物及/或組合療法治療的病症為遺傳周期性發熱症候群，包括家族性地中海熱、高免疫球蛋白D及周期性發熱症候群及TNF受體相關之周期性症候群(TRAPS)。

所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法進一步用於治療急性多發性神經病；神經性食欲缺乏；貝爾氏麻痺(Bell's palsy)；慢性疲勞症候群；可遺傳癡呆，包括亞急性海綿狀腦病(Creutzfeldt-Jacob disease)；脫髓鞘神經病變；古立安-白瑞症候群(Guillain-Barre syndrome)；椎間盤疾病；海灣戰爭症候群(Gulf War Syndrome)；重症肌無力；無症狀腦缺血；睡眠病症，包括嗜眠及睡眠窒息；慢性神經元變性；及中風，包括腦部缺血症。

腫瘤及血液病症

本文提供使用晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療各種腫瘤及血液病症之方法。例如，晶性TNFR2多肽用於治療各種形式癌症，包括急性骨髓性白血病、艾普斯坦-巴爾(Epstein-Barr)病毒陽性鼻咽癌，膽囊癌，神經膠質瘤，結腸、胃、前列腺、腎細胞、子宮頸及卵巢癌，肺癌(SCLC及NSCLC)，包括癌症相關之嘔吐、癌症相關惡病質、疲勞、衰弱、惡病質之腫瘤伴隨症候群及高鈣血症。另外可用本品性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療之疾病為實體腫瘤，包括肉瘤、骨肉瘤及癌瘤，例如腺癌(例如

乳癌)及鱗狀細胞癌。另外，本化合物、組合物及/或組合療法用於治療白血病，包括慢性或急性骨髓性白血病，慢性或急性淋巴母細胞性白血病，及毛細胞白血病。其他具有侵襲性轉移潛力的惡性腫瘤可用本化合物、組合物及/或組合療法來治療，包括多發性骨髓瘤。當晶性TNFR2多肽用於治療腫瘤時，該治療可與目標為膜蛋白的抗體組合投與，膜蛋白在正治療之特定腫瘤中表現出高含量。例如，諸如乳癌、卵巢癌及前列腺癌之腫瘤或其他Her2-陽性腫瘤可用晶性TNFR2：Fc或其他晶性TNFR2多肽與抗Her2/neu(例如HERCEPTIN[®]，一般稱為"搓杜滋美(trastuzumab)"；Genentech, Inc.)的抗體來組合投與。癌症(例如卵巢癌或前列腺癌)，可用同時投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2：Fc)及干擾素- γ 來治療(Windbichler等人，2000, British J Cancer 82：1138-1144)。

各種淋巴增生病症亦可用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療。該等病症包括(但不限於)自體免疫淋巴增生症候群(ALPS)、慢性淋巴母細胞性白血病、毛細胞白血病、慢性淋巴性白血病、周邊T細胞淋巴瘤、小淋巴細胞淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤、濾泡型淋巴瘤、勃克氏(Burkitt)淋巴瘤、艾普斯坦-巴爾病毒陽性T細胞淋巴瘤、組織細胞淋巴瘤、何傑金(Hodgkin)症、彌漫侵襲性淋巴瘤、急性淋巴性白血病、T γ 淋巴增生症、皮膚B細胞淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤(意即蕁狀黴菌病)及Sézary症候群。

另外，所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法

可用於治療貧血症及血液病症，包括慢性貧血症、再生不良性貧血症，包括範可尼(Fanconi)再生不良性貧血症；特發性血小板減少性紫癜(ITP)；脊髓發育不良症候群(包括頑固性貧血、帶有環狀成高鐵紅細胞之頑固性貧血、胚胎過多之頑固性貧血、轉換中的胚胎過多之頑固性貧血)；骨髓纖維化症/髓樣化生；及鎌狀細胞血管閉塞危象。另外，晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)用於治療慢性自發性嗜中性白血球減少症。

晶性TNFR2多肽及一或多種抗血管生成因子之結合可用於治療實體腫瘤，藉此減少滋養腫瘤組織的血管形成。適用於該等組合療法之抗血管生成因子包括IL-8抑制劑、血管抑制素、內皮抑制素、半光胺酸捲曲區5(kringle 5)、血管內皮生長因子抑制劑(VEGF)、血管生長素-2或血管生成素-1之其他拮抗劑、血小板活化因子拮抗劑，及基本纖維母細胞(basic fibroblast)生長因子拮抗劑。抵抗血管內皮生長因子的抗體(例如重組人化抗VEGF)(AVASTIN™，一般稱為比伐希路馬"bevacizumab"Genentech, Inc.)用於與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)組合療法。

在本發明一實施例中，晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)與蛋白酶體抑制劑組合投與癌症患者，包括投與遭受血液癌或實體腫瘤之患者。蛋白酶體控制涉及細胞迴圈及細胞凋亡之各種蛋白質的穩定性，例如細胞周期蛋白(cyclins)及NF-kappaB(例如參見Schenkein, 2002, Clin Lymphoma 3: 49-55及Adams, 2002, Curr Opin Oncol 14:

628-634)。蛋白酶體抑制劑可誘發細胞凋亡，且因此可將癌細胞敏化成為其他抗癌劑。用於本組合之例示性蛋白酶體抑制劑包括(例如)苺氧羰基-L-亮胺醯基-L-亮胺醯基-L-亮胺酸(MG132)，斷裂雷克塔西汀clasto- lactacystin β 內酯(A.G.Scientific, Inc.)，苺氧羰基-L-異亮胺醯基-(γ)-第三丁基-L-穀胺醯基-L-丙胺醯基-L-亮胺酸(PSI)，N-乙醯基-亮胺酸-亮胺酸-正亮胺酸(ALLN)，MLN519(Millennium Pharmaceuticals)，[(1R)-3-甲基-1-[[[(2S)-1-氧基-3-苯基-2-[(吡嗪基羰基)胺基]丙基]-胺基]丁基]硼酸(PS-341，一般稱為 "bortezomib" 商標名 VELCADE[®]；Millennium Pharmaceuticals)，及苺氧羰基-L-亮胺醯基-L-亮胺醯基-L-正纈胺酸(MG115；Affiniti Research Products)。例如，多發性骨髓瘤、卵巢癌、前列腺癌、乳癌、血液惡性腫瘤，例如淋巴瘤或白血病，或其他腫瘤可同時用蛋白酶體抑制劑(例如PS-341)及晶性TNFR2多肽(例如TNFR2：Fc或晶性依那西普)來治療。

特定治療之不良副作用可用晶性TNFR2多肽(例如TNFR2：Fc)來治療。在某些情況下該等副作用藉由TNF- α 含量升高來調節，因此該等患者將獲益於用降低TNF- α 含量之試劑的治療。例如，可投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2：Fc)以幫助抵抗與化學療法相關之嘔吐或其他藥物誘發之嘔吐。另外，晶性TNFR2多肽用於治療與腦部腫瘤放射治療相關的放射所誘發的腦部損傷。此外，晶性TNFR2多肽用於治療與投與單株抗體相關之毒性，單株抗

體直接針對存在於特定類型癌細胞表面上的抗原。例如，本文所揭示之晶性 TNFR2 多肽可用來治療與 CAMPATH 1-H[®](一般稱為 "alemtuzumab" Berlex Laboratories; 亦參見 EP 0328404A1)之灌注相關的毒性，CAMPATH 1-H 用於治療慢性淋巴細胞白血病。CAMPATH 1-H 係對於 CD52 具有特異性之人化抗體，CD52 係發現於單核細胞、B 細胞及 T 細胞上之細胞表面抗原。在本發明之另一實施例中，可投與所揭示之晶性 TNFR2 多肽(諸如晶性 TNFR2:Fc 或晶性依那西普)以改善與長期干擾素治療相關的自體免疫反應病症。

晶性 TNFR2 多肽可投與癌症患者以減少與長期投與干擾素相關的不良副作用，其包括疲勞、發熱、嗜中性白血球減少症、皮疹、頭痛、消化病症、肝酶不均衡及如此等等。例如，干擾素 γ (IFN γ)已在卵巢癌中顯示出活性，因此患卵巢癌的患者可同時投與 IFN γ 及晶性 TNFR2 多肽(例如晶性 TNFR2:Fc)或晶性依那西普來治療。類似地，IFN α 通常用於治療黑素瘤、慢性骨髓性白血病、基底細胞癌、毛細胞白血病、膀胱癌、幼年及童年血管瘤、多發性骨髓瘤、卡波西氏肉瘤、蕁狀黴菌病、非何傑金淋巴瘤及腎細胞癌且其可與晶性 TNFR2 多肽(例如 TNFR2:Fc)同時投與以減少干擾素所誘發的副作用。

另外，晶性 TNFR2 多肽可用於預防藥物對於 α -1-酸糖蛋白(AGP)所結合之試劑的抵抗力之發展或緩解藥物對試劑的抵抗力，AGP 係能夠結合於小分子且較佳結合於鹼性分子的蛋白質。AGP 係急性期蛋白質，其在各種病理症狀中

變得增加，包括在慢性發炎、心肌梗塞及癌症中。STI 571(Glivec[®]，一般稱為"依麥替尼布(imatinib)"，Novartis)係Bcr-Abl及C套組激酶活性之活性抑制劑，且用於治療慢性骨髓性白血病(CML)。CML之小鼠模型研究已顯示AGP結合依麥替尼布並使其鈍化，因此導致對該藥物的抵抗力(Gambacorti-Passerini 等人，2000, J Natl Can Inst 92: 1641-1650)。患者之AGP含量可藉由投與己酮可可鹼來降低(Voisin等人，1998, Am J Physiol 275: R1412-R1419)。本發明提供藉由同時向CML患者(其正經受依麥替尼布之治療)投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc或晶性依那西普)來預防或降低對依麥替尼布之抵抗力。UCN-01(7-羥基蛋白激酶C抑制劑(hydroxystaurosporine))，一種用於治療胃腸腫瘤及其他實體腫瘤之試劑，亦具有與AGP結合之傾向(Senderowicz 等人，2000, J Natl Cancer Inst 92(5): 376-387; Noriaki等人，2000, Biol Pharmac Bull 23(7): 893-895; Fuse等人，1999, Cancer Res 59(5): 1054-1060; Tamura等人，1999, Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol 18: A611)。本文提供藉由向正同時用UCN-01治療之胃腸癌患者投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)來預防或降低與AGP結合之UCN-01，藉此提高UCN-01治療之效力。或者，接受依麥替尼布或UCN-01之患者可藉由同時投與IL-1抑制劑或晶性TNFR2多肽及連同IL-1抑制劑(例如在WO 01/87328中所述之IL-1抑制劑中之一種)來治療，其全文以引用的方式並入本文。對於該等方法，晶性TNFR2多肽可

每周投與一或多次，例如，每周一次、兩次或三次。一種投與晶性TNFR2多肽之適當模式為皮下注射。當患者是成年人時，晶性TNFR2多肽之適當注射劑量包括每劑量5-12 mg/m²身體表面積，或每劑量25 mg或50 mg。若患者為小兒科患者，晶性TNFR2多肽可藉由每周一次或多次皮下注射0.4 mg/kg體重之劑量來投與，高達每劑量25 mg之最大值。

肺部病症

大量肺部病症亦可用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療。一種此症狀為成人呼吸窘迫症候群(ARDS)，該疾病與TNF- α 上升相關，且可由許多原因激發，包括曝露於毒性化學藥品、胰腺炎、外傷或其他原因。本發明所揭示之化合物、組合物及/或組合療法亦用於治療支氣管肺發育不良(BPD)；淋巴管-平滑肌瘤(lymphangio-leiomyomatosis)；肺動脈高血壓；早產兒慢性纖維化肺病；及特發性支氣管擴張。特發性支氣管擴張係一種其中嗜中性粒細胞調節支氣管基質之蛋白多糖組份降解的疾病。支氣管擴張患者之支氣管分泌物中的前發炎介質(尤其為TNF- α)懷疑可提高該等嗜中性粒細胞之降解作用(Shum等人，Am J Respir Crit Care Med 162：1925-31(2000))。本發明提供治療特發性支氣管擴張，其包含投與晶性TNFR2多肽(例如TNFR2：Fc)。另外，本發明之化合物、組合物及/或組合療法用於治療職業肺病，包括石棉沈滯症、煤炭工人塵肺症、矽肺病或與長期曝露於微粒下相關之相似病症。本發明之其他態樣中，所揭示之化合

物、組合物及/或組合療法用於治療肺病，包括與慢性支氣管炎或肺氣腫相關之慢性阻塞性肺病(COPD)；纖維化肺病，例如囊性纖維化、特發性肺纖維化及放射誘發之肺纖維化；肉樣瘤病，包括肺肉樣瘤病；及過敏反應，包括過敏性鼻炎、接觸性鼻炎、特應性皮炎及哮喘。

囊性纖維化係遺傳性症狀，其特徵主要為濃稠黏液積聚，容易使患者受到慢性肺感染及胰腺阻塞，其導致營養吸收障礙及營養不良。可投與晶性TNFR2多肽以治療囊性纖維化。若有必要，則用晶性TNFR2多肽治療時可同時投與皮質類固醇、黏液稀釋劑，例如吸入之重組脫氧核糖核酸酶I(例如PULMOZYME[®]；Genentech, Inc.)或吸入之托普黴素(tobramycin)(TOBI[®]；Pathogenesis, Inc.)。晶性TNFR2多肽亦可隨矯正基因療法、刺激囊性纖維化細胞分泌氯化物之藥物或其他仍待發現之治療方式同時投與。治療之充分性可藉由(例如)觀測致病生物體(例如流感嗜血桿菌、金黃色葡萄球菌及綠膿假單胞菌)在唾液或肺灌洗液中數目的降低，藉由監測患者體重增加，藉由偵測肺容量增加，或藉由任何其他便利手段來評定。

晶性TNFR2多肽或與細胞激素IFN γ -1b(例如ACTIMMUNE[®]；InterMune Pharmaceuticals)組合之晶性TNFR2多肽可用於治療囊性纖維化或纖維化肺病，例如特發性肺纖維化，放射線誘發之肺纖維化及博萊黴素(bleomycin)誘發的肺纖維化。另外，該組合用於治療其他特徵為器官纖維化之疾病，包括全身性硬化(亦稱為"硬皮

病")，其通常涉及肝纖維化。對於治療囊性纖維化，晶性 TNFR2 多肽及 IFN γ -1b 可與 PULMOZYME[®] 或 TOBI[®] 或其他治療囊性纖維化之方式組合。單獨或與 IFN γ -1b 組合之晶性 TNFR2 多肽可與其他目前用來治療纖維化肺病之治療方式一同投與。該等額外治療包括糖皮質激素、硫唑嘌呤、環磷醯胺、青黴胺、可期辛(colchicine)、補充氧等等。纖維化肺病患者，例如 IPF，通常呈現出無痰乾咳、進行性呼吸困難且在肺功能測試中顯示出受限之供氧模式。胸部 X 光照片揭示患者肺部之纖維化積聚。當根據所揭示方式治療纖維化肺病時，治療之充分性可藉由觀測患者咳嗽(若存在咳嗽)的減少來偵測，或藉由使用標準肺功能測試以偵測總肺容量、肺活量、剩餘肺容積的改善來偵測，或藉由在運動條件下投與動脈血液氣體決定量測飽和度下降且根據一或多種該等量測來顯示患者肺功能已改善來偵測。另外，患者之改善可經由顯示患者肺中纖維化之進行已變得停止或減少之胸部 X 光照片的結果來確定。另外，當晶性 TNFR2 多肽與鬆弛素組合投與時(鬆弛素係向下調節膠原蛋白的生成從而抑制纖維化的激素)，或當晶性 TNFR2 多肽與阻礙 TGF- β 之纖維生成活性之試劑組合給出時，晶性 TNFR2 多肽用於治療器官纖維化。使用晶性 TNFR2 多肽及重組人體鬆弛素之組合療法係用於(例如)治療全身性硬化症或纖維化肺病，包括囊性纖維化、特發性肺纖維化、放射誘發的肺纖維化及博萊黴素誘發的肺纖維化。

風濕病及皮膚病

其他實施例提供使用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療各種風濕病之方法。TNF- α 抑制劑在治療風濕性關節炎上之用途參見Moreland, L.W., 1991, J Rheumatol 26 Suppl 57: 7-15且TNF- α 抑制劑在治療脊椎關節病及強直性脊椎炎上的用途在Schnarr等人, 2002, Clin Exp Rheumatol 20(Suppl. 28): S126-S129中及在Gorman等人, 2002, N Engl J Med 346(18): 1349-1356中分別揭示。可用晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法治療之病症包括: 成人及青少年風濕性關節炎; 全身性紅斑狼瘡; 痛風; 骨關節炎; 風濕性多肌痛; 血清反應陰性脊椎關節病, 包括強直性脊椎炎及瑞特症(Reiter's disease)(反應性關節炎)。本晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法用於治療牛皮癬性關節炎及慢性萊姆(Lyme)關節炎; TNF- α 抑制劑在治療牛皮癬性關節炎之用途描述於Ruderman, E.M., 2002, Am J Manag Care 8: S171-S180及Salvarani等人, 2002, Clin Exp Rheumatol 20(Suppl. 28): S71-S75中。亦可用該等化合物、組合物及/或組合療法治療之疾病為史提爾氏病(Still's disease)及與風濕性關節炎相關的葡萄膜炎。另外, 本發明之化合物、組合物及/或組合療法係用於治療導致隨意肌發炎(包括皮膚炎及多肌炎)的病症。此外, 本文所揭示化合物、組合物及/或組合係用於治療散發之包涵體肌炎, 因為TNF- α 可在該肌肉症發展中起重要作用。另外, 本文所揭示之化合物、組合物及/或組合係用於治療多中心網狀組織細胞增多症, 其中面部及手的關節損傷及丘疹結節與多核

巨細胞所生成之過量前發炎細胞激素有關。本發明之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法可用於抑制肥厚的癍痕，據信此現象係部分地由過量TNF- α 分泌所致。晶性TNFR2多肽可單獨投與或與其他抑制肥厚的癍痕之試劑(例如TGF- α 抑制劑)同時投與。

審計皮膚或黏膜之疾病亦可使用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療。該等病症包括皮膚棘層松解症，包括達裏耶(Darier)症、毛囊角化症及尋常性天皰瘡。亦可用本品性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法治療之病症係痤瘡；酒糟鼻；斑禿；口瘡性口炎；大皰性類天皰瘡；燒傷；皰疹樣皮炎；濕疹；紅斑，包括多形紅斑、大皰性多形紅斑(史蒂芬-瓊森(Stevens-Johnson)症候群)；皮膚發炎；扁平苔蘚；線性IgA大皰症(兒童慢性大皰皮膚病)；皮膚彈性損失；黏膜表面潰瘍；嗜中性皮炎(斯威特(Sweet)症候群)；毛髮紅糠疹；牛皮癬；壞疽性膿皮病及中毒性表皮壞死溶解。

在另一實施例中，所揭示之晶性TNFR2多肽用於治療及預防脂硬皮病(lipodermatosclerosis)及慢性靜脈潰瘍，其最常見位於腿上。研究已顯示：藉由活化基質金屬蛋白酶2(MMP2)及藉由誘發TGF α 及其他細胞激素生成，TNF- α 可有助於皮脂硬化症及慢性靜脈潰瘍之發病。奧克潘菲林(Oxpentifylline)及配妥西菲林(pentoxifylline)已顯示在該背景中有效。所揭示之晶性TNFR2多肽(包括晶性TNFR2：Fc或晶性依那西普)可用來治療慢性靜脈潰瘍，其或者單獨

使用或者與一或多種奧克潘菲林、配妥西菲林、GM-CSF、瘦素、PDGF、bFGF、EGF、TGF及/或IGF組合使用。該等治療將加速治癒且預防復發。投藥可為全身性或局部的。對於局部投藥而言，晶性TNFR2多肽以油膏、洗液、凝膠或乳霜之形式局部施加，或直接在損傷周圍注射於潰瘍中或在潰瘍之約10公分以內注射。

額外病症

亦提供使用晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法治療各種內分泌系統病症之方法。例如，晶性TNFR2多肽係用於治療青少年糖尿病發作(包括自體免疫及胰島素依賴型之糖尿病)且亦治療成年人糖尿病發作(包括非胰島素依賴型及肥胖調節之糖尿病)。另外，本化合物、組合物及/或組合療法係用於治療與糖尿病相關之繼發症狀，例如糖尿病視網膜病、糖尿病患者之腎移植排斥、肥胖調節之胰島素抵抗力及腎衰竭，其自身可與蛋白尿及高血壓相關。其他內分泌病症亦可用該等化合物、組合物及/或組合療法來治療，包括多囊性卵巢病、X連鎖腦白質腎上腺萎縮症、甲狀腺機能減退及甲狀腺炎，包括橋本甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)(意即自體免疫甲狀腺炎)。

所揭示之晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)、組合物及/或組合療法進一步用於治療肝之症狀，例如肝炎，包括急性酒精性肝炎、急性藥物誘發的肝炎或病毒性肝炎、甲型肝炎、乙型肝炎及丙型肝炎(hepatitis A、B及C)、硬化膽管炎、自體免疫肝炎、特發性門靜脈高血壓及不明原因導

致的肝臟發炎。前述肝病可用晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)與其他用於治療相同症狀之藥劑來同時治療。作為實例，晶性TNFR2多肽可用來治療同時用干擾素- α (IFN α)治療之丙型肝炎患者，包括慢性丙型肝炎。肝臟中TNF- α 之高表現會干擾IFN α 之作用，因此干擾患者對IFN α 治療之反應(Hong等人，2001, FASEB J 15: 1595-1597)。可與晶性TNFR2多肽同時投與以治療丙型肝炎的治療方式包括聚乙二醇化IFN α 、病毒唑(ribavirin)或病毒唑與干擾素 α 或聚乙二醇化干擾素- α 之組合。適於與晶性TNFR2多肽同時使用之干擾素- α 部分包括IFN α -2a(例如ROFERON[®]; Hoffmann-LaRoche)、聚乙二醇化IFN α -2a(例如PEGASYS[®]; Hoffmann-LaRoche)、US 20020127203A1中所描述之聚乙二醇化IFN α -2a或-2b，或WO 9964016中所描述之聚乙二醇化IFN α 接合物。在另一實施例中，丙型肝炎可藉由同時投與干擾素- α 及晶性TNFR2多肽而非晶性TNFR2:Fc(例如結晶形式之來那西普(lenercept)或奧那西普(onercept))來治療。

胃腸系統病症亦可用晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療，包括腹腔病；TNF- α 抑制劑在治療克羅恩氏病(Crohn's disease)上之用途在Ricart等人，2002, Drugs of Today 38(11): 725-744中有所揭示。另外，本發明之化合物、組合物及/或組合療法係用於治療克羅恩氏病；與胃腸病症或其他全身性病症相關之嘔吐；潰瘍性結腸炎；特發性胃輕癱；膽石病(膽石)；胰腺炎，包括慢性胰腺炎及與急

性胰腺炎相關之肺損傷；及潰瘍，包括胃潰瘍及十二指腸潰瘍。

本文亦包括使用本品性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法治療泌尿生殖器系統之病症的方法，例如血管球性腎炎，包括自體免疫血管球性腎炎、歸因於曝露在毒素下的血管球性腎炎或繼發於感染溶血性鏈球菌屬或其他傳染性試劑之血管球性腎炎。亦可用本發明之化合物、組合物及/或組合療法來治療尿毒癥症候群及其臨床並發症(例如腎衰竭、貧血及肥厚型心肌病)，包括與曝露於環境毒素、藥物下或與其他原因相關之尿毒癥症候群。可用本發明之化合物、組合物及/或組合療法來治療之其他症狀為血液透析並發症；前列腺病症，包括良性前列腺肥大、非菌性前列腺炎及慢性前列腺炎；及血液透析並發症。

另外，所揭示之本品性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法係用於治療各種涉及聽力損失的病症，例如與反常TNF- α 表現相關之病症。其中一種為內耳或耳蝸神經相關之聽力損失，據信其由自體免疫過程所致，意即自體免疫聽力損失。該症狀目前用類固醇、甲胺喋呤及/或環磷醯胺治療，其可與本品性TNFR2：Fc或其他本品性TNFR2多肽同時投與。亦可用所揭示之本品性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療膽脂瘤、通常與聽力損失相關之中耳病症。

另外，本發明提供本品性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法用於治療骨骼及關節之非關節炎醫學症狀。此涵蓋破骨細胞病症，其會導致骨骼損失，例如(但不限於)骨質疏鬆

症，包括停經後骨質疏鬆症、導致牙齒鬆動或損失的牙周炎及關節置換後假肢鬆動(一般與對磨損碎片之發炎反應有關)。後種情況亦稱為"整形移植骨質溶解"。其他可投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)來治療的症狀包括歸因於癌症高鈣血之顱下頷關節紊亂(TMJ)及骨骼損失，包括骨骼移位，例如可出現在肺黑素瘤或癌瘤，乳、肺、鱗狀細胞癌瘤，頭及頸癌，腎癌，或前列腺癌。

與移植有關的病症亦可用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合及/或組合療法來治療，例如移植物抗宿主病及其他實體器官移植導致的並發症，包括心臟、肝臟、肺、皮膚、腎或其他器官的移植。該等晶性TNFR2多肽可投與(例如)以預防或抑制阻塞性細支氣管炎的發展，例如肺移植後阻塞性細支氣管炎及阻塞性細支氣管炎伴有機化肺炎(bronchiolitis obliterans organizing pneumonia)。以外周血幹細胞移植形式經受自體性造血幹細胞移植的患者可能會發展成"植入性症候群"或"ES"，其係發生於約造血細胞移植時間之不利的且一般為自限性之反應且其可導致肺部惡化。ES可用IL-8或TNF- α (例如晶性TNFR2:Fc或其他晶性TNFR2多肽)之抑制劑來治療或用同時對抗該等細胞激素之抑制劑組合來治療。所揭示之晶性TNFR2多肽亦用於治療或預防移植失敗，例如骨髓移植排斥或接受者身體接受其他類型移植物失敗，例如角膜移植，或例如肝或其他實體器官移植，其中移植排斥通常由於TNF- α 及IL-10含量上升來實現。移植排斥可用晶性TNFR2多肽及IL-10抑制劑之

組合來治療。

眼疾亦可用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法來治療，包括孔源性視網膜剝離，及與吸煙有關的發炎症眼疾以及與吸煙有關或與老化有關的黃斑變性。

晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)、所揭示之組合物及/或本文所述之組合療法係用於治療影響女性生殖系統之病症。實例包括(但不限於)多發性移植失敗/不育；胎兒流失(fetal loss)症候群或IV胚胎流失(自發性流產)；先兆子癩懷孕或子癩；及子宮內膜異位。

另外，所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法係用於治療肥胖，包括對於致使瘦素形成減少或與使用抗鎮靜藥物相關之體重增加的治療。同樣本發明之化合物、組合物及/或組合療法係用於治療神經性疼痛、坐骨神經痛、老化症狀、嚴重藥物反應(例如，I1-2毒性或博萊黴素誘發之肺病及纖維化)，或用於抑制心臟或其他手術中同種異體紅血球輸入之前、期間或之後的發炎反應，或治療四肢或關節的創傷性外傷，例如創傷性膝傷。可用所揭示之晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法治療的其他各種醫學病症包括：多發性硬化；貝西氏(Behcet)症候群；修格倫氏(Sjogren)症候群；自體免疫溶血性貧血； β 地中海貧血症(β thalassemia)；肌萎縮性側索硬化(Lou Gehrig症)；帕金森氏症；及不明原因的腱鞘炎，以及各種自體免疫病症或與遺傳性缺陷相關的疾病。另外，本晶性TNFR2多肽、組合物及/或組合療法用於治療遺傳性病症，例如高雪氏病

(Gaucher's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's Disease)、線性IgA疾病及肌肉萎縮症。

在本發明之另一實施例中，本文所揭示之晶性TNFR2多肽用於治療孤獨症系列病症及其他普遍發展的病症。已顯示前發炎細胞激素(包括TNF- α 及IL-1)在孤獨症患者之子集中過量生成，說明該等患者具有過度的先天性免疫反應及/或對於T細胞反應之調節性細胞激素的異常生成。因此，本文提供藉由投與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2：Fc)來治療孤獨症系列病症之方法。

額外組合療法

用來治療本文所述疾病之其他各種藥品亦可與包含晶性TNFR2之組合物或使用晶性TNFR2所製備之組合物同時投與。該等藥品包括：抗病毒劑；抗生素；止痛劑；非類固醇之抗發炎藥物(NSAID)；疾病緩解之抗風濕藥物(DMARD)；皮質類固醇；局部性類固醇；全身性類固醇(例如潑尼松(prednisone))；細胞激素；發炎細胞激素之拮抗劑；對抗T細胞表面蛋白質之抗體；口服類維生素A；水楊酸；及羥基脲。適用於該等組合之止痛劑包括：乙醯胺苯酚、可待因(codeine)、萘磺酸丙氧芬、鹽酸氧可酮、重酒石酸氫可待因酮及曲馬多(tramadol)。適用於本組合療法之NSAID包括：水楊酸(阿司匹林)及水楊酸鹽衍生物；布洛芬(ibuprofen)；吲哚美辛(indomethacin)；賽利克西(celecoxib)(CELEBREX[®])；羅菲可西保(rofecoxib)(VIOXX[®])；伐地考昔(valdecoxib)(BEXTRA[®])；酮絡酸

(ketorolac)；萘丁甲酮(nabumetone)；吡羅昔康(piroxicam)；萘普生(naproxen)；奧沙普嗪(oxaprozin)；舒林酸(sulindac)；酮洛芬(ketoprofen)；雙氯芬酸(diclofenac)及其他COX-1及COX-2抑制劑、丙酸衍生物、乙酸衍生物、反丁烯二酸衍生物、羧酸衍生物、丁酸衍生物、昔康(oxicam)、吡唑及吡唑啉酮，包括新開發之抗發炎物。適用於該等組合之DMARD包括：脘唑硫嘌呤、環磷醯胺、環孢黴素、硫酸羥基氯喹、甲胺喋呤、來氟米特(leflunomide)、二甲胺四環素、青黴胺、柳氮磺胺吡啶及金化合物，例如口服金、硫代蘋果酸金鈉及金硫葡糖。可用來與晶性TNFR2組合之細胞激素抑制劑包括(例如)TGF β 之拮抗劑、IL-6之拮抗劑或IL-8的拮抗劑。晶性TNFR2多肽亦可與細胞激素GM-CSF、IL-2及/或蛋白激酶A型1之抑制劑組合投與以提高正接受抗逆轉錄病毒治療之感染HIV患者的T細胞增殖。另外，晶性TNFR2多肽可與IL-13抑制劑組合以治療何傑金症。神經生長因子亦可與晶性TNFR2多肽組合以治療特定症狀。該等症狀包括神經變性症、脊髓損傷及多發性硬化。其他可用該組合療法之症狀為青光眼及糖尿病。另外，晶性TNFR2多肽可與抗瘡藥或秋水仙鹼組合投與。

其他適於與晶性TNFR2多肽組合治療本文所述疾病之化合物包括小分子，例如沙立度胺(thalidomide)或沙立度胺類似物、己酮可可鹼或基質金屬蛋白酶(MMP)抑制劑或其他小分子。適於本目的之MMP抑制劑包括(例如)描述於美國專利案號No. 5,883,131、5,863,949及5,861,510之專利中的

抑制劑以及描述於美國專利U.S. 5,872,146中的巰基烷基肽醯基化合物。其他可減少TNF- α 生成之小分子包括(例如)描述於美國專利案號No. 5,508,300、5,596,013及5,563,143之專利中的分子，其中任何一種可與晶性TNFR2多肽組合投與。其他用於與晶性TNFR2多肽組合治療本文所述疾病之小分子包括描述於U.S. 5,747,514及U.S. 5,691,382中的MMP抑制劑，以及描述於U.S. 5,821,262中的異羧肟酸衍生物。本文所述疾病亦可用組合療法來治療，包括抑制磷酸二酯酶IV及TNF- α 生成之小分子，例如經取代肟衍生物(WO 96/00215)、磺醯胺喹啉(U.S. 5,834,485)、芳基咪喃衍生物(WO 99/18095)及雜二環衍生物(WO 96/01825; GB 2 291 422 A)。亦用於與晶性TNFR2多肽組合的為抑制TNF- α 及IFN γ (WO 99/15524)的噻唑衍生物，以及抑制TNF- α 及其他前發炎細胞激素的黃嘌呤衍生物(例如參見U.S. 5,118,500、U.S. 5,096,906及U.S. 5,196,430)。其他與晶性TNFR2多肽同時用於治療本文所述病症之小分子包括U.S. 5,547,979中所述之小分子。

另外，晶性TNFR2多肽可與第二TNF- α 拮抗劑組合，其包括對抗TNF- α 或TNF- α 受體之抗體、充當TNF- α 競爭性抑制劑的衍生自TNF- α 的肽(例如U.S. 5,795,859或U.S. 6,107,273中所描述之肽)、溶解性TNFR而非Ig稠合蛋白質，或其他降低內源性TNF- α 含量的分子(例如抑制TNF- α 生成之反義寡核苷酸或核苷酶，或TNF- α 轉換酶的抑制劑)(例如參見U.S. 5,594,106)，或任何上述小分子或TNF-

α 抑制劑，其包括己酮可可鹼或沙立度胺或其衍生物。沙立度胺或沙立度胺衍生物可與晶性 TNFR2 多肽同時投與來治療(例如)血液及腫瘤病症。該等病症之實例(其中任何病症可用晶性 TNFR2 多肽單獨治療)包括移植物抗宿主病、骨髓發育不良症候群、再生不良性貧血、鐮狀細胞血管閉塞危象、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、毛細胞白血病、惡病質及高鈣血之腫瘤伴隨症候群、多發性骨髓瘤及 POEMS 症候群(多發性神經病、內臟增大、內分泌病、單株丙種球蛋白病及皮膚變化)、骨髓纖維化症/髓樣化生、卡波西氏肉瘤、與癌症相關的惡病質、澱粉樣變性病、慢性貧血症、鱗狀細胞癌瘤、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、自體免疫溶血性貧血及 β 地中海貧血症。在本發明之一實施例中，用於與沙立度胺組合之晶性 TNFR2 多肽為晶性 TNFR2：Fc 或晶性依那西普。

另外，本發明提供治療需要其之人類患者的方法，該方法涉及向患者投與治療有效量之晶性 TNFR2 多肽及 IL-4 抑制劑，如 US 2001/0021380 A1 中所述，其全文以引用的方式並入本文中。用晶性 TNFR2 多肽及 IL-4 抑制劑之組合所有有效治療的症狀包括哮喘、慢性阻塞性肺病、肺泡蛋白沈著症、博萊黴素誘發之肺病及纖維化、放射誘發之肺纖維化、囊性纖維化、膠原蛋白在肺中的積聚、ARDS；各種皮膚病，包括(但不限於)皰疹樣皮炎(杜林氏(Duhring)症)、特應性皮炎、接觸性皮炎、蕁麻疹(包括慢性特發性風疹)，及自體免

疫發皰症，包括尋常性天皰瘡及大皰性類天皰瘡；重症肌無力、肉樣瘤病，包括肺肉樣瘤病、硬皮病、反應性關節炎、高IgE症候群、多發性硬化症及特發性嗜曙紅細胞過高症候群；對藥物之變應反應，且作為變應性免疫療法之佐劑。在特定實施例中，晶性TNFR2多肽及IL-4抑制劑之組合藉由皮下注射或藉由氣溶膠肺部投藥(例如用噴霧器)每周投與一或多次。

對前述疾病之其他治療包括同時投與晶性TNFR2多肽與阻礙RANK及RANK-配位體之結合的化合物，例如對抗RANK或RANK-配位體之拮抗性抗體、骨保護素(osteoprotegerin)或可溶解型RANK(包括RANK:Fc)及並不激發RANK之可溶解型RANK-配位體。在本發明之一實施例中，特異結合人類RANKL之抗體與晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)同時投與。適用於該等組合之可溶解型RANK在(例如)U.S. 6,017,729中有述。晶性TNFR2多肽與RANK:Fc或骨保護素同時投與可用來預防各種背景下的骨損壞，包括(但不限於)骨質疏鬆症、多發性骨髓瘤或其他導致骨骼惡化之惡性腫瘤，或目標為預防骨骼移位元之抗腫瘤療法，或與假肢磨損碎片或與牙周炎有關之骨損壞。可用晶性TNFR2多肽及RANK抑制劑之組合來治療之腫瘤包括乳癌、肺癌、黑素瘤、骨癌、鱗狀細胞癌瘤、頭及頸癌、腎癌、前列腺癌及與高鈣血有關之癌症。

額外用途

淋巴細胞用非病毒媒介轉染可導致目標細胞經TNF- α 及

CD95調節之通道凋亡(例如參見Ebert等人, Cytokines, Cell & Mol Ther 5: 165-73(1999))。晶性TNFR2多肽(例如晶性TNFR2:Fc)可單獨使用或與CD95抑制劑(例如對抗CD95之抗體)組合使用以抑制此凋亡。當使用非病毒媒介時,特別是當使用經脂質體調節或經受體調節之基因轉移方法時,該治療將增加基因轉移至淋巴細胞。該治療將提高外源基因並入目標細胞中。

另外,本組合物亦可用來製造一或多種藥品,該或該等藥品用於治療或緩解晶性TNFR2多肽意欲治療之病症。

提供下列實例以更全面地說明本發明,但不將其解釋為限制其範疇。

實例1

結晶化ENBREL[®](依那西普)之方法

如上所述,依那西普多肽由部分稠合至部分人體免疫球蛋白G1(IgG1)之人體腫瘤壞死因子受體2(TNFR p75)之細胞外域組成。依那西普多肽係藉由在哺乳動物宿主細胞中表現編碼依那西普之構築基因(DNA construct)來製備並接著將其純化為大體上均一。對於以下結晶化試驗,依那西普多肽係懸浮於磷酸鹽緩衝液中。

使用結晶化篩網(PEG/LiCl Grid Screen; Hampton Research, Aliso Viejo, CA)來達成依那西普之結晶化,其採用被稱為"懸滴"蒸汽擴散之結晶化高分子的方法。將包含多肽樣品與結晶化試劑("結晶化緩衝液"或"母液")之混合物的液滴沈積於矽烷化之(sialanized)蓋玻片下側,並接著

將蓋玻片上之液滴用油脂密封且通常置放於24井VDX盤上，其用液態試劑庫造成蒸汽平衡。爲了達成平衡，水蒸氣在液滴與盤的井中1毫升儲集溶液之間交換。當水離開液滴時，多肽樣品濃度相對增加，其可最終導致過度飽和。濃度增加之多肽樣品確實需要發生結晶化。因爲相等體積之樣品及試劑混合來形成液滴，所以通常液滴較儲集液含有更低濃度試劑，且通常液滴含有儲集液中試劑濃度的一半。在該等試驗中，液滴中初始多肽濃度通常爲25.48 mg/mL或50.96 mg/mL，但是在依那西普多肽濃度大約爲6 mg/mL時亦觀測到結晶化，且結晶化可在多肽更高濃度(例如100 mg/mL)或更低濃度(例如大約3 mg/mL)獲得，但在更低濃度時，可能視初始液滴大小而定，晶體生長需要培育更長時間。

將結晶化篩網設置於24井VDX聚丙烯組織培養盤中。VDX盤中每個位置含有1 mL試劑儲集液，每井中試劑儲集液與其他井中儲集液之組成有差異以建立一系列不同結晶化緩衝條件。將1微升各種多肽濃度之多肽溶液添加至1微升儲集溶液中以形成液滴。在攝氏 5 ± 3 度或環境室溫下(攝氏 20 ± 3 度)來培育盤。在一些於環境室溫下所培育之井中大約48小時內出現晶體並在隨後的日子裏繼續生長。

在最初的篩網中，在下列條件下獲得晶體，使用濃度爲25.48 mg/mL或濃度爲50.96 mg/mL的依那西普：

1. 1.0 M氯化鋰，0.1 M HEPES pH 7.0；30%聚乙二醇6000
2. 1.0 M氯化鋰，0.1 M Tris-HCl pH 8.0；30%聚乙二醇6000

3. 1.0 M氯化鋰，0.1 M二甘胺酸 pH9.0；30%聚乙二醇 6000

4. 0.2 M硫酸鋰，0.1 M Tris-HCl pH 8.5，30%聚乙二醇 4000

5. 0.2 M硫酸鋰，0.1 M Tris-HCl pH 8.5，25%聚乙二醇 3350

6. 0.5 M硫酸鋰，0.1 M Tris-HCl pH 8.5

在上述前三個條件下所形成之依那西普晶體為桿狀或杆束狀，大約1 mm長，且通常用非晶體沈澱物來達成。自硫酸鋰條件所形成的依那西普晶體為桿狀，大約0.1-0.2 mm長，且該晶體不用氯化鋰條件下所見之非晶體沈澱物來生成。一些依那西普晶體用X射線繞射來測試且並未顯示出鹽類繞射圖，該結果與含有多肽材料之晶體一致。將一些依那西普晶體溶解且將其多肽內容物藉由七次埃德曼(Edman)自動降解迴圈來部分地序列化；自該等晶體獲得3-4 pmol部分胺基酸序列且證實其匹配依那西普序列之N-末端部分(LPAQVAF；參見SEQ ID NO：4之胺基酸1至7)。圖1為依那西普晶體照片，該晶體由每毫升含有50.96 mg依那西普之多肽溶液以及0.1 M HEPES pH 7.0、30% PEG 6000、0.7 M氯化鋰之結晶化儲集緩衝液所形成；7天之後在環境室溫下手動收集晶體，用上述儲集緩衝液充分洗滌，並拍攝照片。將該組晶體經受上述N-末端胺基酸序列分析。另一結晶化條件-1M硫酸鋰、0.1M Tris-HCl pH 8.5、0.01M氯化鎳生成之晶體；但是，該等晶體之多肽含量並未確認且因此在此特殊組合條件下，認為鹽晶體已經形成。

基於該等結果，如上述前三個條件之三個參數中任一個 (LiCl 濃度、pH 值及表示成 % (重量 / 體積) 之聚乙二醇 (PEG) 6000 濃度) 在其他試驗中變化，其導致在其他試驗盤中之每一液滴均形成晶體。氯化鋰濃度 0.7 M 至 1.2 M 之間、PEG 6000 濃度 22% 至 32% 之間及 0.1M HEPES pH 值介於 6.8 至 7.3 之間所有都將導致於環境室溫下、依那西普濃度為 25.48 及 50.96 mg/mL 時在大約 48 小時內成功的結晶。雖然依那西普結晶化可能不發生在每個包括 0.2M LiCl 的組合條件下及 / 或當使用 0.2M LiCl 時可能需要更長時間來形成依那西普晶體，但其他試驗擴充了成功結晶化條件之範圍，包括 0.2 M 至 1.2 M LiCl，及 16% 至 32% PEG 6000。因此，以下條件之所有組合 - 氯化鋰濃度 0.3 M 至 1.2 M 之間，PEG 6000 濃度 16% 至 32% 之間，及 0.1M HEPES pH 值 6.8 至 7.3 之間 - 被認為是依那西普結晶化之適合條件。另外，含有 0.2 M 至 0.5 M 硫酸鋰、0.1M Tris-HCl (大約 pH 8.5) 及視情況包括高達 30% PEG (大小範圍 PEG 3350-PEG 4000) 的條件被認為是依那西普結晶化之適合條件。

實例 2

ENBREL[®] (依那西普) 結晶化之額外方法

如實例 1 所述之結晶化之 "懸滴" 方法係用於製備額外依那西普晶體。依那西普由市售 ENBREL[®] 凍幹粉末根據每個產品之說明書來重建：一小瓶 ENBREL[®] 凍幹粉末含有 25 mg 依那西普、40 mg 甘露醇、10 mg 蔗糖及 1.2 mg 緩血酸胺，其用 1 mL 注射用無菌抑菌水、USP (含有 0.9% 苯醇) 來重建。

將重建之依那西普溶液使用 10,000 分子量之切斷 (cut off) 透析卡 (dialysis cassette) 來透析至水中，並接著使用 10,000 分子量切斷離心篩檢程式濃縮至 100 mg/mL。每個結晶化井在儲集液中含有 1.0 mL 之如下所列的特定結晶化試劑。藉由將 1 微升之依那西普 100 mg/mL 溶液添加至 1 微升結晶化試劑來製得液滴。晶體在環境室溫下 (大約攝氏 22 度) 生長；長度約 100 微米之針狀依那西普晶體形成於所有如下所列之結晶化試劑中，有時在少至兩天之時間內形成及其他狀況下經 2 至 4 周之時間來形成。

鹽條件：	緩衝條件：	2-甲基-2,4-戊二醇 (MPD) 條件：
0.09 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.5	40.28% MPD
0.10 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	37.82% MPD
0.10 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 5.0	35.11% MPD
0.08 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 5.0	41.83% MPD
0.12 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	31.30% MPD
0.15 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 5.0	43.82% MPD
0.11 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	30.55% MPD
0.04 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 5.0	45.75% MPD
0.19 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	30.78% MPD
0.14 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	37.13% MPD
0.16 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	31.27% MPD
0.23 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉，	41.87% MPD

	pH 4.0	
0.18 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.5	34.10% MPD
0.09 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.0	46.00% MPD
0.09 M 磷酸銨	0.10 M 乙酸鈉， pH 4.5	46.01% MPD
0.09 M 磷酸銨	0.10 M Hepes， pH 7.5	33.92% MPD
0.20 M 磷酸銨	0.10 M Tris， pH 8.5	50.0% MPD

在其他結晶化試驗中，長度約100微米之針狀依那西普晶體在下列結晶化條件下經2至4周形成：

鹽條件：	緩衝條件：	PEG條件：	溫度：
1.0 M 二-磷酸氫銨；0.2 M 氯化鈉	0.1 M 咪唑， pH 8.0	-	大約攝氏22度
10 M 二-磷酸氫銨	0.1 M 咪唑， pH 8.0	-	大約攝氏22度
0.2 M 氯化鈉	0.1 M CAPS(3-[環己胺基]-1-丙磺酸)，pH 10.5	20% PEG 8000	攝氏2-8度

實例3

結晶化條件之其他擴充形式

爲了達成多肽(例如TNFR2多肽)結晶化，可變化蒸汽擴散結晶化方法，例如上述實例1中所描述用於依那西普結晶化之"懸滴"方法。例如，可混合與試劑相關之其他體積之多肽樣品以改變在液滴及儲集液之間的試劑濃度差異，以及改變液滴中初始多肽濃度。將一份試劑與九份多肽樣品混合會生成一個液滴，其初始試劑濃度爲儲集液試劑濃度之

0.1倍。在本發明之特定實施例中，液滴中結晶化試劑的初始濃度大約為儲集液中結晶化試劑濃度之0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.7、0.8、0.85, 0.9或0.95倍。液滴中初始多肽濃度可至少低至大約6 mg/mL且至少高至100 mg/mL且可能高至120 mg/mL；更低濃度之多肽(例如3 mg/mL)可形成晶體但在可偵測到晶體之前需要更長的培育時間。

結晶化條件之進一步擴充可產生額外的適用於獲得依那西普晶體或其他TNFR2多肽之條件，如下所示。例如，組合條件可由鹽條件、pH值緩衝條件、可選之PEG條件及可選之輔助因子條件組成，其中每個條件係選自下述對應的條件組。

	體積範圍；最小值(如下選取) 至最大值(如下選取)		
	最小值：	最大值：	特殊值之實例：
鹽條件：			
氯化鋰	0.05 M或0.1 M	1.5 M、2.0 M或5.0 M	0.5 M、0.7 M、1.0 M、1.2 M
硫酸鋰	0.05 M或0.1 M	1.0 M、2.0 M或5.0 M	0.2 M、0.35 M、0.5 M
氯化鈉、氯化鉀、 磷酸銨、磷酸鈉、 磷酸鉀、檸檬酸 鈉、檸檬酸鉀、乙 酸銨、乙酸鈉、硫 酸銨、硫酸鎂或硫 酸鈉	0.01 M、0.025 M、 0.05 M、0.1 M或0.5 M	1.0 M、1.5 M、2.0 M、2.5 M或5.0 M	0.1 M、0.2 M、0.35 M、0.5 M、0.75M、1.0 M、1.5 M
磷酸氫二銨	0.1 M、0.5 M	1.5 M、2.0 M	1.0 M
PH值緩衝條件：			
0.05 M、0.1 M或 0.15 M HEPES	pH值4.0、5.0或6.0	pH值 8.0、8.5或9.0	pH值 6.5、6.75、6.9、7.0、7.25、

			7.5、7.75
0.05 M、0.1 M或 0.15 M Tris-HCl	pH值 5.0、6.0或7.0	pH值 9.0、9.5或 10.0	pH值 7.25、7.5、 7.75、8.0、8.25、 8.5、8.75
0.05 M、0.1 M或 0.15 M二甘胺酸	pH值 5.0、6.0或7.0	pH值 10.0、10.5 或11.0	pH值 8.0、8.25、 8.5、8.75、9.0、 9.25、9.5
0.05 M、0.1 M或 0.15 M乙酸鈉	PH 4.0	pH 5.0	pH值 4.0、4.5、5.0
0.05 M、0.1M、 0.15 M咪唑	pH 7.5	pH 8.5	pH 8.0
0.1 M CAPS(3- [環己胺基]-1-丙 磺酸)、pH 10.5	pH 9.0、pH 9.5	pH 11.5、pH 12.0	pH 10.0、pH 10.5、pH 11.0
PEG 或 2- 甲 基 -2,4- 戊 二 醇 (MPD)條件：			
聚乙二 醇 (PEG) 200、300、400、 600、750、900、 1000、1450、 3350、4000、 4500、6000或8000	0、1、2、3、5或 7.5%(液態：v/v；固 態：w/v)	32、35、40、45或 50%(液態：v/v； 固態：w/v)	10、12、15、20、25、 30%(液態：v/v； 固態：w/v)
2- 甲 基 -2,4- 戊 二 醇(MPD)	0、1、2、3、4、5、 6、7或8%(v/v)	40、45、50、60或 70%(v/v)	10、12、15、20、 25、30、32、 35%(v/v)
金屬離子("輔助 因子") 條件：			
氯化鎳	0.001 M或0.005 M	0.02 M、0.05 M、 0.1 M或0.2 M	0.01 M
下列金屬之化合 物：鋅、銅、鈣、 錳及鎂	0.001 M、0.002 M 或0.003 M	0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.5 M、1.0 M 或2.0 M	0.005 M、0.01 M、 0.02 M

實例 4

測試晶性多肽特性

在多肽晶體形成之後，其可經受各種分析以確認其多肽

含量並進一步檢驗其物理結構。例如，若有必要，則個別晶體可自結晶化溶液移除並用水性溶劑或添加劑或有機溶劑或添加劑來洗滌，隨後乾燥(例如藉由空氣乾燥，藉由惰性氣體流通過晶體，藉由凍幹法，藉由真空乾燥)。可將晶體離析，自晶體生長液滴移除，並接著裝載進行X射線繞射。

另一實例中，多肽晶體可自結晶化溶液移除並洗滌或漂洗，或大部分結晶化溶液可自晶體移除並用不同溶液來置換。如此，用於結晶化程式中之特殊鹽可在晶格中用不同鹽來置換。在本發明之一實施例中，結晶化TNFR2多肽(例如晶性依那西普)自結晶化緩衝液分離並置放於含有鈉鹽、鉀鹽或鎂鹽的溶液中(例如乙酸鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉、硫酸鈉、氯化鉀、檸檬酸鉀或硫酸鎂)。就X射線繞射而言，置換溶液可含有重原子，其用於測定結晶化多肽之原子座標。另一實施例中，TNFR2多肽可與其配位體共結晶，例如依那西普可與TNF- α 共結晶，用於測定TNFR-配位元體相互作用的詳細結構。

在又一實例中，多肽晶體可自結晶化溶液移除，且溶解於適當緩衝液中以進一步測試，例如含SDS緩衝液用以分析已藉由凝膠電泳結晶化之多肽。藉由凝膠電泳來分析蛋白質的方法為人熟知且包括用銀色或庫馬西(Coomassie)藍色染料來將凝膠著色，且將已結晶化之多肽的電泳遷移同已知分子量的多肽標記物的遷移相比較。在另一種方法中，多肽藉由使用特異結合於多肽之經標記抗體在凝膠中顯現多肽。已結晶化之多肽亦可溶解於緩衝液中，該緩衝

液適於藉由埃德曼降解來定序胺基酸，適於質譜分析、其他光譜散射、折射、繞射或吸收研究，或適於藉由將標記分子連接至多肽來標記多肽。

實例 5

ENBREL[®](依那西普)晶體之蛋白質含量的檢定

如實例 1 中所描述之結晶化"懸滴"方法係用於製備額外依那西普晶體。每個井中在儲集液中含有 100 微升結晶化試劑；該試驗中結晶化試劑為 0.2 M 乙酸銨、0.1M Tris pH 8.5 及 45% 2-甲基-2,4-戊二醇(MPD)。將依那西普置放於含有 25 mM 磷酸鈉 pH 值 6.3、100 mM NaCl 之溶液中，接著濃縮為 29-30 mg/mL，例如濃縮為 29.6 mg/mL。藉由添加 1 微升該 29 mg/mL 之依那西普溶液至 1 微升結晶化試劑中製得液滴，最終依那西普在液滴中的濃度為大約 14.5-15 mg/mL。發現依那西普在液滴中的最終濃度為在該等特殊結晶化條件下達成結晶化之重要因素，最終依那西普濃度為大約 15 mg/mL 對在重複試驗中結晶化有效，而最終濃度低於 10 mg/mL 或高於 25 mg/mL 無效。讓液滴在環境室溫下(攝氏 20 ± 3 度)與試劑在儲集液中進行蒸汽交換大約一至三周。通常每液滴兩至四個獨立成核之晶體形成為且呈現出多分支或樹枝狀結構，離開主結構有許多發射狀物或分支。每個完整分支之總尺寸為自成核中心之大約 50 微米長，大約 30 微米寬，及大約 10 微米厚或深。用尼龍圈將一個分支自晶體移除，用上述結晶化試劑連續洗滌三次，溶解於 4XSDS 拉米尼(Laemmli)緩衝液中，並接著置放於 SDS-聚丙烯醯胺凝

膠之井中且使其經受電泳。電泳之後將凝膠著色為銀色，且在結晶化蛋白質跑出之泳道中存在清晰可視的經染成銀色的條帶，結晶化蛋白質如用於生成晶體之依那西普製劑的蛋白質遷移相同程度。此SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳檢定使用該等試驗所生成晶體之其他分支重複進行，且經溶解晶性材料條帶的著色(具有與依那西普相同的電泳遷移)亦使用庫馬西藍色著色劑來達成。因此，自依那西普溶液所形成的晶體含有顯然為依那西普的材料，因為其在SDS-聚丙烯醯胺凝膠中遷移且在凝膠中生成蛋白質條帶，該條帶以與生成依那西普蛋白質已知樣品之相同方式生成。

實例6

測試結晶化多肽之生物活性

如上述實例描述，多肽晶體可自結晶化溶液移除，視情況置放於不同溶液中，洗滌，及/或乾燥以移除結晶化緩衝液，並接著溶解於適當溶液中用於進一步檢定。TNFR2多肽之生物活性可使用大量檢定方法中的任何一種來測試，例如結合性檢定用以測定先前結晶化TNFR2(意即重建之TNFR2多肽)與其配位體結合的能力。下列實例說明用於量測彼等與TNF- α (例如依那西普)結合之TNFR2多肽之生物活性的檢定(例如參見Mohler等人，1993, J Immunol 151: 1548-1561)，但熟習此項技術者將瞭解該等檢定在用於量測其他TNFR2多肽之生物活性時可加以修正。

結合性競爭檢定

0.5 nM經標記之人類TNF- α (例如 [^{125} I]TNF- α) 在結合介

質(RPMI 1640, 2.5% BSA, 50mM HEPES pH 7.4, 0.4% NaN₃)中於攝氏4度下用連續稀釋之競爭性結合劑(例如自晶形重建之依那西普或另一種已自晶形重建之與TNF- α 結合之TNFR2多肽, 或未標記之人類TNF- α , 或作為對照物之非結晶依那西普)及 2×10^6 U937細胞培育兩小時。隨後移除完全相同之等分試樣, 經由鄰苯二甲酸酯油混合物將等分試樣離心以分離自由及經結合配位體, 且使用 γ 計數器來量測放射活性(細胞結合之[¹²⁵I]TNF- α)。非特異性結合值藉由包括200x莫耳過量未經標記之TNF- α 來確定並自總結合數據中減去非特異性結合值來得到特異性結合值(例如參見Park等人, 1990, J Exp Med 171: 1073-1089)。

救助LPS所誘發的死亡

注射致命劑量LPS(脂多糖)提高小鼠血清TNF- α 含量, 若中和TNF- α 效應之足夠量試劑亦未投藥, 則會導致死亡(例如見Mohler等人, 1993, J Immunol 151: 1548-1561)。將LPS(諸如衍生自大腸桿菌之細菌性LPS)以10 mg/mL再懸浮於無菌鹽水中且以小等分試樣儲存在攝氏-20度下。在注射前將LPS稀釋至合適濃度並聲波處理一分鐘。小鼠(例如BALB/c雌性小鼠)(18至20克)經靜脈內注射0.2 mL鹽水中的LD60至LD100劑量之LPS(300至400微克)。LPS係單獨注射或者與自晶形重建之依那西普或另一種已自晶形重建之與TNF- α 結合的TNFR2多肽, 或諸如非結晶依那西普或人類IgG之對照蛋白質聯合注射。監控存活率至少5天。當投與足夠量重建之與TNF- α 結合的TNFR2多肽時, 經注射

LPS小鼠存活率的增加可表明重建之與TNF- α 結合的活性TNFR2多肽的存在。

本發明已經根據所發現或所提議的特定實施例來描述以包含本發明實務之特定模式。熟習此項技術者將瞭解，按照本發明揭示內容，可在特定例示性實施例中作出衆多不脫離本發明所要範疇之修正及變化。

存在於序列表中之序列

SEQ ID NO	類型	說明
SEQ ID NO : 1	胺基酸	人類腫瘤壞死因子受體2；(TNFR2, p75, CD120b, TNFRSF1B)；Swiss-Prot Database Accession No. P20333
SEQ ID NO : 2	胺基酸	人體免疫球蛋白 γ -1鏈恒定區(IgG1；Swiss-Prot Database Accession No. P01857)
SEQ ID NO : 3	胺基酸	人體免疫球蛋白 γ -1鏈恒定區的變數(SEQ ID NO : 2且Asp239->Glu；Leu241->Met)
SEQ ID NO : 4	胺基酸	依那西普

【圖式簡單說明】

圖1為自每毫升含有50.96 mg依那西普之多肽溶液所形成之依那西普晶體的照片，如在實例1中進一步所描述。結晶化儲存區(reservoir)緩衝液為0.1 M HEPES pH 7.0、30% PEG 6000、0.7 M氯化鋰；七天後室溫下手動採集晶體，將其在上述儲存區緩衝液中充分洗滌，並拍攝照片。將該組晶體經受N-末端胺基酸序列分析。

序列表

<110> AMGEN, Inc.
 OSSLUND, Timothy D.
 CLOGSTON, Christi
 CRAMPTON, Shon
 BASS, Randal

 <120> 晶性多肽

 <130> A-859

 <140> 093123111
 <141> 2004-08-02

 <150> 60/491,827
 <151> 2003 年 08 月 01 日 ; 2004
 2004 年 07 月 29 日

 <160> 4

 <170> PatentIn version 3.2

 <210> 1
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 1

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
 260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
 275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
 290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
 325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
 340 345 350

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
 355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
 370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
 385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
 405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
 420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
 435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 450 455 460

<210> 2
 <211> 330

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

	180		185		190										
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195					200						205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 4
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 稠合多肽

<400> 4

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

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

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val

180	185	190
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr		
195	200	205
Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly		
210	215	220
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys		
225	230	235
		240
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
	245	250
		255
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	260	265
		270
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
275	280	285
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
290	295	300
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
305	310	315
		320
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	325	330
		335
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
340	345	350
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
355	360	365

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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)



發明專利說明書

中文說明書替換頁(96年8月)

(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：93123111

※申請日期：93-08-02

※IPC 分類：C07K14/435

一、發明名稱：(中文/英文)

依那西普晶體及其製備方法與用途

CRYSTAL OF ETANERCEPT AND ITS PREPARING METHOD AND
USE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商安美基公司

AMGEN INC.

代表人：(中文/英文)

史都華 L 瓦特

WATT, STUART L.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州千橡市安美基中心大道 1 號

ONE AMGEN CENTER DRIVE, THOUSAND OAKS, CA 91320-1799

U. S. A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

五、中文發明摘要：

本發明提供 TNFR2 多肽之晶形，其包括晶性 TNFR2:Fc 多肽及晶性依那西普(etanercept)；本發明亦提供製造 TNFR2 多肽(例如 TNFR2-Ig 稠合多肽或依那西普)晶體之方法；本發明亦係關於所揭示晶性 TNFR2 多肽(例如晶性 TNFR2:Fc 多肽或晶性依那西普)在製造用於預防或治療本文所揭示之各種醫學病症之藥物上的用途。

六、英文發明摘要：

The present invention provides crystalline forms of TNFR2 polypeptides, including crystalline TNFR2:Fc polypeptides and crystalline etanercept. Also provided by the invention are methods of making crystals of TNFR2 polypeptides such as an TNFR2-Ig fusion polypeptide or etanercept. The present invention also relates to the use of the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc polypeptides or crystalline etanercept, in the manufacture of a medicament for the prevention or therapeutic treatment of each medical disorder disclosed herein.

十、申請專利範圍：

1. 一種依那西普晶體，其係呈針狀或桿狀形式。
2. 如請求項1之依那西普晶體，其中該晶體具有介於0.5毫米與1.5毫米之間的最大長度。
3. 如請求項1之依那西普晶體，其中該晶體具有介於0.05毫米與0.3毫米之間的最大長度。
4. 如請求項1之依那西普晶體，其中該晶體包含選自下列物組成之群的鹽：乙酸銨、磷酸銨、硫酸銨、磷酸氫二銨、氯化鋰、硫酸鋰、硫酸鎂、氯化鉀、檸檬酸鉀、磷酸鉀、乙酸鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉及硫酸鈉。
5. 如請求項1之依那西普晶體，其中該晶體包含選自下列物組成之群的鹽：乙酸銨、磷酸銨、磷酸氫二銨及氯化鈉。
6. 一種製造依那西普晶體之方法，其中該方法包含將依那西普多肽溶液與包含鹽之結晶化緩衝液組合，其中該結晶化緩衝液具有介於4.0與10.5之間的pH值，且該鹽選自下列物組成之群：乙酸銨、磷酸銨、硫酸銨、磷酸氫二銨、氯化鋰、硫酸鋰、硫酸鎂、氯化鉀、檸檬酸鉀、磷酸鉀、乙酸鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉及硫酸鈉。
7. 如請求項6之方法，其中使該組合與結晶化緩衝液之貯器處於蒸汽平衡而安置。
8. 如請求項6之方法，其中該結晶化緩衝液中的該鹽濃度介於0.04 M與1.2 M之間。
9. 如請求項6之方法，其中該結晶化緩衝液進一步包括2-甲基-2,4-戊二醇(MPD)或聚乙二醇(PEG)。

10. 如請求項6之方法，其進一步包含在晶體形成後將至少一部分結晶化緩衝液移除。
11. 如請求項10之方法，其中該部分結晶化緩衝液係藉由離心來移除。
12. 如請求項10之方法，其中該等晶體係置放於含有有機添加劑之溶液中。
13. 如請求項10之方法，其進一步包含添加賦形劑。
14. 如請求項13之方法，其中該賦形劑係選自由蔗糖、海藻糖或山梨糖醇組成之群。
15. 如請求項12之方法，其中該有機添加劑為乙醇或異丙醇。
16. 如請求項6之方法，其進一步包含乾燥已形成之晶體。
17. 如請求項16之方法，其中該等晶體係藉由曝露於空氣，或藉由曝露於真空或藉由曝露於氮氣來乾燥。
18. 一種包含晶形依那西普之組合物。
19. 一種如請求項1-5之任一項中之依那西普晶體或如請求項18之組合物在製備藥品上的用途。
20. 如請求項19之用途，其中該藥品係用於治療特徵為TNF- α 含量過量之症狀。
21. 如請求項20之用途，其中該藥品降低該受檢者血清或組織中的TNF- α 含量。
22. 如請求項20之用途，其中該症狀為風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、牛皮癬或強直性脊椎炎。