



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201021831 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：098138928

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 16 日

(51)Int. Cl.：

A61K47/30 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/11/17

美國

61/115,439

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72)發明人：羅玻 布萊恩 LOBO, BRIAN (US)；羅 沙雷那 LO, SABRINA (US)；瓦卡 艾帝亞 WAKANKAR, ADITYA (IN)；王 有強 約翰 WANG, YUCHANG JOHN (US)；汪 瑞塔 L WONG, RITA L. (US)；古德巴哈 皮耶 GOLDBACH, PIERRE (FR)；瑪勒 漢斯 克里斯 MAHLER, HANNS-CHRISTIAN (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：42 項 圖式數：6 共 115 頁

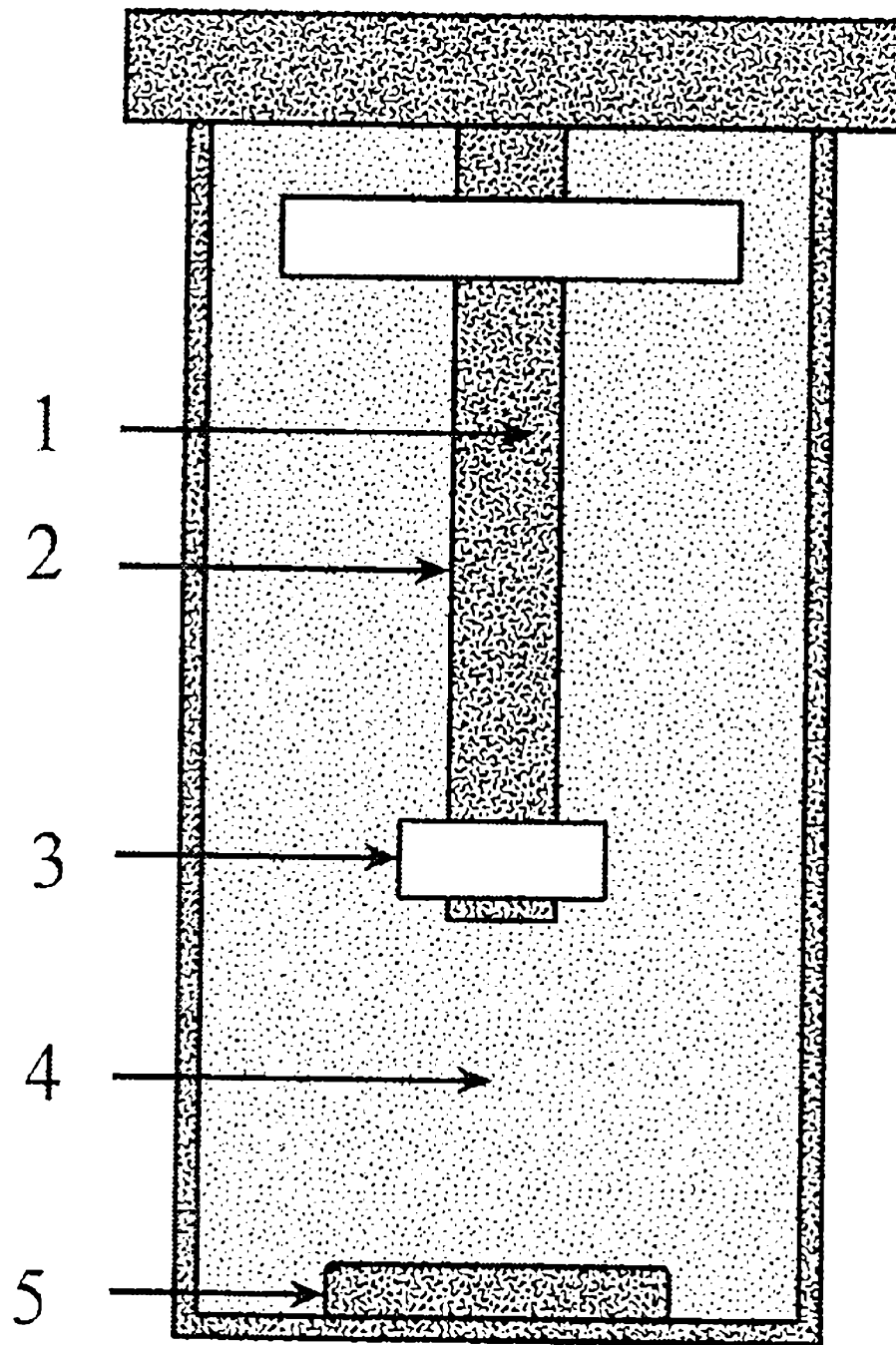
(54)名稱

減少巨分子於生理條件下聚集之方法及調配物

METHOD AND FORMULATION FOR REDUCING AGGREGATION OF A MACROMOLECULE UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

(57)摘要

本發明提供一種藉由添加 5% 至 20% 的分子量範圍 2000 至 54,000 道爾頓(daltons)的聚乙吡咯啉酮(PVP)來減少諸如蛋白質之巨大分子在生理條件下聚集且抑制其絮凝的方法。本發明另外提供一種在皮下投與巨大分子期間將注射部位之發炎減至最小的方法。在其他態樣中，本發明提供用於皮下投與巨大分子之醫藥調配物，及治療 CD20 陽性癌症或自體免疫疾病之方法，其包含以本發明之醫藥調配物投與人類化抗 CD20 抗體。本發明另外提供一種評估賦形劑減少抗體或其他巨大分子在生理條件下聚集之能力的活體外透析方法。



1：2H7 溶液

2：透析膜(1M 道爾頓
MWCO)

3：夾緊裝置

4：經修飾之 PBS 溶
液

5：攪拌棒



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201021831 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：098138928

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 16 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/30 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/11/17 美國 61/115,439

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72)發明人：羅玻 布萊恩 LOBO, BRIAN (US)；羅 沙雷那 LO, SABRINA (US)；瓦卡 艾
帝亞 WAKANKAR, ADITYA (IN)；王 有強 約翰 WANG, YUCHANG JOHN
(US)；汪 瑞塔 L WONG, RITA L. (US)；古德巴哈 皮耶 GOLDBACH, PIERRE
(FR)；瑪勒 漢斯 克里斯 MAHLER, HANNS-CHRISTIAN (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：42 項 圖式數：6 共 115 頁

(54)名稱

減少巨分子於生理條件下聚集之方法及調配物

METHOD AND FORMULATION FOR REDUCING AGGREGATION OF A MACROMOLECULE
UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

(57)摘要

本發明提供一種藉由添加 5% 至 20% 的分子量範圍 2000 至 54,000 道爾頓(daltons)的聚乙吡咯啉酮(PVP)來減少諸如蛋白質之巨大分子在生理條件下聚集且抑制其絮凝的方法。本發明另外提供一種在皮下投與巨大分子期間將注射部位之發炎減至最小的方法。在其他態樣中，本發明提供用於皮下投與巨大分子之醫藥調配物，及治療 CD20 陽性癌症或自體免疫疾病之方法，其包含以本發明之醫藥調配物投與人類化抗 CD20 抗體。本發明另外提供一種評估賦形劑減少抗體或其他巨大分子在生理條件下聚集之能力的活體外透析方法。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種藉由減少生理條件下之聚集來使皮下投與巨分子之注射部位處之發炎減至最低程度的方法。

本申請案主張2008年11月17日申請之美國臨時申請案第61/115,439號之權利，該申請案之揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

在過去二十年中，重組DNA技術已使得生物分子(尤其蛋白質)醫藥的數目顯著增加。生物分子藥劑之增加已引起藥物調配之新難題。高劑量之蛋白質治療劑(諸如抗體)可藉由靜脈內輸注傳遞至患者，但此投藥途徑不方便且蛋白質治療劑調配成供皮下注射(若可能)通常為較佳的。然而，皮下注射之藥物溶液體積比靜脈內輸注之藥物溶液體積小得多，因此蛋白質必須以較高濃度存在。治療性蛋白質在每毫升數十毫克之高濃度下，使治療性蛋白質長時間保持穩定溶解狀態至關重要。高濃度蛋白質溶液增加蛋白質-蛋白質相互作用的可能性，促成聚集；防止聚集已成為蛋白質藥物調配之主要問題。聚集導致許多問題，包括活性蛋白質之生物可用性降低、藥物動力學改變及不當免疫原性。(Frokjaer, S. 及 Otzen, D.E., Nat. Rev. Drug. Discov. 4: 298-306 (2005)； Jiskoot, W. 及 Crommelin, D.J.A., EJHP Practice 12:20-21 (2006))。

由於聚集過程之詳細分子機制尚未大體瞭解，因此防止

聚集在很大程度上仍根據經驗。典型策略為向蛋白質溶液中添加穩定劑。常用穩定劑包括糖、鹽、游離胺基酸(諸如L-精胺酸及L-麩胺醯胺)(Golovanov, A.P.等人, J. Am. Chem. Soc. 126:8933-8939 (2004))、多元醇(Singh, S.及Singh, J., AAPS Pharm. Sci. Tech 4: 1-9 (2003); Mishra, R.等人, J. Biol. Chem. 280:15553-15560 (2005))、聚乙二醇(PEG)及可減少蛋白質-蛋白質相互作用之其他聚合物, 諸如聚山梨醇酯或泊洛沙姆(poloxamer)(Frokjaer及Otzen, 見上; Lee, R.C.等人, Ann. Biomed. Eng. 34: 1190-1200 (2006); (Nema, S.等人, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 51: 166-171 (1997)))。

PVP為基本上由線性聚合之1-乙基-2-吡咯啉酮(乙基吡咯啉酮)組成之合成聚合物, 其聚合度產生不同分子量之聚合物。聚乙基吡咯啉酮之同義詞包括PVP、聚(1-乙基-2-吡咯啉酮)、聚維酮(povidone)及Kollidon。PVP具生物惰性且無毒, 可藉由口服及局部途徑投與。分子量低於25,000道爾頓之PVP藉由腎絲球過濾自全身循環中移除且因此預期不會在體內積聚。

PVP已作為錠劑包衣助劑廣泛用於製藥工業中且作為黏度增強劑用於眼科及局部製劑中。PVP最初作為血漿增容劑亦用於非經腸投與中且隨後用於可注射調配物(例如抗生素、激素、止痛劑)中以賦予黏性。此等調配物限於通常小於500道爾頓之小分子化合物或小蛋白質(諸如激素)。當前可獲得之含有PVP之藥品包括Bicillin C-RTM (Wyeth)、

WycillinTM (Wyeth)及PfizerpenTM (Pfizer)，其皆含有小分子青黴素G以及極低濃度($\leq 0.6\%$)之PVP。Depo-SubQ Provera 104TM (Pharmacia and Upjohn)含有5% PVP以及小分子乙酸甲羥孕酮(medroxyprogesterone acetate)。BexxarTM (Glaxo Smith Kline)含有放射性標記之抗CD20抗體以及4.4-6.6% PVP。在Bexxar之情況下，PVP尤其用作放射防護劑，以減少所連接之放射性同位素對放射性標記抗體所進行的自放射分解(美國專利第5,961,955號及美國專利第6,338,835號)。

生物化學藥劑師亦使用PVP及聚乙二醇來使溶解之蛋白質沈澱(美國專利第5,525,519號)。

CD20抗原(亦稱為人類B-淋巴細胞限制之分化抗原，Bp35)為位於前B及成熟B淋巴細胞上之約35 kD分子量之疏水性跨膜蛋白質(Valentine等人，*J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989)；及Einfeld等人，*EMBO J.* 7(3):711-717 (1988))。該抗原亦表現於大於90%之B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas)(NHL)上(Anderson等人，*Blood* 63(6):1424-1433 (1984))，但造血幹細胞、前B細胞、正常血漿細胞或其他正常組織上未發現(Tedder等人，*J. Immunol.* 135(2):973-979 (1985))。咸信CD20可調控細胞週期啟始及分化之活化過程中之早期步驟(Tedder等人，見上)且可能充當鈣離子通道(Tedder等人，*J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990))。

若CD20表現於B細胞淋巴瘤中，則此抗原為治療該等淋

巴瘤之適用治療靶。舉例而言，一種針對人類CD20抗原之遺傳工程化嵌合鼠類/人類單株抗體利妥昔單抗(rituximab)(RITUXAN®, MABTHERA®)抗體(可購自Genentech, Inc., South San Francisco, California, U.S.及F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland)係用於治療患有復發性或難治性低度惡性或濾泡性、CD20陽性、B細胞非霍奇金氏淋巴瘤的患者。利妥昔單抗抗體在1998年4月7日頒布之美國專利第5,736,137號(Anderson等人)中及美國專利第5,776,456號中稱為「C2B8」。指定用於治療NHL之其他抗CD20抗體包括與放射性同位素釷-90連接之鼠類抗體Zevalin™(IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA)，及與I-131結合之另一種完全鼠類抗體Bexxar™(Corixa, WA)。

CD20亦為適用於治療自體免疫疾病之靶抗原。亦已在B細胞及自體抗體似乎在疾病病理生理學中起作用之多種非惡性自體免疫病症中研究利妥昔單抗，包括Edwards等人，*Biochem Soc. Trans.* 30:824-828 (2002)。已報導利妥昔單抗可潛在地減輕以下疾病之徵兆及症狀，例如類風濕性關節炎(RA)(Leandro等人，*Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002)；Edwards等人，*Arthritis Rheum.*, 46(增刊9): S46 (2002)；Stahl等人，*Ann. Rheum. Dis.*, 62(增刊1): OP004 (2003)；Emery等人，*Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003))、狼瘡(Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5:157-159 (2003)；Leandro等人*Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002)；Gorman等人，*Lupus*, 13: 312-316 (2004))、免疫性血小板減少性紫

癥(D'Arena等人, *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi
 等人, *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh等人, *Semin. Oncol.*,
 27 (Supp 12):99-103 (2000); Zaia等人, *Haematologica*, 87:
 189-195 (2002); Ratanatharathorn等人, *Ann. Int. Med.*, 133:
 275-279 (2000))、單純紅血球形成不全(Auner等人, *Br. J.*
Haematol., 116: 725-728 (2002)); 自體免疫性貧血(Zaja等
 人, *Haematologica* 87:189-195 (2002) (*Haematologica*
 87:336 (2002)中出現勘誤表))、冷凝集素疾病(Layios等人,
Leukemia, 15: 187-8 (2001); Berentsen等人, *Blood*, 103:
 2925-2928 (2004); Berentsen等人, *Br. J. Haematol.*, 115:
 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090
 (2001); Damiani等人, *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234
 (2001))、重度抗胰島素症之B型症候群(Coll等人, *N. Engl.*
J. Med., 350: 310-311 (2004)、混合冷凝球蛋白血症(DeVita
 等人, *Arthritis Rheum.* 46增刊9:S206/S469 (2002))、重症肌
 無力(Zaja等人, *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam等
 人, *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003))、華格納氏肉芽腫病
 (Wegener's granulomatosis)(Specks等人, *Arthritis &*
Rheumatism 44: 2836-2840 (2001))、難治尋常天疱瘡(Dupuy
 等人, *Arch Dermatol.*, 140:91-96 (2004))、皮膚炎(Levine,
Arthritis Rheum., 46(增刊9):S1299 (2002))、休格連氏症候群
 (Sjogren's syndrome)(Somer等人, *Arthritis & Rheumatism*,
 49: 394-398 (2003))、活動性II型混合冷凝球蛋白血症(Zaja
 等人, *Blood*, 101: 3827-3834 (2003))、尋常天疱瘡(Dupay等

人，*Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004))、自體免疫性神經病變(Pestronk等人，*J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:485-489 (2003))、副腫瘤性眼陣攣-肌陣攣症候群(Pranzatelli等人 *Neurology* 60(增刊1) PO5.128:A395 (2003))及復發-緩解型多發性硬化(RRMS)(Cross等人，(摘要)「Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS」美國多發性硬化症研究及治療委員會第八次年會(Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis), 20-21 (2003))。

本發明提供防止諸如抗體之巨分子在生理條件下聚集之方法及調配物。本發明之方法在製備治療性蛋白質(諸如本說明書中描述之抗CD20抗體)之調配物方面具有優勢。此等優勢包括能夠製備可增加治療性抗體之生物可用性及減少注射部位處之發炎的皮下注射調配物，以及根據下文實施方式顯而易知之其他優勢。

【發明內容】

生物化學藥劑師已使用PVP及聚乙二醇來使溶解之蛋白質沈澱(美國專利第5,525,519號)。本發明意外地發現，2000至54,000道爾頓之分子量範圍中之PVP事實上抑制蛋白質之聚集及絮凝、從而改良其溶解性，且因此發現PVP之新穎用途。本發明亦已開發新穎的活體外篩檢方法，其包括使用具有確定截留分子量(MW)與定製釋放介質(均模擬注射部位處之生理條件)的透析管。

本發明提供一種藉由添加5%至20%的分子量範圍為2000

至54,000道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)來減少諸如蛋白質之巨分子在生理條件下聚集且抑制其絮凝的方法。在大鼠中，添加PVP而顯著減少之聚集及絮凝亦與皮下注射部位處之發炎顯著減少相關。本發明另外提供藉由向皮下調配物中添加5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)而在諸如蛋白質之較大巨分子之皮下投與期間將注射部位處之發炎減至最低程度的方法。在本發明之不同實施例中，巨分子為抗體。在本發明之其他實施例中，抗體為治療性抗體或診斷性抗體。

在本發明之不同實施例中，巨分子為抗CD20抗體。在本發明之某些實施例中，抗CD20抗體為人類化抗體。在本發明之某些實施例中，抗CD20抗體包含來自表1之變異體A、B、C、D、F、G、H或I之一。本發明另外提供抗CD20抗體包含選自由SEQ ID NO:1-15組成之群之胺基酸序列的方法及調配物。在本發明之其他實施例中，抗體包含輕鏈可變域SEQ ID NO:1及重鏈可變域SEQ ID NO:2，或輕鏈可變域SEQ ID NO:3及重鏈可變域SEQ ID NO:4，或輕鏈可變域SEQ ID NO:3及重鏈可變域SEQ ID NO:5。本發明另外提供抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:6及全長重鏈SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:15之方法及調配物。本發明另外提供抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14之方法及調配物。

在其他態樣中，本發明提供皮下投與諸如蛋白質之較大

巨分子之醫藥調配物，其包含5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)。在一些實施例中，本發明提供皮下投與抗體之醫藥調配物，其包含10 mg/ml至200 mg/ml之濃度範圍之抗體及5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)。在某些實施例中，抗體濃度範圍為30-150 mg/ml。在其他實施例中，抗體濃度範圍為100-150 mg/ml。在某些實施例中，PVP之濃度為10%。在某些實施例中，PVP之分子量範圍為7000-11,000道爾頓。在一特定實施例中，本發明提供皮下投與抗體之醫藥組合物，其包含100 mg/ml之人類化2H7抗體及10%的分子量範圍為7000-11,000道爾頓之PVP。在其他實施例中，醫藥組合物另外包含30 mM乙酸鈉；5%海藻糖二水合物；及0.03%聚山梨醇酯20(pH 5.3)。

本發明另外提供任何上述調配物，其包含由表1中所列之任何抗體組成之人類化抗CD20抗體。本發明另外提供抗CD20抗體包含選自由SEQ ID NO:1-15組成之群之胺基酸序列的調配物。在本發明之其他實施例中，抗體包含輕鏈可變域SEQ ID NO:1及重鏈可變域SEQ ID NO:2，或輕鏈可變域SEQ ID NO:3及重鏈可變域SEQ ID NO:4。本發明另外提供抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:6及全長重鏈SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:15之方法及調配物。本發明另外提供抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID

NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14之方法及調配物。

本發明另外提供治療表現CD20之B細胞癌症的方法，其包含以包含5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙烯吡咯啉酮(PVP)之醫藥調配物來投與表1之人類化抗CD20抗體中之任一者。CD20陽性B細胞癌症較佳為B細胞淋巴瘤或白血病。在特定實施例中，包含結合人類CD20(hCD20)之人類化2H7抗體及其功能片段之調配物用於治療非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、惰性NHL(包括復發惰性NHL及利妥昔單抗難治性惰性NHL)、淋巴細胞為主型霍奇金氏疾病(LPHD)、小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)。在特定實施例中，包含人類化CD20結合抗體，尤其來自表1之變異體A、B、C、D或H或其功能片段之調配物用於治療上列CD20陽性B細胞癌症。

本發明亦提供治療自體免疫疾病之方法，其包含以包含5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙烯吡咯啉酮(PVP)之醫藥調配物向罹患自體免疫疾病之患者投與治療有效量之表1之人類化2H7抗體。在特定實施例中，自體免疫疾病係選自由類風濕性關節炎(RA)及幼年型類風濕性關節炎組成之群，且RA患者為甲胺喋呤(Mtx)反應不足者及TNF α -拮抗劑反應不足者、利妥昔單抗難治性或復發患者。在一實施例中，RA患者係另一種抗CD20治療性抗體難治或復發者。在其他實施例中，自體免疫疾病係選自由以下組成之群：全身性紅斑性狼瘡(SLE)(包括狼瘡腎炎)、多發性硬化(MS)(包括復發緩解型多發性硬化

(RRMS))、華格納氏疾病、發炎性腸道疾病、潰瘍性結腸炎、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、自體免疫性血小板減少症、多發性硬化、牛皮癬、IgA腎病、IgM多發性神經病變、重症肌無力、ANCA相關之血管炎、糖尿病、雷諾氏症候群(Reynaud's syndrome)、休格連氏症候群、視神經脊髓炎(NMO)及絲球體腎炎。在特定實施例中，包含人類化CD20結合抗體，尤其來自表1之變異體A、B、C、D或H或其功能片段之調配物用於治療上列自體免疫疾病。

在治療上述疾病之方法之某些實施例中，罹患疾病之個體或患者為靈長類，較佳人類。

本發明另外提供注射於患者注射部位後改良或維持抗體在水性皮下調配物中之溶解或使抗體在水性皮下調配物中之沈澱減至最低程度的方法，其包含向水性皮下調配物中添加5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)。

本發明另外提供增加待皮下投與之抗體之生物可用性的方法，其包含向包含抗體之水性皮下調配物中添加5%至20%的分子量範圍為2000至54,000道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)。

本發明另外提供評估賦形劑減少抗體或其他巨分子在生理條件下之聚集之能力的方法，其包含：在測試賦形劑存在及不存在的情況下，在恆定攪動下，相對於測試介質透析巨分子調配物以模擬37°C下之生理條件；抽取經修飾

之之介質溶液樣品；及測量外觀，諸如樣品混濁度，且藉由諸如UV光度掃描之方法測量釋放介質中之蛋白質含量，其中與不具有賦形劑之對照相比，含有測試賦形劑之檢定中之蛋白質濃度升高及釋放介質混濁度降低，表明測試賦形劑能夠減少巨分子聚集。在特定實施例中，介質與經修飾之PBS溶液有關，諸如含有167 mM鈉、140 mM氯化物、17 mM磷酸鹽、4 mM鉀。在該方法之特定實施例中，透析管具有1百萬道爾頓截留分子量。在該方法之其他特定實施例中，使用UV光譜測定法測量試樣中之蛋白質濃度及混濁度。在該方法之其他實施例中，該方法包括目檢經修飾之之釋放介質及透析管內之溶液之沈澱，其中與不具有賦形劑之對照相比，含有測試賦形劑之透析管中之沈澱減少，表明測試賦形劑能夠減少巨分子聚集。

【實施方式】

不同形式之動詞「聚集」係指個別蛋白質分子或錯合物藉以結合而形成聚集物的過程。「聚集物」為包含蛋白質分子或複合物之聚合物組裝體。聚集可進行至形成可見沈澱物之程度。該可見沈澱物之形成在本文中亦稱為「絮凝」。

巨分子之沈澱之相對量可測定，例如藉由與目視對照比較來測定。檢定沈澱之其他方法在此項技術中已知且描述於下文中，例如實例2中詳述之活體外透析方法，或實例3中描述之活體內模型。

術語「生物可用性」係指藥物或其他物質在投與之後於

生理活性部位處被吸收或變得可利用的程度或速率。巨分子之生物可用性可藉由此項技術中已知之活體內藥物動力學方法檢定。

術語「巨分子」係指分子量為至少10,000道爾頓之分子，且可包括蛋白質，諸如抗體。

術語「賦形劑」或「醫藥賦形劑」係指可減少巨分子聚集之化合物。賦形劑可包括糖、鹽、游離胺基酸(諸如L-精胺酸及L-麩胺醯胺)、多元醇、聚乙二醇(PEG)及其他聚合物，諸如聚山梨醇酯、泊洛沙姆或PVP。

術語「PVP」係指基本上由線性聚合之1-乙烯基-2-吡咯啉酮(乙烯吡咯啉酮)組成之聚合物，其聚合度產生不同分子量之聚合物。聚乙烯吡咯啉酮之同義語包括PVP、聚(1-乙烯基-2-吡咯啉酮)、聚維酮及Kollidon。

術語「治療性抗體」係指用於治療疾病之抗體。治療性抗體可具有不同作用機制。治療性抗體可結合標靶且中和其正常功能。舉例而言，阻斷為癌細胞存活所需要之蛋白質之活性的單株抗體可促使細胞死亡。另一種治療性單株抗體可結合標靶且活化其正常功能。舉例而言，單株抗體可與細胞上之蛋白質結合且引發細胞凋亡信號。最後，若單株抗體與僅表現於病變組織上之標靶結合，則諸如化療或放射性藥劑之毒性有效負載(有效藥劑)與單株抗體之結合可形成將毒性有效負載特定傳遞至病變組織的藥劑，從而減少對健康組織之傷害。

術語「診斷性抗體」係指用作疾病之診斷試劑的抗體。

診斷性抗體可結合至尤其與特定疾病相關或在特定疾病中顯示增加之表現的標靶。診斷性抗體可用於例如偵測患者之生物樣本中之標靶，或用於患者之疾病部位(諸如腫瘤)之診斷成像。

「CD20」抗原為具有約35 kD分子量之非糖基化、跨膜磷蛋白，其存在於末梢血液或淋巴器官之90%以上B細胞之表面上。CD20在早期前B細胞發育期間受到表現且保持直至漿細胞分化為止；其不存在於人類幹細胞、淋巴祖細胞或正常漿細胞中。CD20存在於正常B細胞以及惡性B細胞上。文獻中之CD20之其他名稱包括「B-淋巴細胞限制之分化抗原」及「Bp35」。CD20抗原描述於例如Clark及Ledbetter, *Adv. Can. Res.* 52:81-149 (1989)及Valentine等人, *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989)中。

術語「抗體」以最廣泛含義使用且尤其涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需生物活性或功能即可。

本發明之人類化CD20結合抗體之生物活性至少包括抗體結合至人類CD20，更佳結合至人類及其他靈長類CD20(包括獼猴、恆河猴、黑猩猩)。抗體以不高於 1×10^{-8} 之 K_d 值，較佳不高於約 1×10^{-9} 之 K_d 值結合CD20，且能夠在活體內殺死或消耗B細胞，與未經該抗體治療之適當陰性對照相比，較佳在活體內殺死或消耗B細胞至少20%。B細胞消耗可為ADCC、CDC、細胞凋亡或其他機制中之一或多者之結果。在本文中之疾病治療之一些實施例中，相對

於其他效應功能或機制而言，可能需要特定效應功能或機制，且較佳選擇人類化2H7之某些變異體以達成彼等生物功能，諸如ADCC。

「抗體片段」包含全長抗體之一部分，通常為其抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體。

「Fv」為含有完整抗原識別位點及抗原結合位點之最小抗體片段。此片段由一個重鏈可變區結構域與一個輕鏈可變區結構域緊密非共價結合之二聚物組成。此等兩個結構域之摺疊形成六個高變環(H鏈及L鏈各3個環)，提供用於抗原結合之胺基酸殘基且將抗原結合特異性賦予抗體。然而，即使單一可變域(或僅包含三個對於抗原具有特異性之CDR的Fv之一半)亦能夠識別且結合抗原，惟親和力低於整個結合位點。

如本文中所用之術語「單株抗體」係指來自實質上均質抗體之群體之抗體，亦即除可能在單株抗體產生期間出現之可能變異體(該等變異體通常少量存在)以外，構成群體之個別抗體相同且/或結合相同抗原決定基。該單株抗體通常包括包含結合標靶之多肽序列之抗體，其中藉由包括自複數個多肽序列選擇結合單一標靶之多肽序列的方法來獲得結合標靶之多肽序列。舉例而言，選擇方法可為自複數個純系(諸如融合瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系之庫)選擇唯一純系。應瞭解可進一步改變所選結合標靶

之序列以例如改良對標靶之親和力、將結合標靶之序列人類化、改良其在細胞培養中之產量、降低其在活體內之免疫原性、形成多特異性抗體等，且包含經改變之結合標靶之序列之抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相反，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。除其特異性之外，單株抗體製劑之有利之處在於其通常不被其他免疫球蛋白污染。修飾語「單株」表示如自實質上均質抗體群所獲得之抗體之性質，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，可根據本發明使用之單株抗體可由各種技術製造，包括例如融合瘤方法(例如 Kohler 等人，*Nature*, 256:495 (1975)；Harlow 等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第 2 版 1988)；Hammerling 等人，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、重組 DNA 方法(參見例如美國專利第 4,816,567 號)、噬菌體呈現技術(參見例如 Clackson 等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)；Sidhu 等人，*J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004)；Lee 等人，*J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004)；及 Lee 等人，*J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004))，及在具有編碼人類免疫球蛋白序列之部分或全部人類免疫球蛋白基因座或基因

之動物中產生人類或擬似人類抗體的技術(參見例如 WO 1998/24893 ; WO 1996/34096 ; WO 1996/33735 ; WO 1991/10741 ; Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993) ; Jakobovits等人, *Nature*, 362:255-258 (1993) ; Bruggemann等人, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993) ; 美國專利第 5,545,806 號 ; 第 5,569,825 號 ; 第 5,591,669 號 (皆屬於 GenPharm) ; 第 5,545,807 號 ; WO 1997/17852 ; 美國專利第 5,545,807 號 ; 第 5,545,806 號 ; 第 5,569,825 號 ; 第 5,625,126 號 ; 第 5,633,425 號 ; 及第 5,661,016 號 ; Marks 等人, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992) ; Lonberg 等人, *Nature*, 368: 856-859 (1994) ; Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994) ; Fishwild 等人, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996) ; 及 Lonberg 及 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)。

本發明之 CD20 結合抗體之「功能片段」為保持結合至 CD20 的彼等片段, 該等片段結合 CD20 的親和力與其所來源之完整全長分子實質上相同且顯示生物活性, 包括消耗 B 細胞, 如藉由活體外或活體內檢定(諸如本文中描述之彼等檢定)所測量。

術語「可變」係指可變域之某些區段之序列在抗體之間廣泛地不同。V 域介導抗原結合且限定特定抗體對其特定抗原之特異性。然而, 可變性並非均勻分布於可變域之 110 個胺基酸跨距中。實際上, V 區域係由 15-30 個胺基酸

之相對恆定區段(稱為構架區(FR))組成，該等區段藉由各9-12個胺基酸長之較短最大可變區(稱為「高變區」)分隔。原生重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個主要採用 β -摺疊構型的FR，其藉由三個高變區連接，從而形成連接 β -摺疊結構的環且所形成的環在一些情況下形成 β -摺疊結構之一部分。各鏈中之高變區由FR緊密結合在一起且與另一鏈之高變區一起促進抗體之抗原結合位點之形成(參見Kabat等人，**Sequences of Proteins of Immunological Interest**，第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定域不直接涉及抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)。

術語「高變區」在本文中使用时係指抗體中之負責結合抗原之胺基酸殘基。高變區通常包含「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基(例如 V_L 中之約殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)及 V_H 中之約31-35B(H1)、50-65(H2)及95-102(H3))(Kabat等人，**Sequences of Proteins of Immunological Interest**，第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))及/或「高變環」之彼等殘基(例如 V_L 中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)及 V_H 中之26-32(H1)、52A-55(H2)及96-101(H3))(Chothia及Lesk **J. Mol. Biol.** 196:901-917 (1987))。

如本文中所提及，「共同序列」或共同V域序列為比較已知人類免疫球蛋白可變區序列之胺基酸序列所獲得之人工

序列。根據此等比較，製備編碼V域胺基酸之重組核酸序列，該等V域胺基酸為來源於人類 κ 及人類H鏈亞群III V域之共同序列。共同V序列不具有任何已知之抗體結合特異性或親和力。

「嵌合」抗體(免疫球蛋白)之重鏈及/或輕鏈之一部分與來源於特定種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中之相應序列相同或同源，而該(等)鏈之其餘部分與來源於另一種或屬於另一抗體種類或子類之抗體及該等抗體片段中之相應序列相同或同源，只要其展現所需生物活性。(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。本文中所用之人類化抗體為嵌合抗體之亞群。

非人類(例如鼠類)抗體之「人類化」形式為含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。人類化抗體大部分為人類免疫球蛋白(接受者或受者抗體)，其中接受者之高變區殘基經具有所需特異性、親和力及/或能力之非人種(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類)(供者抗體)之高變區殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含不存在於接受者抗體或供者抗體中之殘基。此等修飾可進一步改進抗體效能，諸如結合親和力。通常，人類化抗體包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白者，且全部或實質上全部FR區為人類免疫球蛋白序列者，惟

FR區可包括一或多個改良結合親和力之胺基酸取代。FR中之此等胺基酸取代之數目通常在H鏈中不超過6個，且在L鏈中不超過3個。人類化抗體視情況亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。詳情參見Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Reichmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下溶解標靶細胞。典型補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組份(C1q)與結合至其同源抗原之抗體(適當子類)結合開始。為了評估補體活化，可執行CDC檢定，例如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述。

在整篇本說明書及申請專利範圍中，除非另外說明，否則免疫球蛋白重鏈之恆定域中之殘基編號為EU索引之編號，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中之EU索引，該文獻以引用的方式明確併入本文中。「如Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。除非特定說明序列或其他編號系統，否則根據Kabat編號來對V區中之殘基編號。

CD20抗體包括：「C2B8」，現稱為「利妥昔單抗」(「RITUXAN®」)(美國專利第5,736,137號)；可購自IDEC Pharmaceuticals, Inc.之標記鈺-[90]之2B8鼠類抗體(稱為

「Y2B8」)或「替坦異貝莫單抗(Ibritumomab Tiuxetan)」(ZEVALIN®)(美國專利第5,736,137號；2B8於1993年6月22日以寄存編號HB11388寄存於ATCC)；鼠類IgG2a「B1」，亦稱為「托西莫單抗(Tositumomab)」，其視情況標記¹³¹I以產生「131I-B1」或「碘131托西莫單抗」抗體(BEXXAR™, GlaxoSmithKline，亦參見美國專利第5,595,721號)；鼠類單株抗體「1F5」(Press等人*Blood* 69(2):584-591 (1987)及其變異體，包括「補綴之構架」或人類化1F5(WO 2003/002607, Leung, S.；ATCC寄存HB-96450)；鼠類2H7及嵌合2H7抗體(美國專利第5,677,180號)；人類化2H7(WO 2004/056312(Lowman等人)且如以下闡述)；HuMAX-CD20™，一種完全人類抗體(Genmab, Denmark；參見例如Glennie及van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003)及Cragg等人, *Blood* 101: 1045-1052 (2003))；WO 2004/035607 (Teeling等人)中闡述之人類單株抗體；US 2004/0093621 (Shitara等人)中描述之其中複雜N-糖苷連接之糖鏈與Fc區結合的抗體；CD20結合分子，諸如AME系列之抗體，例如AME-133™抗體，如WO 2004/103404 (Watkins等人, Applied Molecular Evolution)中闡述；A20抗體或其變異體，諸如嵌合或人類化A20抗體(分別為cA20、IMMU-106 a.k.a. hA20)(US 2003/0219433, US 2005/0025764; Immunomedics)；及單株抗體L27、G28-2、93-1B3、B-C1或NU-B2，可購自International Leukocyte Typing Workshop (Valentine等人，

Leukocyte Typing III (McMichael 編，第 440 頁，Oxford University Press (1987))。本文中之較佳 CD20 抗體為人類化、嵌合或人類 CD20 抗體，更佳為人類化 2H7 抗體、利妥昔單抗、嵌合或人類化 A20 抗體 (Immunomedics) 及 HuMAX-CD20TM 人類 CD20 抗體 (Genmab)。

「經分離之」抗體為已鑑別且自其天然環境之組份中分離且/或回收之抗體。其天然環境之污染組份為干擾抗體之診斷或治療使用的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中，抗體純化至(1)大於 95 重量%之抗體，且最佳 99 重量%以上，如由洛瑞 (Lowry) 方法所測定；(2)足以獲得 N-末端或內部胺基酸序列之至少 15 個殘基的程度，藉由使用旋杯式序列分析儀測定，或(3)均質，如在還原或非還原性條件下、使用庫馬斯藍 (Coomassie blue) 或較佳銀染色法、藉由 SDS-PAGE 所測定。經分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體，此歸因於抗體天然環境之至少一種組份將不存在。然而，經分離之抗體通常由至少一個純化步驟製備。

本發明之組合物及方法

本發明提供皮下投與諸如蛋白質之巨分子之醫藥組合物，其包含 5% 至 20% 的分子量範圍為 2000 至 54,000 道爾頓的聚乙炔吡咯啉酮 (PVP)。在一些實施例中，本發明提供皮下投與抗體之醫藥調配物，其包含 30 mg/ml 至 200 mg/ml 濃度範圍之抗體及 5% 至 20% 的分子量範圍為 2000 至 54,000 道爾頓之聚乙炔吡咯啉酮 (PVP)。在某些實施例

中，抗體濃度範圍為10-150 mg/ml。在其他實施例中，抗體濃度範圍為100-150 mg/ml。在某些實施例中，PVP之濃度為10%。在某些實施例中，PVP之分子量範圍為7000-11,000道爾頓。在一特定實施例中，本發明提供皮下投與抗體之醫藥組合物，其包含100 mg/ml之人類化2H7抗體及10%的分子量範圍為7000-11,000道爾頓之PVP。在其他實施例中，醫藥組合物另外包含30 mM乙酸鈉；5%海藻糖二水合物；及0.03%聚山梨醇酯20 (pH 5.3)。

在不同實施例中，本發明提供包含人類化2H7抗體(在本文中亦稱為hu2H7)之醫藥組合物。在特定實施例中，人類化2H7抗體為表1中所列之抗體。

表1- 人類化抗CD20抗體及其變異體

2H7變異體	V _L SEQ ID NO.	V _H SEQ ID NO.	全長L鏈 SEQ ID NO.	全長H鏈 SEQ ID NO.
A	1	2	6	7
B	1	2	6	8
C	3	4	9	10
D	3	4	9	11
F	3	4	9	12
G	3	4	9	13
H	3	5	9	14
I	1	2	6	15

表1之抗體變異體A、B及I各自包含輕鏈可變域序列(V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIY
APSNLASGVPSR

FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGKVEIKR
(SEQ ID NO:1); 及

重鏈可變域序列(V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGDTSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVWG
QGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 2)。

表1之抗體變異體C、D、F及G各自包含輕鏈可變域序列
(V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIY
APSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO:3)，及

重鏈可變域序列(V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGATSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASYSYWYFDVWG
QGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 4)。

表1之抗體變異體H包含輕鏈可變域序列(V_L)SEQ ID
NO:3(上文)及重鏈可變域序列(V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGATSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWG
QGTLVTV
SS (SEQ ID NO. 5)。

表1之抗體變異體A、B及I各自包含全長輕鏈序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG
VPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLT
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)。

表 1 之變異體 A 包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGDTSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 7) °

表 1 之變異體 B 包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGDTSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8) °

表 1 之變異體 I 包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGDTSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ

YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)。

表1之抗體變異體C、D、F、G及H各自包含全長輕鏈序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG
 VPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
 SSTLT
 SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9)。

表1之變異體C包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10)。

表1之變異體D包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:11)。

表 1 之變異體 F 包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:12)。

表 1 之變異體 G 包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHWHTYQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)。

表 1 之變異體 H 包含全長重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
 GNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWG
 QGTLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
 TLPPSR

EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKL
TVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO 14)。

在某些實施例中，本發明之人類化2H7抗體另外在IgG Fc中包含胺基酸變異且與具有野生型IgG Fc之抗體相比，針對人類FcRn展現的結合親和力增加至少60倍、至少70倍、至少80倍、更佳至少100倍、較佳至少125倍、甚至更佳至少150倍至約170倍。

IgG中之N-糖基化位點為CH2域中之Asn297。本發明之人類化2H7抗體組合物包括具有Fc區之任何前述人類化2H7抗體之組合物，其中組合物中之約80-100%(且較佳約90-99%)抗體包含與醣蛋白之Fc區連接的不具有海藻糖之成熟核心碳水化合物結構。本文中證明該等組合物在與FcγRIIIA (F158)結合方面展現驚人改良，該FcγRIIIA (F158)在與人類IgG相互作用方面不如FcγRIIIA (V158)有效。在正常、健康非洲裔美國人及白種人中，FcγRIIIA (F158)比FcγRIIIA (V158)更常見。參見Lehrnbecher等人，*Blood* 94:4220 (1999)。歷史上，中國倉鼠卵巢細胞(CHO)(一種最常用之工業宿主)中產生之抗體在群體中含有約2%至6%之未海藻糖基化者。然而，YB2/0及Lec13可產生具有78%至98%未海藻糖基化物質之抗體。Shinkawa等人，*J Bio. Chem.* 278 (5), 3466-347 (2003)報導，具有較少FUT8活性之YB2/0及Lec13細胞中所產生之抗體在活體外顯示顯著增加之ADCC活性。產生具有低海藻糖含量的抗體亦描述於例如2006年1月22日Nature Biology線上出版

物中之Li等人，(GlycoFi)「Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*」；Niwa R.等人，*Cancer Res.* 64(6):2127-2133 (2004)；US 2003/0157108 (Presta)；US 6,602,684 及 US 2003/0175884 (Glycart Biotechnology)；US 2004/0093621、US 2004/0110704、US 2004/0132140(皆屬於Kyowa Hakko Kogyo)中。

本文中之調配物亦可含有為治療特定適應症所需要之一種以上活性化合物，較佳具有對彼此間無不利影響之互補活性的彼等物。舉例而言，可能需要另外提供細胞毒性劑、化學治療劑、細胞激素或免疫抑制劑(例如作用於T細胞之藥劑，諸如環孢素，或結合T細胞之抗體，例如結合LFA-1之抗體)。該等其他藥劑之有效量視調配物中之抗體含量、疾病或病症或治療類型及上述其他因素而定。此等藥劑通常以與本文中描述相同之劑量及投藥途徑或以約1至99%之慣用劑量來使用。

用於活體內投與之調配物必須為無菌的。此容易經由無菌過濾器過濾實現。

抗體產生

單株抗體

可使用最先由Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)描述之融合瘤方法製造單株抗體或可藉由重組DNA方法(美國專利第4,816,567號)製造單株抗體。

在融合瘤方法中，如上所述使小鼠或其他適當宿主動物(諸如倉鼠)免疫以誘導淋巴細胞產生或能夠產生特異性結

合至用於免疫之蛋白質的抗體。或者，可在活體外使淋巴細胞免疫。免疫之後，分離淋巴細胞且隨後使用合適融合劑(諸如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞株融合以形成融合瘤細胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。

將由此所製備之融合瘤細胞接種且生長於合適培養基中，該培養基較佳含有一或多種抑制未融合之親本骨髓瘤細胞(亦稱為融合搭配物)之生長或存活之物質。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞不具有酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤之選擇性培養基通常包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質防止缺乏HGPRT之細胞之生長。

較佳融合搭配物骨髓瘤細胞為有效地融合、有助於所選產生抗體之細胞穩定高量產生抗體且對選擇性抑制未融合親本細胞之選擇性培養基敏感的骨髓瘤細胞。較佳骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤細胞株，諸如來源於可自沙克生物研究所細胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center)(San Diego, California USA)獲得之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤之彼等細胞株及可自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(Rockville, Maryland USA)獲得之SP-2及衍生物，例如X63-Ag8-653細胞。亦已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類異骨髓瘤細胞株(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)；及Brodeur等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and*

Applications，第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

對融合瘤細胞生長於其中之培養基檢定針對該抗原之單株抗體之產生。較佳藉由免疫沈澱法或藉由活體外結合檢定(諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯免疫吸附檢定(ELISA))測定融合瘤細胞所產生之單株抗體之結合特異性。

可例如藉由 Munson 等人，*Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) 中描述之史卡查(Scatchard)分析來測定單株抗體之結合親和力。

產生具有所需特異性、親和力及/或活性之抗體的融合瘤細胞一經鑑別，即可藉由限制稀釋程序次選殖純系且藉由標準方法使該等純系生長(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*，第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))。適於此目的之培養基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培養基。另外，融合瘤細胞可以動物中之腹水腫瘤形式活體內生長，例如藉由將細胞腹膜內注射至小鼠中。

次純系所分泌之單株抗體可適當地藉由習知抗體純化程序自培養基、腹水液或血清分離，該等程序諸如親和性層析(例如使用蛋白質 A 或蛋白質 G-瓊脂糖)或離子交換層析、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析等。

編碼單株抗體之 DNA 可使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合至編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)輕易地分離及測序。融合瘤細胞充當該 DNA 之較佳來源。DNA 一經分離便可安置於表現載體中，隨後轉

染於宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中(否則宿主細胞不產生抗體蛋白質)，以獲得單株抗體在重組宿主細胞中之合成。關於編碼抗體之DNA在細菌中之重組表現之評述文章包括Skerra等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)及Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)。

在另一實施例中，可自抗體噬菌體庫中分離單株抗體或抗體片段，抗體噬菌體庫係使用McCafferty等人，*Nature*, 348:552-554 (1990)中描述之技術產生。Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)及Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)描述使用噬菌體庫分別分離鼠類及人類抗體。後續出版物描述藉由鏈改組(Marks等人，*Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))以及組合感染及活體內重組作為構築極大噬菌體庫之策略(Waterhouse等人，*Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))來產生高親和力(nM範圍)人類抗體。因此，此等技術為用於分離單株抗體之傳統單株抗體融合瘤技術之可行替代方案。

可修飾編碼抗體之DNA以產生嵌合或融合抗體多肽，例如用人類重鏈及輕鏈恆定域(C_H 及 C_L)序列取代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984))，或使免疫球蛋白編碼序列與非免疫球蛋白多肽(異源多肽)之全部或部分編碼序列融合。非免疫球蛋白多肽序列可取代抗體之恆定域，或其取代抗體之一抗原結合位點之可變域以形成嵌合二價抗

體，該抗體包含一個對於抗原具有特異性之抗原結合位點及另一個對於不同抗原具有特異性之抗原結合位點。

人類化抗體

非人類抗體人類化之方法已描述於此項技術中。人類化抗體中較佳引入一或多個非人類來源之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基通常稱為「輸入」殘基，其通常獲自「輸入」可變域。人類化可基本上依循 Winter 及同事之方法 (Jones 等人，*Nature*, 321:522-525 (1986)；Reichmann 等人，*Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen 等人，*Science*, 239:1534-1536 (1988))，藉由用高變區序列取代人類抗體之相應序列來執行。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)，其中實質上少於完整人類可變域已經來自非人類物種之相應序列取代。在實務上，人類化抗體通常為一些高變區殘基及可能一些FR殘基經齧齒動物抗體中之類似位點之殘基取代的人類抗體。

當抗體欲用於人類治療用途時，選擇用於製造人類化抗體之人類可變域(輕鏈可變域與重鏈可變域)對於減少抗原性及HAMA反應(人類抗小鼠抗體)極其重要。根據所謂「最佳擬合」方法，相對於已知人類可變域序列之完整庫，篩檢齧齒動物抗體之可變域之序列。鑑別與齧齒動物之V域序列最接近之人類V域序列且採納其中之人類構架區(FR)用於人類化抗體(Sims等人，*J. Immunol.*, 151:2296 (1993)；Chothia等人，*J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一方法係使用來源於特定輕鏈或重鏈亞群之所有人類抗體

之共同序列的特定構架區。多種不同人類化抗體可使用相同構架。(Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta等人, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

另外重要的是抗體在保留對抗原之高結合親和力及其他有利生物學性質的情況下人類化。為達成此目標，根據一較佳方法，使用親本及人類化序列之三維模型、藉由分析親本序列及各種概念人類化產物的方法製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可獲得且為熟習此項技術者所熟知。可獲得說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。檢查此等顯示可分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中的可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自受體及輸入序列選擇且合併FR殘基以便達成所需抗體特徵，諸如對標靶抗原之高親和力。一般而言，高變區殘基直接且最實質性地與影響抗原結合有關。

人類化抗體可為抗體片段，諸如Fab，其視情況與一種或多種細胞毒性劑結合以便產生免疫結合物。或者，人類化抗體可為全長抗體，諸如全長IgG1抗體。

人類抗體及噬菌體呈現方法

作為人類化之替代方案，可產生人類抗體。舉例而言，現可產生轉殖基因動物(例如小鼠)，其能夠在免疫後、在不產生內源性免疫球蛋白的情況下產生人類抗體之完整譜系。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變小鼠中抗體重鏈接合區(J_H)基因之同型合子缺失導致內源性抗體產生被完

全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變小鼠中可在抗原攻毒後產生人類抗體。參見例如 Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature*, 362:255-258 (1993)；Bruggemann 等人，*Year in Immuno.*, 7:33 (1993)；美國專利第 5,545,806 號、第 5,569,825 號、第 5,591,669 號(皆屬於 GenPharm)；第 5,545,807 號；及 WO 97/17852。

或者，可使用噬菌體呈現技術(McCafferty 等人，*Nature* 348:552-553 [1990])在活體外自來源於未免疫供體之免疫球蛋白可變(V)域基因譜系產生人類抗體及抗體片段。根據此技術，將抗體 V 域基因同框選殖於絲狀噬菌體(諸如 M13 或 fd)之主要或次要鞘蛋白基因中且以功能性抗體片段形式呈現於噬菌體顆粒之表面上。因為絲狀顆粒含有噬菌體基因體之單股 DNA 複本，所以基於抗體之功能性質進行選擇亦導致選擇編碼展現彼等性質之抗體之基因。因此，噬菌體模擬 B 細胞之一些性質。噬菌體呈現可以多種形式執行(回顧於例如 Johnson, Kevin S. 及 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993) 中)。多種來源之 V-基因區段可用於噬菌體呈現。Clackson 等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)自來源於經免疫小鼠之脾臟的 V 基因之小型隨機組合庫分離大批不同抗噁唑酮抗體。可構築來源於未免疫人類供體之 V 基因譜系且可基本上依循 Marks 等人，*J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)或 Griffith 等人，*EMBO J.* 12:725-734 (1993)描述之技術分離

針對大批不同抗原(包括自體抗原)之抗體。參見例如美國專利第5,565,332號及第5,573,905號。

如以上所討論，人類抗體亦可由活體外活化之B細胞產生(參見美國專利5,567,610及5,229,275)。

抗體片段

在某些情況中，使用抗體片段優於使用完整抗體。較小尺寸之片段容許快速清除，且可使近接實體腫瘤得到改良。

已開發用於產生抗體片段之各種技術。此等片段傳統上經由完整抗體之蛋白分解消化來獲得(參見例如 Morimoto 等人，*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)；及 Brennan 等人，*Science*, 229:81 (1985))。然而，此等片段現可藉由重組宿主細胞直接產生。Fab、Fv及ScFv抗體片段皆可表現於大腸桿菌中且自大腸桿菌中分泌，由此容許便利地產生大量的此等片段。抗體片段可自上述抗體噬菌體庫中分離。或者，Fab'-SH 片段可直接自大腸桿菌中回收且以化學方式偶合以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物分離 F(ab')₂ 片段。包含補救受體結合抗原決定基殘基、活體內半衰期延長的 Fab 及 F(ab')₂ 片段描述於美國專利第 5,869,046 號中。熟習此項技術者顯而易知產生抗體片段之其他技術。在其他實施例中，所選抗體為單鏈 Fv 片段 (scFv)。參見 WO 93/16185；美國專利第 5,571,894 號；及

美國專利第5,587,458號。Fv及sFv為具有不含恆定區之完整結合位點的唯一物質；因此，其適於在活體內使用期間減少非特異性結合。可構築sFv融合蛋白以使效應蛋白在sFv之胺基或羧基末端融合。參見Antibody Engineering, Borrebaeck編，見上。抗體片段亦可為「線性抗體」，例如美國專利5,641,870中所述。該等線性抗體片段可為單特異性或雙特異性。

其他胺基酸序列修飾

涵蓋本文中描述之CD20結合抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物學性質。藉由將適當核苷酸變異引入抗CD20抗體核酸中，或藉由肽合成來製備抗CD20抗體之胺基酸序列變異體。該等修飾包括例如抗CD20抗體之胺基酸序列內之殘基缺失及/或插入及/或取代。可將缺失、插入及取代任意組合以獲得最終構築體，限制條件為最終構築體具有所需特徵。胺基酸變異亦可改變抗CD20抗體之轉譯後過程，諸如改變糖基化位點之數目或位置。

一種適用於鑑別抗CD20抗體中位於突變誘發較佳位置之某些殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells在*Science*, 244:1081-1085 (1989)中所描述。其中，鑑別一個殘基或一組靶殘基(例如帶電荷之殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且置換為中性或帶負電荷之胺基酸(最佳丙胺酸或聚丙胺酸)以影響胺基酸與CD20抗原之相互作用。隨後藉由在取代位點或針對取代

位點引入另外或其他變異體來改進對於取代作用顯示功能敏感性的彼等胺基酸位置。因此，雖然引入胺基酸序列變異之位點係經預定，但是突變本身之性質無需預定。舉例而言，為了分析指定位點之突變之效能，在靶密碼子或區域進行ala掃描或隨機突變誘發且針對所需活性篩檢所表現之抗CD20抗體變異體。

胺基酸序列插入包括長度範圍為一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽的胺基末端及/或羧基末端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫胺醯基殘基之抗CD20抗體或與細胞毒性多肽融合之抗體。抗CD20抗體分子之其他插入變異體包括抗CD20抗體之N-末端或C-末端與增加抗體血清半衰期之酶(例如針對ADEPT)或多肽之融合。

另一類型之變異體為胺基酸取代變異體。此等變異體為抗CD20抗體分子中之至少一個胺基酸殘基已經不同殘基置換。最受關注之取代性突變誘發之位點包括高變區，但亦涵蓋FR變異。保守性取代顯示於下表中之標題「較佳取代」下。若該等取代導致生物活性變化，則可引入更多實質性變異(在該表中名為「例示性取代」或如下文參考胺基酸類別進一步所述)且篩檢產物。

表 2-胺基酸取代

初始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala (A)	val ; leu ; ile	Val
Arg (R)	lys ; gln ; asn	Lys
Asn (N)	gln ; his ; asp, lys ; arg	Gln
Asp (D)	glu ; asn	Glu
Cys (C)	ser ; ala	Ser
Gln (Q)	asn ; glu	Asn
Glu (E)	asp ; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn ; gln ; lys ; arg	Arg
Ile (I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; ile ; val ; met ; ala ; phe	Ile
Lys (K)	arg ; gln ; asn	Arg
Met (M)	leu ; phe ; ile	Leu
Phe (F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr ; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp ; phe ; thr ; ser	Phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; 正白胺酸	Leu

可藉由選擇對於維持以下方面具有顯著不同之影響的取代來實現抗體之生物學性質之實質性改變：(a)取代區域中之多肽骨架之結構，例如呈摺疊或螺旋構形，(b)靶點處之分子電荷或疏水性，或(c)側鏈之松密度。天然產生之殘基可基於共同側鏈性質分類：

- (1) 疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 鹼性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：gly、pro；及
- (6) 芳族：trp、tyr、phe。

非保守性取代要求將此等類別中之一成員交換成另一類別。

任何不涉及維持抗CD20抗體之適當構形的半胱胺酸殘基通常亦可經絲胺酸取代以改良分子之氧化穩定性且防止異常交聯。相反地，可將半胱胺酸鍵添加至抗體以改良其穩定性(尤其當抗體為諸如Fv片段之抗體片段時)。

尤其較佳類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基。通常，選用於進一步開發之所得變異體相對於其所來源之親本抗體，將具有經改良之生物學性質。產生該等取代變異體之適宜方法涉及使用噬菌體呈現進行親和力成熟。簡言之，使多個高變區位點(例如6-7個位點)突變以在各位點產生所有可能之胺基酸取代。由此產生之抗體變異體以封裝於各顆粒內之與M13之基因III產物之融合形式自絲狀噬菌體顆粒中以單價方式呈現。隨後如本文中揭示針對生物活性(例如結合親和力)對噬菌體呈現之變異體進行篩檢。為了鑑別適於修飾之候選高變區位點，可執行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或另外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與人類CD20之間之接觸點可能為有益的。該等接觸殘基及鄰近殘基為根據在本文中詳述之技術進行取代之候選殘基。該等變異體一經產生，便如本文中描述對該組變異體進行篩檢，且可選擇在一或多個相關檢定中具有優良性質的抗體用於進一步開發。

另一類型之抗體胺基酸變異體改變抗體之初始糖基化模式。改變意謂使存在於抗體中之一或多個碳水化合物部分缺失，及/或添加一或多個不存在於抗體中之糖基化位點。

抗體之糖基化通常為N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分附接至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為使碳水化合物部分酶促附接至天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，此等三肽序列中之任一者存在於多肽中可形成潛在糖基化位點。O-連接之糖基化係指將糖N-乙醯基半乳胺糖、半乳糖或木糖之一附接至羥基胺基酸，最通常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

將糖基化位點添加至抗體中宜藉由使胺基酸序列變異以使得其含有一或多個上述三肽序列來實現(針對N-連接之糖基化位點)。亦可藉由向初始抗體序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或使初始抗體序列經一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代來產生變異(針對O-連接之糖基化部位)。

藉由此項技術中已知之多種方法製備編碼抗CD20抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子。此等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然產生之胺基酸序列變異體之情況下)或藉由對早先製備之抗CD20抗體變異體或非變異體型式之抗CD20抗體進行寡核苷酸介導(或定點)突變誘發、

PCR突變誘發及匣式突變誘發來製備。

可能需要針對效應功能來修飾本發明之抗體，以便例如增強抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性。此可藉由在抗體之Fc區中引入一或多個胺基酸取代來達成。或者或另外，可在Fc區中引入半胱胺酸殘基，由此容許在此區域中形成鏈間雙硫鍵。由此產生之同型二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增強之補體介導細胞殺傷力及抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人，*J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992)及Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。亦可如Wolff等人，*Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)中所述，使用異型雙官能交聯子製備具有增強之抗腫瘤活性之同型二聚抗體。或者，抗體可工程改造成具有雙Fc區且由此可具有增強之補體介導之溶解及ADCC能力。參見Stevenson等人，*Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

治療用途

所揭示的包含本發明之人類化2H7 CD20結合抗體之方法及組合物適用於治療許多惡性及非惡性疾病，其包括CD20陽性B細胞癌症(諸如B細胞淋巴瘤及白血病)及自體免疫疾病。骨髓中之幹細胞(B細胞祖細胞)不具有CD20抗原，容許健康B細胞在治療之後再生且在數月內恢復至正常含量。

CD20陽性B細胞癌症為包含在細胞表面上表現CD20之B

細胞之異常增殖的彼等癌症。CD20陽性B細胞腫瘤包括CD20陽性霍奇金氏疾病，包括淋巴細胞為主型霍奇金氏疾病(LPHD)；非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；濾泡性中心細胞(FCC)淋巴瘤；急性淋巴細胞白血病(ALL)；慢性淋巴細胞白血病(CLL)；毛細胞白血病。

如本文中所用之術語「非霍奇金氏淋巴瘤」或「NHL」係指除霍奇金氏淋巴瘤以外之淋巴系統癌症。霍奇金氏淋巴瘤有別於非霍奇金氏淋巴瘤之處通常為霍奇金氏淋巴瘤中存在里-斯二氏細胞(Reed-Sternberg cell)，而非霍奇金氏淋巴瘤中不存在該等細胞。如本文中所用之該術語所涵蓋之非霍奇金氏淋巴瘤之實例包括熟習此項技術者(例如腫瘤學家或病理學家)根據此項技術中已知之分類方案如此所鑑別之任何非霍奇金氏淋巴瘤，該等分類方案諸如Color Atlas of Clinical Hematology (第3版), A. Victor Hoffbrand及John E. Pettit (編) (Harcourt Publishers Ltd., 2000)中所述之經修訂之歐美淋巴瘤(Revised European-American Lymphoma; REAL)方案。尤其參見圖11.57、11.58及11.59中之清單。更多特定實例包括(但不限於)復發或難治性NHL、前線低度惡性NHL、III/IV期NHL、抗化學療法NHL、前驅B淋巴母細胞白血病及/或淋巴瘤、小淋巴細胞淋巴瘤、B細胞慢性淋巴細胞白血病及/或前淋巴細胞白血病及/或小淋巴細胞淋巴瘤、B細胞前淋巴細胞淋巴瘤、免疫細胞瘤及/或淋巴漿細胞淋巴瘤、淋巴漿細胞淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、脾臟邊緣區淋巴瘤、淋巴

結外邊緣區-MALT淋巴瘤、淋巴結邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、漿細胞瘤及/或漿細胞骨髓瘤、低度惡性/濾泡性淋巴瘤、中度惡性/濾泡性NHL、套細胞淋巴瘤、濾泡中心淋巴瘤(濾泡性)、中度惡性擴散NHL、擴散性大B細胞淋巴瘤、侵襲性NHL(包括侵襲性前線NHL及侵襲性復發NHL)、自體幹細胞移植之後復發或自體幹細胞移植難治之NHL、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、高度惡性免疫母細胞NHL、高度惡性淋巴母細胞NHL、高度惡性小非核裂細胞NHL、巨瘤症NHL、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、前驅(末梢)大粒狀淋巴細胞白血症、蕁樣真菌病及/或西紮利症候群(Sezary syndrome)、皮膚淋巴瘤、多形性大細胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

在特定實施例中，包含人類化CD20結合抗體及其功能片段之醫藥組合物用於治療非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、淋巴細胞為主型霍奇金氏疾病(LPHD)、小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)及慢性淋巴細胞白血病(CLL)，包括此等病狀之復發。

惰性淋巴瘤為生長緩慢、不可治癒之疾病，其中在多個週期之緩解及復發之後，一般患者存活6年與10年之間。在一實施例中，人類化CD20結合抗體或其功能片段用於治療惰性NHL，包括復發惰性NHL及利妥昔單抗難治性惰性NHL。復發惰性NHL患者可為先前已接受一個療程之利妥昔單抗且反應時間大於6月的利妥昔單抗反應者。

本發明之人類化2H7抗體或其功能片段適用作單劑治療(單一療法)，例如復發或難治性低度惡性或濾泡性、CD20陽性、B細胞NHL之單劑治療(單一療法)，或可聯合其他藥物依多藥方案投與患者。

本發明之人類化2H7抗體或功能片段可用作前線療法。本發明亦涵蓋使用此等抗體治療患有CD20陽性B細胞腫瘤之患者，該等患者對任一以下藥物之治療無反應或反應不足：利妥昔單抗(Genentech)；替坦異貝莫單抗(Zevalin™, Biogen Idec)；托西莫單抗(Bexxar™, GlaxoSmithKline)；HuMAX-CD20™ (GenMab)；IMMU-106(其為人類化抗CD20 a.k.a. hA20或90Y-hLL2, Immunomedics)；AME-133 (Applied Molecular Evolution/Eli Lilly)；吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg™，一種人類化抗CD33抗體，Wyeth/PDL)；阿倫單抗(alemtuzumab)(Campath™，一種抗CD52抗體，Schering Plough/Genzyme)；依帕珠單抗(epratuzumab)(IMMU-103™，一種人類化抗CD22抗體，Immunomedics)，或在此等藥物治療之後復發。

本發明另外提供藉由本發明之人類化2H7抗體治療CLL患者(包括用氟達拉濱(fludarabine)治療失敗的CLL患者)的方法。

本文中之「自體免疫疾病」為個體自身組織所產生且針對個體自身組織的疾病或病症或其共分離(co-segregate)或表現形式或其所引起之病狀。自體免疫疾病或病症之實

例包括(但不限於)關節炎(類風濕性關節炎，諸如急性關節炎、慢性類風濕性關節炎、痛風性關節炎、急性痛風性關節炎、慢性發炎性關節炎、退化性關節炎、感染性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、增生性關節炎、牛皮癬關節炎、脊椎關節炎及幼年發作型類風濕性關節炎、骨關節炎、慢性漸進性關節炎、變形性關節炎、慢性原發性多發性關節炎、反應性關節炎及強直性脊椎炎)、發炎性過度增生皮膚病、牛皮癬(斑狀牛皮癬、點狀牛皮癬、膿皰性牛皮癬及指甲牛皮癬)、異位性皮膚炎(包括異位性疾病，諸如花粉病及約伯氏症候群(Job's syndrome))、皮炎(包括接觸性皮炎、慢性接觸性皮炎、過敏性皮炎、過敏性接觸性皮炎、疱疹樣皮炎及異位性皮炎)、x-性聯高IgM症候群、蕁麻疹(諸如慢性過敏性蕁麻疹及慢性特發性蕁麻疹，包括慢性自體免疫性蕁麻疹)、多發性肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮壞死溶解、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化症(諸如全身性硬化症)、多發性硬化(MS)(諸如脊椎-眼MS、原發性進行性MS(PPMS)及復發緩解型MS(RRMS))、進行性全身性硬化症、動脈粥樣硬化、動脈硬化、播散性硬化症及共濟失調硬化症、發炎性腸道疾病(IBD)(例如克羅恩氏病(Crohn's disease)、自體免疫介導之胃腸疾病、結腸炎，諸如潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis)、潰瘍性結腸炎(colitis ulcerosa)、微觀結腸炎、膠原性結腸炎、息肉狀結腸炎、壞死性小腸結腸炎及透壁性結腸炎及自體免疫性發炎性腸道疾病)、壞疽性膿皮病、

結節性紅斑、原發性硬化性膽管炎、上鞏膜炎)、呼吸窘迫症候群(包括成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS))、腦膜炎、全部或部分葡萄膜炎、虹膜炎、脈絡膜炎、自體免疫性血液病、類風濕性脊椎炎、突發性耳聾、IgE介導之疾病(諸如過敏反應及過敏性及異位性鼻炎)、腦炎(拉斯馬森氏腦炎(Rasmussen's encephalitis)及邊緣及/或腦幹腦炎)、葡萄膜炎(諸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽腫性葡萄膜炎、非肉芽腫性葡萄膜炎、晶狀體抗原性葡萄膜炎、後葡萄膜炎或自體免疫性葡萄膜炎)、有及無腎病症候群之絲球體腎炎(GN)(諸如慢性或急性絲球體腎炎, 諸如原發性GN、免疫介導之GN、膜性GN(膜性腎病)、特發性膜性GN或特發性膜性腎病、膜性增生性GN(MPGN)(包括I型及II型)及迅速進行性GN)、過敏性病狀及反應、過敏性反應、濕疹(包括過敏性或異位性濕疹)、哮喘(諸如細支氣管哮喘、支氣管哮喘及自體免疫哮喘)、涉及T細胞浸潤及慢性發炎反應之病狀、妊娠期間針對外來抗原(諸如胎兒A-B-O血型)之免疫反應、慢性肺發炎疾病、自體免疫性心肌炎、白血球黏附缺乏症、全身性紅斑狼瘡(SLE)(諸如皮膚SLE)、亞急性皮膚紅斑狼瘡、新生兒狼瘡症候群(NLE)、播散性紅斑狼瘡、狼瘡(包括腎炎、大腦炎、兒科、非腎臟、腎臟外、盤狀、脫髮)、幼年型發作(I型)糖尿病(包括兒科胰島素依賴性糖尿病(IDDM)、成年發作糖尿病(II型糖尿病)、自體免疫性糖尿病)、特發性尿崩症、與細胞激素及T-淋巴細胞所介導之急

性及遲發過敏性相關之免疫反應、結核病、肉狀瘤病、肉芽腫病(包括淋巴瘤樣肉芽腫病、華格納氏肉芽腫病)、無顆粒性白血球症；血管病變，包括血管炎(包括大血管血管炎(包括風濕性多肌痛及巨細胞(高安氏(Takayasu's))動脈炎)、中血管血管炎(包括川崎氏疾病(Kawasaki's disease)及結節性多動脈炎/結節性動脈周炎)、微觀多動脈炎、CNS血管炎、壞死性、皮膚性或過敏性血管炎、全身性壞死性血管炎，及ANCA相關之血管炎，諸如奇-斯二氏血管炎或症候群(Churg-Strauss vasculitis or syndrome；CSS))、顱動脈炎、再生障礙性貧血、自體免疫性再生障礙性貧血、庫姆陽性貧血(Coombs positive anemia)、先天性單純紅血球再生障礙性貧血(Diamond Blackfan anemia)、溶血性貧血或免疫性溶血性貧血(包括自體免疫性溶血性貧血(AIHA))、惡性貧血、阿狄森氏病(Addison's disease)、單純紅血球貧血或發育不全(PRCA)、VIII因子缺乏症、A型血友病、自體免疫性嗜中性球減少症、全部血球減少症、白血球減少症、涉及白血球滲出之疾病、CNS發炎病症、多器官損傷症候群(諸如敗血症、創傷或出血繼發之彼等症候群)、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎絲球基底膜疾病、抗磷脂抗體症候群、過敏性神經炎、白塞氏病(Bechet's or Behcet's disease)、凱瑟曼氏症候群(Castleman's syndrome)、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、雷諾氏症候群、休格連氏症候群、史蒂芬-瓊森症候群(Stevens-Johnson syndrome)、類天庖瘡(諸如大庖

類天疱瘡及皮膚類天疱瘡)、天疱瘡(包括尋常天疱瘡、葉型天疱瘡、天疱瘡黏膜類天疱瘡及紅斑性天疱瘡)、自體免疫性多內分泌病變、萊特爾氏病或症候群(Reiter's disease or syndrome)、免疫複合物性腎炎、抗體介導之腎炎、視神經脊髓炎、多發性神經病變、慢性神經病變(諸如IgM多發性神經病變或IgM介導之神經病變);血小板減少症(例如心肌梗塞患者所患之血小板減少症),包括血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、輸血後紫癜(PTP)、肝素誘發之血小板減少症及自體免疫性或免疫介導之血小板減少症(諸如特發性血小板減少性紫癜(ITP)(包括慢性或急性ITP));睪丸及卵巢之自體免疫疾病(包括自體免疫性睪丸炎及卵巢炎)、原發性甲狀腺功能低下、副甲狀腺功能低下、自體免疫性內分泌疾病(包括甲狀腺炎,諸如自體免疫性甲狀腺炎、橋本氏病(Hashimoto's disease)、慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎)或亞急性甲狀腺炎、自體免疫性甲狀腺病、特發性甲狀腺功能低下、格雷氏病(Grave's disease))、多腺症候群(諸如自體免疫性多腺症候群(或多腺內分泌病症候群))、副腫瘤症候群(包括神經副腫瘤症候群,諸如朗伯-伊頓肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)或伊頓-朗伯症候群(Eaton-Lambert syndrome)、僵體症候群)、腦脊髓炎(諸如過敏性腦脊髓炎及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE))、重症肌無力(諸如胸腺瘤相關之重症肌無力)、小腦退化、神經肌強直、眼陣攣或眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)及感覺神經病變、多灶運動

神經病、席漢氏症候群(Sheehan's syndrome)、自體免疫性肝炎、慢性肝炎、狼瘡樣肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎或自體免疫性慢性活動性肝炎、淋巴間質肺炎(LIP)、閉塞性細支氣管炎(非移植)伴NSIP、格-巴二氏症候群(Guillain-Barré syndrome)、柏格氏疾病(Berger's disease)(IgA腎病)、特發性IgA腎病、線性IgA皮膚病、原發性膽汁性肝硬化、肺硬變、自體免疫性腸病症候群、乳糜瀉、腹腔病、口炎性腹瀉(麩質腸病)、難治性口炎性腹瀉、特發性口炎性腹瀉、冷球蛋白血症、澱粉樣沉著側索硬化(ALS；盧伽雷氏疾病(Lou Gehrig's disease))、冠狀動脈疾病、自體免疫性耳病(諸如自體免疫性內耳疾病(AIED))、自體免疫性聽力損失、眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)、多軟骨炎(諸如難治性或復發多軟骨炎)、肺泡蛋白沉著症、澱粉樣變性、鞏膜炎、非癌性淋巴球增多、原發性淋巴球增多(其包括單株B細胞淋巴球增多，例如良性單株 γ 球蛋白病及未明確意義之單株 γ 球蛋白病(MGUS))、末梢神經病變、副腫瘤症候群、離子通道疾病(諸如癲癇症、偏頭痛、心律不整、肌肉性病變、耳聾、失明、週期性麻痺及CNS之離子通道疾病)、自閉症、發炎性肌病、局部節段型腎絲球硬化(FSGS)、內分泌眼病、葡萄膜視網膜炎、脈絡膜視網膜炎、自體免疫性肝病變、肌肉纖維疼痛、多內分泌衰竭、施密特氏症候群(Schmidt's syndrome)、腎上腺炎、胃萎縮、早老性癡呆、脫髓鞘疾病(諸如自體免疫性脫髓鞘疾病及慢性發炎性脫髓鞘多神

經病)、糖尿病性腎病、爵斯勒氏症候群(Dressler's syndrome)、斑形脫髮、CREST症候群(鈣質沉著、雷諾氏現象、食道蠕動異常、肢端皮膚硬化及毛細血管擴張)、男性及女性自體免疫性不孕症、混合性結締組織病、恰加斯氏病(Chagas' disease)、風濕熱、復發性流產、農夫肺、多形性紅斑、心臟切開後症候群、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、愛鳥者肺、過敏性肉芽腫性血管炎、良性淋巴球性血管炎、阿爾波特氏症候群(Alport's syndrome)、肺泡炎(諸如過敏性肺泡炎及纖維性肺泡炎)、間質肺病、輸血反應、麻風、瘧疾、利什曼病(leishmaniasis)、錐蟲病、血吸蟲病、蛔蟲病、麴黴病、阿司匹林哮喘三聯症候群(Sampter's syndrome)、卡普蘭氏症候群(Caplan's syndrome)、登革熱、心內膜炎、心內膜心肌纖維化、擴散性間質性肺纖維化、間質性肺纖維化、肺纖維化、特發性肺纖維化、囊性纖維化、內眼炎、持久性隆起性紅斑(erythema elevatum et diutinum)、胎兒紅血球母細胞增多、嗜伊紅血球筋膜炎、舒爾曼氏症候群(Shulman's syndrome)、費爾提氏症候群(Felty's syndrome)、絲蟲病、睫狀體炎(諸如慢性睫狀體炎、異時睫狀體炎、虹膜睫狀體炎(急性或慢性)或富氏睫狀體炎(Fuch's cyclitis))、亨-舍二氏紫癍(Henoch-Schonlein purpura)、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、埃可病毒感染(echovirus infection)、心肌病、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、細小病毒感染、風疹病毒感染、接種疫苗後症

候群、先天性風疹感染、埃-巴二氏病毒感染(Epstein-Barr virus infection)、腮腺炎、埃文斯氏症候群(Evan's syndrome)、自體免疫性生殖腺衰竭、西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、鏈球菌感染後腎炎、閉塞性血栓血管炎、甲狀腺中毒症、脊髓癆、脈絡膜炎、巨細胞多肌痛、內分泌眼病、慢性過敏性肺炎、乾燥性角膜結膜炎、流行性角膜結膜炎、特發性腎臟症候群、微小病變性腎病、良性家族性及缺血性再灌注損傷、視網膜自體免疫、關節發炎、支氣管炎、慢性障礙性氣管疾病、矽粉沉著病、口瘡、口瘡性口炎、動脈硬化症、不形成精子症、自體免疫性溶血、伯克氏病(Boeck's disease)、冷球蛋白血症、杜氏攣縮(Dupuytren's contracture)、晶狀體過敏性眼內炎、過敏性腸炎、麻風結節性紅斑、特發性面神經麻痺、慢性疲勞症候群、風濕熱、哈麗二氏病(Hamman-Rich's disease)、感覺神經性聽力損失、陣發性血紅素尿、性腺功能減退、局部回腸炎、白細胞減少症、感染性單核白血球增多症、橫斷性脊髓炎、原發性特發性黏液水腫、腎病、交感性眼炎、肉芽腫性睪丸炎、胰腺炎、急性多神經根炎、壞疽性膿皮病、奎汶氏甲狀腺炎(Quervain's thyroiditis)、後天性脾萎縮、抗精蟲抗體所引起之不孕症、非惡性胸腺瘤、白斑症、SCID及埃-巴二氏病毒相關之疾病、後天性免疫不全症候群(AIDS)、寄生蟲性疾病(諸如利什曼蟲(Leshmania))、中毒性休克症候群、食物中毒、涉及T細胞浸潤之病狀、白血球黏附缺乏症、與由細

胞激素及T-淋巴細胞所介導之急性及遲發過敏性相關之免疫反應、涉及白血球滲出之疾病、多器官損傷症候群、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎絲球基底膜疾病、過敏性神經炎、自體免疫性多內分泌病變、卵巢炎、原發性黏液水腫、自體免疫性萎縮性胃炎、交感性眼炎、風濕性疾病、混合性結締組織病、腎病症候群、胰島炎、多內分泌衰竭、末梢神經病變、自體免疫性多腺症候群I型、成人發作特發性副甲狀腺低能症(AOIH)、全頭禿、擴張心肌病、後天性大皰性表皮松解(EBA)、血色沉著病、心肌炎、腎病症候群、原發性硬化性膽管炎、化膿性或非化膿性竇炎、急性或慢性竇炎、篩骨、額骨、上頷骨或蝶骨竇炎、嗜伊紅細胞相關之病症(諸如嗜伊紅血球過多症、肺部浸潤嗜伊紅血球過多症、嗜伊紅血球過多症-肌痛症候群、呂弗勒氏症候群(Löffler's syndrome)、慢性嗜伊紅血球性肺炎、熱帶性肺部嗜伊紅血球過多症、支氣管肺炎麴黴病、麴黴腫或含有嗜伊紅細胞之肉芽腫)、全身性過敏反應、血清陰性脊椎關節炎、多內分泌自體免疫疾病、硬化性膽管炎、鞏膜、外鞏膜、慢性皮膚黏膜念珠菌病、布魯頓氏症候群(Bruton's syndrome)、嬰兒期短暫性低 γ 球蛋白血症、維-奧二氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、共濟失調毛細血管擴張、與膠原性疾病相關之自體免疫性病、風濕病、神經病、淋巴腺炎、缺血性再灌注病症、血壓反應減少、血管功能障礙、血管擴張、組織損傷、心血管局部缺血、痛覺過敏、大腦局部缺血及伴隨血管生成之

疾病、過敏性過敏症、絲球體腎炎、再灌注損傷、心肌或其他組織之再灌注損傷、具有急性發炎性組份之皮膚病、急性化膿性腦膜炎或其他中樞神經系統發炎病症、眼及眼眶發炎病症、粒細胞輸注相關症候群、細胞激素誘發之毒性、急性嚴重炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、肺硬變、糖尿病性視網膜病、糖尿病性大動脈病症、動脈內增生、消化性潰瘍、瓣炎及子宮內膜異位。

在特定實施例中，包含人類化2H7抗體及其功能片段之醫藥組合物用於治療類風濕性關節炎及幼年型類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)(包括狼瘡腎炎)、華格納氏疾病、發炎性腸道疾病、潰瘍性結腸炎、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、自體免疫性血小板減少症、多發性硬化(包括復發緩解型MS)、牛皮癬、IgA腎病、IgM多神經病變、重症肌無力、ANCA相關之血管炎、糖尿病、雷諾氏症候群、休格連氏症候群、視神經脊髓炎(NMO)及絲球體腎炎。

「處理」或「減輕」係指治療性處理，其中此目標係減慢(減緩)(若非治癒)目標病理性病狀或病症或防止病狀復發。若根據本發明之方法在接受治療量之本發明之人類化CD20結合抗體後，個體顯示特定疾病之一或多個徵兆及症狀之可觀察及/或可測量之減少或不存在特定疾病之一或多個徵兆及症狀，則成功地「治療」個體之自體免疫疾病或CD20陽性B細胞惡性腫瘤。舉例而言，對於癌症而言，癌細胞數目之顯著減少或不存在癌細胞；腫瘤尺寸之

減小；腫瘤轉移之抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳終止)；在某種程度上抑制腫瘤生長；延長緩解時間、減緩疾病進程及/或在某種程度上緩解一或多個與特定癌症相關之症狀；降低發病率及死亡率及改善生活品質問題。亦可由患者感受到疾病之徵兆或症狀之減少。治療可達成完全反應(定義為癌症之所有徵兆消失)或部分反應，其中腫瘤尺寸減小較佳50%以上，更佳75%。若患者病情穩定，則該患者亦視為被治療。在一個標準中，本發明之h2H7抗體達成>95%末梢血液B細胞消耗且B細胞恢復至25%之基線。在較佳實施例中，本發明之抗體可有效治療以使得癌症患者在治療後4個月癌症不發展、較佳在治療後6個月、更佳一年、甚至更佳2年或2年以上癌症不發展。評估成功治療及疾病改善之此等參數易由熟習此項技術之醫師依據所熟知之常規程序測量。

「治療有效量」係指有效「治療」個體疾病或病症之抗體或藥物之量。在癌症情況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞數目；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即在某種程度上減慢且較佳終止)癌細胞於周邊器官中浸潤；抑制(亦即在某種程度上減慢且較佳終止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；且/或在某種程度上減輕一或多個與癌症相關之症狀。參見前述「治療」之定義。在自體免疫疾病情況下，治療有效量之抗體或其他藥物可有效減少疾病之徵兆及症狀。

評估治療腫瘤之功效或成功之參數已為熟習適當疾病之

醫師所知。通常，熟習醫師可檢查特定疾病之徵兆及症狀之減少。參數可包括疾病進展中值時間、緩解時間、穩定疾病。

以下參考文獻描述淋巴瘤及CLL、其診斷、治療及測量治療功效之標準醫學程序。Canellos GP, Lister, TA, Sklar JL: *The Lymphomas*. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1998; van Besien K及Cabanillas, F: Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, 第70章, 第1293-1338頁, *Hematology, Basic Principles and Practice*, 第3版 Hoffman等人(編者), Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; 及 Rai, K及 Patel, D: Chronic Lymphocytic Leukemia, 第72章, 第1350-1362頁, *Hematology, Basic Principles and Practice*, 第3版 Hoffman等人(編者), Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000。

評估治療自體免疫疾病或自體免疫相關疾病之功效或成功的參數已為熟習適當疾病之醫師所知。通常，熟習醫師可檢查特定疾病之徵兆及症狀之減少。以下舉例說明。

在一實施例中，包含人類化2H7抗體之醫藥組合物用於治療類風濕性關節炎。

RA為影響兩百萬以上美國人且防礙患者日常活動的虛衰性自體免疫疾病。當身體自身免疫系統不適當地侵襲關節組織且引起可摧毀健康組織之慢性炎症及關節內損傷時，出現RA。症狀包括關節發炎、腫脹、僵硬及疼痛。

另外，因為RA為全身性疾病，所以其會影響諸如肺、眼及骨髓之其他組織。已知尚無治癒。治療包括各種類固醇及非類固醇消炎藥物、免疫抑制劑、疾病緩解抗風濕病藥物(DMRD)及生物製劑。然而，許多患者對治療之反應仍不足。

抗體可用作早期RA患者(亦即未經甲胺喋呤(MTX)治療)之第一線療法且可用作單一療法，或聯合或後於例如MTX或環磷醯胺使用。或者，抗體可作為第二線療法用於治療DMARD及/或MTX難治性患者，且可作為單一療法或聯合例如MTX使用。人類化CD20結合抗體適用於預防及控制關節損傷、阻滯結構性損傷、減少與RA發炎相關之疼痛，且一般可減少中度至重度RA之徵兆及症狀。人類化CD20抗體可先於、後於或與用於治療RA之其他藥物一起治療RA患者(參見以下組合療法)。在一實施例中，以本發明之人類化CD20結合抗體治療先前經疾病緩解性抗風濕病藥物治療無效且/或對單獨甲胺喋呤之反應不足的患者。在此治療之一實施例中，患者在17天治療方案中接受單獨人類化CD20結合抗體(第1天及第15天1 g靜脈內輸注)；CD20結合抗體外加環磷醯胺(第3天及第17天750 mg靜脈內輸注)；或CD20結合抗體外加甲胺喋呤。

因為在RA期間身體產生腫瘤壞死因子 α (TNF α)，所以TNF α 抑制劑已用於治療彼疾病。然而，諸如依那西普(Etanercept)(ENBREL®)、英利昔單抗(Infliximab)(REMICADE®)及阿達木單抗(Adalimumab)(HUMIRA™)之

TNF α 抑制劑會產生消極副作用，諸如感染、心臟衰竭及脫髓鞘。因此，在一實施例中，人類化CD20結合抗體或其生物學功能片段可作為例如第一線療法用於治療RA患者以減少使用TNF α 抑制藥物所經歷之此等消極副作用之風險或治療視為易中毒(例如心臟中毒)的患者。人類化CD20結合抗體或其生物學功能片段亦適用於治療罹患RA之個體的方法中，該等個體已以TNF α 抑制劑治療但無反應，對TNF α 抑制劑之反應不足(TNF-IR患者)或反應一段時間之後疾病復發，或判定為對TNF α 抑制劑治療不能發生反應。在一實施例中，在TNF α 抑制劑治療之前，以諸如100 mg以下之低劑量治療TNF-IR。

一種評估RA治療功效之方法係基於美國風濕病學會(ACR)標準，其係測量疼痛及腫脹關節之改善百分率。與無抗體治療(例如治療前之基線)或安慰劑治療相比，RA患者可以例如ACR 20 (20%改善)計分。評估抗體治療功效之其他方法包括用於評價結構性損傷(諸如骨腐蝕及關節間隙窄化)之X射線計分，諸如沙普X射線計分(Sharp X-ray score)。亦可在治療期間或之後基於健康評估問卷[HAQ]計分、AIMS計分、SF-36評估患者之失能之預防或改善。ACR 20標準可包括疼痛關節計數及腫脹關節計數之20%改善外加5種其他度量中至少3者之20%改善。

1. 患者藉由視覺類比量表(VAS)進行之疼痛評估，
2. 患者對疾病活動度之整體評估(VAS)，
3. 醫師對疾病活動度之整體評估(VAS)，

4. 患者自我評估失能，藉由健康評定問卷測量，及
5. 急性期反應CRP或ESR。

ACR 50及ACR 70的定義類似。較佳向患者投與有效達成至少ACR 20、較佳至少ACR 30、更佳至少ACR50、甚至更佳至少ACR70、最佳至少ACR 75及高於ACR 75之量的本發明之CD20結合抗體。

牛皮癬關節炎具有獨特且不同之射線照相特徵。對於牛皮癬關節炎而言，亦可藉由沙普計分評估關節腐蝕及關節間隙窄化。本發明之人類化CD20結合抗體可用於預防關節損傷以及減少病症之疾病徵兆及症狀。

本發明之另一態樣為藉由向罹患病症之個體投與包含治療有效量之本發明之人類化CD20結合抗體的醫藥組合物來治療SLE或狼瘡腎炎的方法。SLEDAI計分提供疾病活動度之數值定量。SLEDAI為已知與疾病活動度相關之24種臨床及實驗室參數的加權指數，其數值範圍為0-103。參見Current Opinion in Rheumatology 2002, 14:515-521中之Bryan Gescuk & John Davis,「Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus」。其他計分方法包括BILAG計分。咸信雙股DNA之抗體可引起腎臟復發及其他狼瘡表現。可監測經受抗體治療之患者之腎臟復發時間，其定義為尿中之血清肌酸酐、尿蛋白或血液的顯著可再現增加。或者或另外，可監測患者之抗核抗體及雙股DNA之抗體之含量。SLE治療包括高劑量皮質類固醇及/或環磷醯胺(HDCC)。在本文中，狼瘡之成功治療可減少復發，亦即

降低嚴重程度及/或縮短下一次復發之時間。

脊椎關節病為一組關節病症，包括強直性脊椎炎、牛皮癬關節炎及克羅恩氏病。藉由有效之患者及醫師整體評估測量工具測定治療成功。

關於血管炎，約75%之全身性血管炎患者具有抗嗜中性白血球細胞質抗體且於影響小/中血管之三種病狀之一中群集：華格納氏肉芽腫病(WG)、微觀多血管炎(MPA)及奇-斯二氏症候群(CSS)，統稱為ANCA相關血管炎(AAV)。

牛皮癬之治療功效係藉由監測疾病臨床徵兆及症狀之變化(與基線狀況相比)來評估，該等變化包括醫師整體評估(PGA)變化及牛皮癬面積及嚴重度指數(PASI)計分、牛皮癬症狀評估(PSA)。可在治療過程中根據用於說明在特定時間點下經歷之發癢程度的視覺類比量表來定期測量以本發明之人類化CD20結合抗體(諸如hu2H7.v511)治療之牛皮癬患者。

患者可能在其首次輸注治療性抗體時經歷輸注反應或輸注相關之症狀。此等症狀在嚴重程度方面不同且通常可隨著醫療介入而逆轉。此等症狀包括(但不限於)流感樣發燒、寒戰/僵直、噁心、蕁麻疹、頭痛、支氣管痙攣、血管性水腫。本發明之疾病治療方法可理想地將輸注反應減至最低程度。為了減輕或最小化該等不利事件，患者初始可接受調節或耐受劑量之抗體、繼之治療有效劑量之抗體。調節劑量低於治療有效劑量以使患者適應以耐受更高劑量。

給藥

視欲治療之適應症及熟習此領域之醫師所熟悉的給藥有關因素而定，本發明之抗體可以有效治療彼適應症同時使毒性及副作用減至最低程度的劑量來投與。所需劑量可視疾病及疾病嚴重程度、疾病階段、所需B細胞調節量及熟習此項技術之醫師所熟知之其他因素而定。

可以不同給藥頻率(例如每週、每兩週、每月等)投與本發明之抗體。在一實例中，給藥頻率為每6個月一劑，或每6個月兩劑(間隔兩週)。抗體溶液之注射體積範圍可為每次注射約0.1至約3 ml，更佳每次注射約0.5 ml至約1.5 ml。一次注射中投與之人類化2H7抗體之總量可為每次注射至多約150 mg。可使用多次注射達成所需劑量。

治療自體免疫疾病時，視個別患者之疾病及/或病狀嚴重程度而定，可能需要藉由調節人類化2H7抗體之劑量來調節B細胞消耗程度。B細胞消耗可(但不必定)為完全的。或者，可能在初始治療中需要全部B細胞消耗，但在後續治療中，可調節劑量以達成僅部分消耗。在一實施例中，B細胞消耗為至少20%，亦即與治療前之基線含量相比，剩餘CD20陽性B細胞為80%或小於80%。在其他實施例中，B細胞消耗為25%、30%、40%、50%、60%、70%或70%以上。B細胞消耗較佳足以中止疾病進程，更佳足以減輕所治療之特定疾病之徵兆及症狀，甚至更佳足以治癒疾病。

可使用本發明之任何給藥方案治療對一或多種當前療法

無效、耐受不良或禁忌之自體免疫疾病或B細胞惡性腫瘤患者。舉例而言，本發明涵蓋用於RA患者之本發明治療方法，該等RA患者對腫瘤壞死因子(TNF)抑制劑療法或對疾病緩解性抗風濕病藥物(DMARD)療法之反應不足。

「長期」投與係指與短期模式相反，以持續模式投與藥劑，以便使最初治療效果(活性)長期維持。「間斷」投與並非為連續進行的治療(不中斷)，而是在本質上循環進行的治療。

組合療法

治療上述B細胞腫瘤時，可使用本發明之人類化2H7抗體配合一或多種治療劑(諸如化學治療劑)、依多藥物方案治療患者。人類化2H7抗體可與化學治療劑同時、依序或交替投與或在對其他療法無反應之後投與。淋巴瘤治療之標準化學療法可包括環磷醯胺、阿糖胞苷(cytarabine)、美法侖(melphalan)及米托蒽醌(mitoxantrone)外加美法侖。CHOP為治療非霍奇金氏淋巴瘤之最常見化學治療方案之一。以下為用於CHOP方案中之藥物：環磷醯胺(商標名稱cytoxan，neosar)；阿德力黴素(adriamycin)(小紅莓(doxorubicin)/羥基小紅莓)；長春新鹼(vincristine)(Oncovin)；及潑尼龍(prednisolone)(有時稱為Deltasone或Orasone)。在特定實施例中，將CD20結合抗體與一或多種以下化學治療劑組合投與有需要之患者：小紅莓、環磷醯胺、長春新鹼及潑尼龍。在一特定實施例中，以本發明之人類化2H7抗體配合CHOP(環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼

及潑尼松)療法來治療罹患淋巴瘤(諸如非霍奇金氏淋巴瘤)之患者。在另一實施例中，可以本發明之人類化 2H7 CD20結合抗體聯合CVP(環磷醯胺、長春新鹼及潑尼松)化學療法來治療癌症患者。在一特定實施例中，將人類化 2H7.v511或v114配合CVP投與罹患CD20陽性NHL之患者，例如每3週一輪共8輪。在治療CLL之一特定實施例中，配合氟達拉濱及環磷醯胺之一或兩者之化學療法投與hu2H7.v511抗體。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如塞替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸鹽，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；乙烯亞胺及甲基密胺，包括六甲密胺(altretamine)、三伸乙基密胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲密胺(trimethylolomelamine)；TLK 286(TELCYTA™)；多聚乙醯(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康

(irinotecan) , CAMPTOSAR®) 、 乙 醯 基 喜 樹 鹼 (acetylcamptothecin)、 斯 考 普 萊 叮 (scoplectin) 及 9- 胺 基 喜 樹 鹼) ; 苔 蘚 抑 素 (bryostatin) ; 卡 利 斯 塔 叮 (callystatin) ; CC-1065 (包 括 其 阿 多 來 新 (adozelesin) 、 卡 折 來 新 (carzelesin) 及 比 折 來 新 (bizelesin) 合 成 類 似 物) ; 足 葉 草 毒 素 (podophyllotoxin) ; 足 葉 草 酸 (podophyllinic acid) ; 替 尼 泊 苷 (teniposide) ; 念 珠 藻 環 肽 (尤 其 念 珠 藻 環 肽 1 及 念 珠 藻 環 肽 8) ; 海 兔 毒 素 (dolastatin) ; 多 卡 米 辛 (duocarmycin) (包 括 合 成 類 似 物 KW-2189 及 CB1-TM1) ; 艾 榴 素 (eleutherobin) ; 盤 克 斯 塔 叮 (pancratistatin) ; 沙 考 的 汀 (sarcodictyin) ; 海 綿 抑 素 ; 氮 芥 (nitrogen mustard) , 諸 如 苯 丁 酸 氮 芥 (chlorambucil) 、 萘 氮 芥 (chlornaphazine) 、 環 磷 醯 胺 、 雌 莫 司 汀 (estramustine) 、 異 環 磷 醯 胺 (ifosfamide) 、 二 氯 甲 基 二 乙 胺 (mechlorethamine) 、 鹽 酸 二 氯 甲 基 二 乙 胺 氧 化 物 (mechlorethamine oxide hydrochloride) 、 美 法 侖 、 新 氮 芥 (novembichin) 、 膽 固 醇 苯 乙 酸 氮 芥 (phenesterine) 、 潑 尼 莫 司 汀 (prednimustine) 、 曲 洛 磷 胺 (trofosfamide) 、 烏 拉 莫 司 汀 (uracil mustard) ; 亞 硝 基 脲 , 諸 如 卡 莫 司 汀 (carmustine) 、 氯 脲 黴 素 (chlorozotocin) 、 福 莫 司 汀 (fotemustine) 、 洛 莫 司 汀 (lomustine) 、 尼 莫 司 汀 (nimustine) 及 拉 甯 司 汀 (ranimustine) ; 雙 膦 酸 鹽 , 諸 如 氯 屈 膦 酸 鹽 (clodronate) ; 抗 生 素 , 諸 如 烯 二 炔 抗 生 素 (例 如 刺 孢 黴 素 (calicheamicin) , 尤 其 刺 孢 黴 素 γ 11 及 刺 孢 黴 素 ω 11 (參 見 例 如 Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)) 及 蒽 環 黴 素 (anthracycline) (諸 如 脂 質 體

蔥環黴素(annamycin)、AD 32、阿克拉黴素(alcarubicin)、
 道諾黴素(daunorubicin)、右雷佐生(dexrazoxane)、DX-52-
 1、表柔比星(epirubicin)、GPX-100、伊達比星(idarubicin)、
 KRN5500、美諾立爾(menogaril)、達米辛(dynemicin)(包括
 達米辛A)、艾斯帕米辛(esperamicin)、新制癌菌素發色團
 及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉希黴素
 (aclacinomysin)、放線菌素(actinomycin)、奧拉黴素
 (authramycin)、重氮絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線
 菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素
 (carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素
 (chromomycinis)、放線菌素D(dactinomycin)、地托比星
 (detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、
 ADRIAMYCIN®小紅莓(包括(N-嗎啉基)-小紅莓、氰基(N-
 嗎啉基)-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓、脂質體小紅莓及去氧
 小紅莓(deoxydoxorubicin))、依索比星(esorubicin)、麻西羅
 黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素
 C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、
 橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素
 (potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、
 羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈佐星
 (streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、
 淨司他丁(zinostatin)及左柔比星(zorubicin)；葉酸類似
 物，諸如迪諾特寧(denopterin)、喋羅呤(pteropterin)及三
 甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱、6-巰

基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)及硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)及氟尿去氧核苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸鹽(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitioanol)、美雄烷(mepitiothane)及甾內酯(testolactone)；抗腎上腺，諸如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如醛葉酸(folinic acid)(甲醯四氫葉酸(leucovorin))；乙醯葡醛酯(aceglatone)；抗葉酸抗贅生性藥劑，諸如ALIMTA®(LY231514培美曲唑(pemetrexed))、二氫葉酸還原酶抑制劑(諸如甲胺喋呤)、抗代謝物(諸如5-氟尿嘧啶(5-FU)及其前藥，諸如UFT、S-1及卡培他濱(capecitabine))及胸苷酸合成酶抑制劑及甘胺醯胺核苷酸甲醯基轉移酶抑制劑，諸如雷替曲賽(raltitrexed)(TOMUDEX^{RM}, TDX)；二氫嘧啶脫氫酶抑制劑，諸如伊利盧拉(eniluracil)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；安吡啶(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素

(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及胺沙托辛(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣錯合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；新月毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、黏液黴素A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)(ELDISINE®, FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖苷(arabinoside)(「Ara-C」)；環磷醯胺；塞替派；紫杉醇及紫杉烷，例如TAXOL®太平洋紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、無十六醇聚氧乙烯醚且經白蛋白工程改造之太平洋紫杉醇奈米顆粒調配物ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；克羅南布(chloranbucil)；吉西他濱(gemcitabine)(GEMZAR®)；6-硫代鳥嘌呤；巯嘌呤；鉑；鉑類似物或

以鉑為主之類似物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)(VELBAN®)；依託泊苷(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼(vincristine)(ONCOVIN®)；長春花生物鹼(vinca alkaloid)；長春瑞賓(vinorelbine)(NAVELBINE®)；諾凡特龍(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素(daunomycin)；胺基喋呤；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述兩者或兩者以上之組合，諸如CHOP(環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼及潑尼龍之組合療法之縮寫)及FOLFOX(奧沙利鉑(ELOXATIN™)與5-FU及甲醯四氫葉酸之組合治療方案之縮寫)。

此定義中亦包括作用為調控或抑制激素對腫瘤之作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括例如他莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬鹽酸鹽(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抑制芳香酶(其調控腎上腺中之雌激素產生)之芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、

弗米斯坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏氯唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®安美達錠(anastrozole)；及抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制涉及異常細胞增殖之信號傳導路徑中之基因(諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R))表現的彼等反義寡核苷酸；疫苗，諸如基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；PROLEUKIN®rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX®rmRH；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

另外，hu2H7抗體及其功能片段可配合抗腫瘤血管生成劑(諸如血管內皮生長因子(VEGF)拮抗劑)用於治療表現CD20之B細胞腫瘤(例如NHL)。「抗血管生成劑」或「血管生成抑制劑」係指直接或間接抑制血管生成、血管發生或不當血管通透性之小分子量物質、聚核苷酸、多肽、經分離之蛋白質、重組蛋白質、抗體或其結合物或融合蛋白。舉例而言，抗血管生成劑如以上所定義為抗血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如VEGF之抗體、VEGF受體之抗體、阻斷VEGF受體信號傳導之小分子(例如PTK787/ZK2284，SU6668)。「VEGF拮抗劑」係指能夠中

和、阻斷、抑制、取消、減少或干擾VEGF活性(包括其與一或多個VEGF受體之結合)的分子。在一實施例中，使用2H7.v511 或 2H7.v114 配合 Avastin®(貝伐株單抗(bevacizumab)；Genentech)治療罹患該B細胞腫瘤之患者。亦稱為「rhuMAb VEGF」或「Avastin®」之抗VEGF抗體「貝伐株單抗(BV)」為根據Presta等人，*Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)所產生之重組人類化抗VEGF單株抗體。

hu2H7抗體及其功能片段可配合細胞激素之TNF家族之成員(諸如Apo-2配位體(Apo2L)，亦稱為TRAIL)用於治療表現CD20之B細胞腫瘤的方法中。全長原生序列人類Apo-2配位體為細胞激素之腫瘤壞死因子家族之281個胺基酸長、II型跨膜蛋白質。已發現可溶性形式之Apo-2配位體(諸如包含細胞外域(ECD)或其一部分之彼等配位體)具有不同活性，包括哺乳動物癌細胞中之細胞凋亡活性。Apo2L/TRAIL(描述於WO 97/01633及WO 97/25428中)為可溶性人類蛋白質，其為包含全長Apo-2L蛋白之胺基酸114-281的ECD片段。

治療上述自體免疫疾病或自體免疫相關病狀時，可使用一或多種hu2H7抗體配合第二治療劑(諸如免疫抑制劑)治療患者，諸如在多藥物方案中。hu2H7抗體可與免疫抑制劑同時、依序或交替投與或在對其他療法無反應後投與。免疫抑制劑之投與劑量可相同於或少於此項技術中所述之投與劑量。較佳輔助免疫抑制劑視許多因素而定，包括所

治療之病症類型以及患者病史。

如本文中用於輔助療法之「免疫抑制劑」係指作用為抑制或遮蔽患者之免疫系統的物質。該等藥劑包括抑制細胞激素產生、下調或抑制自體抗原表現或遮蔽MHC抗原之物質。該等藥劑之實例包括類固醇，諸如糖皮類固醇，例如潑尼松、甲潑尼龍(methylprednisolone)及地塞米松(dexamethasone)；經2-胺基-6-芳基-5-取代之嘧啶(參見美國專利第4,665,077號)、硫唑嘌呤(或環磷醯胺，若硫唑嘌呤存在不良反應)；溴隱定(bromocryptine)；戊二醛(如美國專利第4,120,649號中所述，其遮蔽MHC抗原)；MHC抗原及MHC片段之抗個體遺傳型抗體；環孢素A；細胞激素或細胞激素受體拮抗劑，包括抗干擾素-、抗干擾素-或抗干擾素-抗體；抗腫瘤壞死因子-抗體；抗腫瘤壞死因子-抗體；抗介白素-2抗體及抗IL-2受體抗體；抗L3T4抗體；異源抗淋巴細胞球蛋白；全T抗體，較佳抗CD3或抗CD4/CD4a抗體；含有LFA-3結合域之可溶性肽(90年7月26日公開之WO 90/08187)；鏈激酶；TGF-；鏈球菌去氧核糖核酸酶(streptodornase)；來自宿主之RNA或DNA；FK506；RS-61443；去氧斯伯格埃林(deoxyspergualin)；雷帕黴素(rapamycin)；T細胞受體(美國專利第5,114,721號)；T細胞受體片段(Offner等人，*Science* 251:430-432 (1991)；WO 90/11294；及WO 91/01133)；及T細胞受體抗體(EP 340,109)，諸如T10B9。

治療類風濕性關節炎時，可使用本發明之CD20結合抗

體配合以下藥物中之任一者或多者治療患者：DMARD(疾病緩解性抗風濕病藥物)(例如甲胺喋呤)、NSAI或NSAID(非類固醇消炎藥物)、免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤；微酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil)(CellCept®；Roche))、止痛劑、糖皮類固醇、環磷醯胺、HUMIRA™(阿達木單抗；Abbott Laboratories)、ARAVA®(來氟米特(leflunomide))、REMICADE®(英利昔單抗；Centocor Inc., (Malvern, Pa))、ENBREL®(依那西普；Immunex, WA)、ACTEMRA®(托西利單抗(tocilizumab)；Roche, Switzerland)、COX-2抑制劑。常用於RA中之DMARD為羥基氯喹(hydroxychloroquine)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、甲胺喋呤、來氟米特、依那西普、英利昔單抗、硫唑嘌呤、D-青黴胺、金(口服)、金(肌肉內)、二甲胺四環素(minocycline)、環孢素、葡萄球菌蛋白A免疫吸附。

阿達木單抗為結合至TNF之人類單株抗體。英利昔單抗為結合至TNF之嵌合小鼠-人類單株抗體。其為治療RA及克羅恩氏病之免疫抑制處方藥物。英利昔單抗已關聯於致死反應，諸如心臟衰竭，及感染(包括結核病)，以及導致MS之脫髓鞘。Actemra(托西利單抗)為人類化抗人類介白素-6(IL-6)受體。

依那西普為「免疫黏附素」融合蛋白，其由人類75 kD(p75)腫瘤壞死因子受體(TNFR)之細胞外配位體結合部分與人類IgG1之Fc部分連接所組成。依那西普(ENBREL®)為在美國已批准用於治療活性RA之可注射藥物。依那西

普結合至 TNF α ，且用於自關節及血液中移除大部分 TNF α ，由此防止 TNF α 促進類風濕性關節炎之發炎及其他症狀。該藥物相關之負面副作用包括嚴重感染及敗血症，神經系統病症，諸如多發性硬化(MS)。參見例如 www.remicade-infliximab.com/pages/enbrel_embrel.html。

關於 RA 之習知治療，參見例如「Guidelines for the management of rheumatoid arthritis」*Arthritis & Rheumatism* 46(2): 328-346 (2002年2月)。在一個特定實施例中，使用本發明之 hu2H7 CD20 抗體連合甲胺喋呤(MTX)治療 RA 患者。MTX 之例示性劑量為約 7.5-25 毫克/公斤/週。MTX 可經口及皮下投與。

在一個實例中，患者同時亦接受 MTX(口服(p.o.)或非經腸 10-25 毫克/週)以及皮質類固醇療程，由以下組成：30 分鐘靜脈內輸注 100 mg 甲潑尼龍，隨後輸注 CD20 抗體，及第 2-7 天口服 60 mg 潑尼松，第 8-14 天口服 30 mg，第 16 天回至基線劑量。患者亦可接受葉酸鹽(5 毫克/週)，以單次劑量形式或以每日分次劑量形式給予。在整個治療期間，患者視情況繼續接受任何基底皮質類固醇(10 毫克/天之潑尼松或相等物)。

對於治療強直性脊椎炎、牛皮癬關節炎及克羅恩氏病，可使用本發明之 CD20 結合抗體連合例如 Remicade®(英利昔單抗；得自 Centocor Inc. (Malvern, Pa.))、ENBREL(依那西普；Immunex, WA)治療患者。

SLE 之治療包括 CD20 抗體與高劑量皮質類固醇及/或環

磷醯胺(HDCC)之組合。可以本發明之2H7抗體與以下任意者之組合治療罹患SLE、AAV及NMO之患者：皮質類固醇、NSAID、止痛劑、COX-2抑制劑、糖皮類固醇、習知DMARD(例如甲胺喋呤、柳氮磺吡啶、羥氯喹、來氟米特)、生物DMARD(諸如抗Bly，例如貝利單抗(belimumab))、抗IL6R(例如托西利單抗)；CTLA4-Ig(阿巴西普(abatacept))、(抗CD22，例如依帕珠單抗)、免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤；黴酚酸嗎啉乙酯(CellCept®；Roche))及細胞毒性劑(例如環磷醯胺)。

治療牛皮癬時，可將人類化2H7抗體配合表面治療劑投與患者，表面治療劑諸如表面類固醇、蒽三酚(anthralin)、鈣泊三醇(calcipotriene)、氯倍他索(clobetasol)及他紮羅汀(tazarotene)，或配合甲胺喋呤、類視黃素、環孢素、PUVA及UVB治療投與患者。在一實施例中，人類化2H7抗體與環孢素依序或同時治療牛皮癬患者。

為了使毒性減至最低程度，可依循環、依序、組合或間歇治療方案，或較低劑量組合方案(本發明之劑量下之hu2H7 CD20結合抗體組合物)投與傳統全身性療法。

製品及套組

本發明之另一實施例為一種製品，其包含適用於治療自體免疫疾病及相關病狀及CD20陽性癌症(諸如非霍奇金氏淋巴瘤)之本發明調配物。製品包含容器及容器上或附於容器上之標籤或藥品說明書。適合容器包括例如瓶、小

瓶、注射器等。容器可自諸如玻璃或塑膠之各種物質形成。調配物或組合物中之至少一種活性劑為本發明之 hu2H7 抗體，容器(諸如注射器)中抗體的含量可傳遞上文針對給藥所述之劑量。hu2H7 之濃度在 10 mg/ml 至 200 mg/ml 之範圍內，可為 30-150 mg/ml 或 100-150 mg/ml。標籤或藥品說明書說明組合物用於治療特定病狀。標籤或藥品說明書另外包含向患者投與抗體組合物之說明書。

藥品說明書係指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於涉及該等治療性產品之使用的適應症、用法、劑量、投與、禁忌症及/或警告之資訊。在一實施例中，藥品說明書說明組合物用於治療非霍奇金氏淋巴瘤。

另外，製品可進一步包含第二容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如注射用水(WFI)、抑菌注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理鹽水、林格爾氏溶液(Ringer's solution)、氯化鈉(0.9%)及右旋糖溶液。其可另外包括自商業及使用者觀點合乎需要的其他物質，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

實驗性實例

實例 1

rhuMab 2H7 之初始皮下調配物

開發 rhuMab 2H7 之高濃度皮下調配物(150 mg/mL)。此調配物包含 150 mg/ml 2H7、30 mM 乙酸鈉；7% 海藻糖二水合物；0.03% 聚山梨醇酯 20 (pH 5.3)。此調配物在推薦

條件下長期穩定地儲存於最終小瓶中。藉由皮下注射將此物質投與獼猴引起注射部位之嚴重發炎及低生物可用性($\approx 30\%$)。在此等動物中觀察到皮下層中之輕度至中度巨噬細胞浸潤。發炎係因外來體物質(亦即2H7測試物質)所致。在模擬該產物曝露於注射部位的條件下測試此調配物證明蛋白質在生理條件下顯著聚集(圖1)，證實獼猴中觀察到之發炎結果。觀察到之沈澱符合pH轉變之後之鹽析效應。

實例 2

測試皮下注射之巨分子在生理條件下之聚集的

活體外透析方法

開發活體外透析方法以測試不同賦形劑減少2H7在皮下注射期間、在所遇到之生理條件下聚集的能力。針對此模型開發經修飾之PBS溶液以模擬間質液。此活體外系統用於評估糖、聚合物、界面活性劑及胺基酸阻滯2H7聚集之影響。顯示產物活體外釋放改良的候選調配物隨後在活體內測試(大鼠皮下模型；參見實例3)以判定此改良是否與活體內發炎減少對應。

活體外透析模型之結構顯示於圖2中。在37°C下，以220 ml經修飾之PBS溶液(167 mM鈉、140 mM氯化物、17 mM磷酸鹽、4 mM鉀)填充250 ml玻璃瓶。將6 cm長之透析管(12 mm直徑之Spectra Por 1百萬截留分子量(MWCO) PVDF透析管)浸沒於純水中。透析管之一端夾緊，且以約1 ml之試樣(2H7及測試賦形劑)填充管。移除過量空氣，且管之

另一端夾緊於瓶之封口中。將經填充之袋添加至250 mL含有經修飾之PBS溶液之玻璃瓶中，且將瓶置於37°C下恆定攪拌。在2.5、6、12、24、33及48小時後移除500 µl經修飾之PBS釋放介質樣品。藉由UV光度掃描測量樣品之混濁度及釋放介質中之蛋白質含量。另外，目檢釋放介質及透析管內之溶液之沈澱。

若符合以下條件，則測試賦形劑在活體外聚集研究中視為可接受的：

- 2H7及測試賦形劑之累積釋放大於陰性對照(初始2H7調配物-150 mg/ml 2H7、30 mM乙酸鈉；7%海藻糖二水合物；0.03%聚山梨醇酯20 (pH 5.3))，說明2H7特徵改良。
- 陽性對照(Raptiva™；rhuMAb抗CD11a，一種皮下投與之抗體)顯示無沈澱且釋放大於陰性對照。
- 2H7之沈澱減少或消除。
- 釋放介質之混濁度降低。

符合可接受標準之候選物隨後在活體內大鼠模型中測試以判定活體外阻滯聚集是否與活體內發炎減少相關。

活體外結果：

活體外透析方法中之研究對照之典型釋放曲線顯示於圖3中。針對此模型選擇對照可將不易聚集之蛋白質(rhuMAb CD11a)之釋放與在生理條件下通常聚集之蛋白質(初始2H7)之釋放相提並論。兩個釋放曲線之間之面積可度測量賦形劑阻滯聚集之相對能力(相對於對照)。

初始2H7調配物之累積釋放較低(<30%)。當2H7自透析袋釋入經修飾之PBS溶液中時，觀察到釋放介質之混濁度增加，說明該物質在彼環境中聚集。在24小時內觀察到透析袋內廣泛絮凝，且2H7濃度相應地自研究開始時之150 mg/mL顯著降低至48小時研究結束時之4至5 mg/mL。所有此等觀察結果說明2H7在生理條件下易聚集。當在37℃下將2H7初始調配物儲存於玻璃小瓶中時，未發現此行為。

相比之下，rhuMAb CD11a自透析袋快速釋入經修飾之PBS溶液中。釋放介質在整個研究中保持澄清且在透析袋內未觀察到絮凝，說明rhuMAb CD11a在生理條件下不聚集且可相應地作為此模型之對照。表3概述所釋放之蛋白質百分率、釋放介質混濁度及絮凝之存在。

表 3

對照	時間 (小時)	所釋放之累積蛋 白質%	釋放介質之混濁度 <i>OD 350 nm</i>	透析袋內 之絮凝
rhuMAb CD11a	0	0	0.001	否
	48	83	0.03	否
2H7初始	0	0	0.02	否
	48	28	0.37	是

實例 3

測試巨分子聚集之活體內大鼠皮下模型

大鼠皮下模型為基於皮下發炎特徵具有相似性的相關模型。接受初始2H7調配物之大鼠之發炎反應與在獼猴中觀察到之發炎反應一致(參見實例1)。在用2H7注射之大鼠皮膚之切片中，人類免疫球蛋白之免疫組織化學染色呈陽性，說明抗體存在或保持於發炎區域中，論證了測試物品

之沈澱引起注射部位發炎。

如下執行活體內大鼠篩檢檢定：

皮下投與各測試或對照調配物(0.25 ml)。給藥後72小時對動物進行屍體剖檢。將注射部位處之皮膚切片橫切且固定於福馬林(formalin)中，且藉由組織學測定測試賦形劑對降低發炎之影響。如下對組織學切片賦予發炎計分：

+/-：最少/輕微發炎

1：輕度發炎

2：中度

3：重度

藉由病理學測定肉芽腫之存在。將注射部位之組織切片，染色且在光學顯微鏡下檢視肉芽腫之存在或不存在。

活體內大鼠模型之接受標準為：(1)發炎與 rhuMAb CD11a(陰性對照)類似，及(2)注射部位處不存在肉芽腫。

實例 4

界面活性劑減少 2H7 聚集之能力

界面活性劑通常用於阻滯巨分子聚集。使用實例 2 中所述之活體外模型評估界面活性劑減少 2H7 聚集及絮凝之能力。所測試之界面活性劑涵蓋一系列親水-親脂平衡值(HLB)。相對於初始 2H7 調配物，添加聚山梨醇酯 20、泊洛沙姆及斯潘(Span) 20 及 80 界面活性劑並未顯著改良 2H7 釋放。對於聚山梨醇酯 80，觀察到活體外 2H7 釋放之適度改良，但對於所測試之任何其他界面活性劑，未觀察到 2H7 釋放之顯著改良(參見表 4)。然而，在所有情況下觀察

到透析袋內之絮凝(表4)。因此，雖然傳統上使用界面活性劑來減少蛋白質聚集，但是顯示其在活體外模型中不能有效阻滯2H7聚集。

表 4

界面活性劑+ 2H7	所釋放之蛋白質% (T=48小時)	HLB	透析袋中之絮凝
2H7初始(對照)	31	N/A	是
10%泊洛沙姆	15	>28	是
0.2%聚山梨醇酯80	59	15	是
0.05%斯潘20	24	8.6	是
0.02%斯潘20	24	8.6	是
0.05%斯潘80	33	4.3	是
0.02%斯潘80	33	4.3	是
rhuMAb CD11a(對照)	100	N/A	否

實例 5

PVP對2H7聚集之影響

在活體外模型中測試PVP對於2H7聚集之影響。所用物質為：

- BASF Kollidon 30(重量平均分子量44 K-54 K道爾頓)
- BASF Kollidon 17 PF(重量平均分子量7 K-11 K道爾頓)
- BASF Kollidon 12 PF(重量平均分子量2 K-3 K道爾頓)
- BASF Kollidon 90F(重量平均分子量1 M-1.5 M道爾頓)
- 系列聚乙烯吡咯啉酮K-15(可與BASF Kollidon 17 PF相比較)

在活體外模型中，添加低分子量PVP(重量平均分子量9千道爾頓)顯著改良2H7釋放(圖4)。透析袋中之大部分2H7得到釋放且釋放量可與rhuMAb CD11a對照相當。在透析袋中未觀察到絮凝且在整個研究過程中，釋放介質保持澄

清。此皆說明低分子量PVP抑制2H7於生理條件下之聚集。所用PVP之分子量至關重要。添加高分子量PVP(重量平均分子量1.2百萬道爾頓)導致釋入經修飾之PBS溶液中 之2H7減少及透析袋內之明顯絮凝(圖4)。

基於此等滿意結果，在活體外透析模型中評估1%至20%低分子量PVP(重量平均分子量9 K道爾頓)之濃度範圍。添加5%至20%低分子量PVP(重量平均分子量9 K道爾頓)可有效抑制2H7聚集。使用5%至20% PVP所釋放之2H7之百分率類似於rhuMAb CD11a對照之彼百分率(圖5)。在整個研究過程中，釋放介質保持澄清且亦消除蛋白質之絮凝。低於3%之低分子量PVP濃度導致類似2H7釋放速率，但經修飾之PBS釋放溶液變得愈加混濁，說明此等PVP濃度太低而不能抑制2H7聚集。表5中顯示蛋白質釋放百分率、釋放介質混濁度及絮凝之存在的概述。

表 5

對照	時間 (小時)	所釋放之蛋 白質累積%	釋放介質之混濁度 <i>OD 350 nm</i>	透析袋中 之絮凝
rhuMAb CD11a	0	0	0.001	否
	48	83	0.03	否
2H7初始	0	0	0.02	否
	48	28	0.37	是
2H7+5%低分子量 PVP	0	0	0.007	否
	48	76	0.14	否
2H7+10%低分子量 PVP	0	0	0.009	否
	48	73	0.14	否
2H7+20%低分子量 PVP	0	0	0.01	否
	48	75	0.15	否
2H7+10%高分子量 PVP	0	0	0.005	否
	48	20	0.07	是

亦在活體外系統中評估PVP之其他分子量範圍(圖6)。添

加分子量為2 K至54 K之10% PVP可有效減少2H7聚集，如依據釋入介質中之2H7百分率增加(相對於對照)所證明。與初始2H7調配物對照類似，大分子量PVP(1百萬至1.5百萬道爾頓)可增大2H7聚集。

實例6

PVP對活體內大鼠皮下模型之發炎的影響

在活體外研究中顯示顯著改良之含有低分子量PVP(平均分子量9千道爾頓)之抗體調配物隨後在活體內大鼠皮下模型中測試。此研究之目標為判定消除2H7在活體外生理條件下聚集是否會轉化為注射部位處之發炎減少。動物模型之成功標準為：(1)相對於rhuMAb CD11a研究對照，測試調配物可類似地減少發炎，及(2)注射部位處無肉芽腫。

各測試調配物之組織病理學結果之概述呈現於表6中。陰性對照rhuMAb CD11a及不含有蛋白質之20% PVP媒劑誘發最少皮下發炎。注射初始150 mg/ml 2H7調配物用作陽性對照且導致注射部位處之中度至重度發炎(2-3+)。將大於5% PVP(重量平均分子量9千道爾頓)添加至2H7中可減少發炎。10% PVP以及100 mg/mL 2H7之最佳濃度可使注射部位處之發炎減少至陰性對照水準(+/-)(成功標準)。發炎增加與2H7蛋白質濃度增加相關。將20% PVP添加至較高濃度之2H7(150 mg/mL)中可使發炎顯著減少至輕度(1+)。在任何測試動物中均未觀察到肉芽腫。

表 6

調配物	動物	組織學記分	註解
150 mg/mL rhuMAb CD11a	1	+/-	濾泡毛囊炎
	2	+/-	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 5% PVP	1	2-3+	病灶性廣泛發炎伴隨壞死
	2	2-3+	
	3	2-3+	
100 mg/mL 2H7 + 10% PVP	1	+/-	無註解
	2	+/-	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 20% PVP	1	1+	病灶性廣泛發炎
	2	1+	
	3	1+	
150 mg/mL 2H7 + 10% PVP	1	1+	病灶性廣泛發炎(2/3大鼠)
	2	1+	
	3	+/-	
150 mg/mL 2H7 + 20% PVP	1	1+	病灶性廣泛發炎
	2	1+	
	3	1+	
150 mg/mL 2H7初始調配物	1	2-3+	病灶性廣泛發炎伴隨壞死
	2	2-3+	
	3	2-3+	
20% PVP媒劑	1	+/-	無註解
	2	+/-	
	3	+/-	

發炎評級計分：

+/- = 最少 / 輕微

1+ = 輕度

2+ = 中度

3+ = 重度

結論：

總而言之，添加5%至20%聚乙炔吡咯啉酮(重量平均分子量為2 K至54 K道爾頓)可有效地顯著減少2H7於生理條件下之聚集且消除2H7絮凝。基於PVP之歷史使用，PVP與2H7所產生之結果出乎意外，且因此說明該方法之新穎性

及創新步驟。亦在活體外模型中評估傳統上用於減少蛋白質聚集之界面活性劑，但皆不能有效地阻滯2H7聚集。

在此環境中減少2H7聚集最終可顯著減少經2H7注射之動物之注射部位處之發炎。包括10%低分子量PVP之2H7調配物可使重度(初始2H7)發炎減少至最少至輕微發炎。減少蛋白質在此等條件下聚集之能力可轉化為生物可用性增加。最後，本發明人已成功地開發且證明活體外透析模型測量賦形劑減少蛋白質聚集之能力的效用。

參考文獻

本申請案中所引用之參考文獻(包括專利、公開申請案及其他公開案)以引用的方式併入本文中。

除非另外說明，否則可採用此項技術之技能範圍內的習知分子生物學技術及其類似技術實施本發明。該等技術已充分說明於參考文獻中。參見例如 **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, (J. Sambrook 等人，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)；**Current Protocols in Molecular Biology** (F. Ausubel 等人編，1987更新)；**Essential Molecular Biology** (T. Brown 編，IRL Press 1991)；**Gene Expression Technology** (Goeddel 編，Academic Press 1991)；**Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes** (A. Bothwell 等人編，Bartlett Publ. 1990)；**Gene Transfer and Expression** (M. Kriegler, Stockton Press 1990)；**Recombinant DNA Methodology II** (R. Wu 等人編，Academic Press 1995)；

PCR: A Practical Approach (M. McPherson 等人, IRL Press at Oxford University Press 1991); **Oligonucleotide Synthesis** (M. Gait編, 1984); **Cell Culture for Biochemists** (R. Adams編, Elsevier Science Publishers 1990); **Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells** (J. Miller & M. Calos編, 1987); **Mammalian Cell Biotechnology** (M. Butler編, 1991); **Animal Cell Culture** (J. Pollard等人編, Humana Press 1990); **Culture of Animal Cells**, 第2版 (R. Freshney等人編, Alan R. Liss 1987); **Flow Cytometry and Sorting** (M. Melamed等人編, Wiley-Liss 1990); 系列叢書 **Methods in Enzymology** (Academic Press, Inc.); Wirth M.及 Hauser H. (1993); **Immunochemistry in Practice**, 第3版, A. Johnstone & R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; **Techniques in Immunocytochemistry**, (G. Bullock及 P. Petrusz編, Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); **Handbook of Experimental Immunology**, (D. Weir及 C. Blackwell編); **Current Protocols in Immunology** (J. Coligan等人編 1991); **Immunoassay** (E. P. Diamandis及 T.K. Christopoulos編, Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice** (第2版) Academic Press, New York; Ed Harlow及 David Lane, **Antibodies A laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988;

Antibody Engineering，第2版(C. Borrebaeck編，Oxford University Press, 1995)；及系列叢書Annual Review of Immunology；系列叢書Advances in Immunology。

【圖式簡單說明】

圖1顯示2H7在生理條件下之聚集。在37°C下，150 mg/ml之2H7於PBS中透析兩天；

圖2顯示用於評估賦形劑對2H7在生理條件下之聚集之影響的活體外透析模型。在37°C下，將220 ml經修飾之PBS溶液(167 mM鈉、140 mM氯化物、17 mM磷酸鹽、4 mM鉀)填充於250 ml玻璃瓶中。將6 cm長度之12 mm透析管在一端夾緊，以約1 ml試樣填充，移除過量空氣，且管之另一端夾緊於封口中。將瓶置於37°C下恆定攪拌。瓶之要素如下：

1為2H7溶液；2為透析膜(1 M道爾頓MWCO)；3為夾緊裝置；4為經修飾之PBS溶液；5為攪拌棒；

圖3顯示活體外透析模型中之對照物之行為。2H7與rhuMab CD11a均於圖2中所示之模型中測試。在2.5、6、12、24、33及48小時時點測量釋入PBS溶液中之蛋白質之累積百分數；

圖4顯示在活體外模型中，低分子量PVP(重量平均分子量9千道爾頓)及高分子量PVP(重量平均分子量1.2百萬道爾頓)對2H7釋放的影响；

圖5顯示在活體外模型中，5%-20%低分子量PVP(重量平均分子量9千道爾頓)對2H7釋放的影响；及

圖 6 顯示在活體外模型中，分子量範圍為 2 K 至 1.5 M 之 PVP 對 2H7 釋放之有效性。

【主要元件符號說明】

- 1 2H7 溶液
- 2 透析膜 (1 M 道爾頓 MWCO)
- 3 夾緊裝置
- 4 經修飾之 PBS 溶液
- 5 攪拌棒

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 減少巨分子於生理條件下聚集之方法及調配物

<130> P2390R1

<140> 098138928

<141> 2009-11-16

<150> US 61/115,439

<151> 2008-11-17

<160> 15

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成

<400> 1

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

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

Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro
			35						40					45

Leu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
			50						55					60

Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
			65						70					75

Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
			80						85					90

Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
			95						100					105

Lys Arg

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成

<400> 2

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

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

Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
			35						40					45

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

Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
			65						70					75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
			80						85					90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成

<400> 3

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

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

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成

<400> 4

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

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

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 5
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser

<210> 6
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210
 Gly Glu Cys

<210> 7
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 8
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450
 Gly Lys

<210> 9
 <211> 213

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列係合成

<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
110 115 120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125 130 135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
170 175 180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
185 190 195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
200 205 210
Gly Glu Cys

<210> 10
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列係合成

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	95	100	105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	110	115	120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	305	310	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	320	325	330
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	335	340	345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	350	355	360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	365	370	375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	380	385	390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	395	400	405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	410	415	420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	425	430	435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	440	445	450

Gly Lys

<210> 11
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 12
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 13
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成

<400> 14

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

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

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 15
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列係合成

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450
 Gly Lys

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98138928

A61K47/30 (2006.01)

※ 申請日：98.11.16

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P37/00 (2006.01)

減少巨分子於生理條件下聚集之方法及調配物

METHOD AND FORMULATION FOR REDUCING AGGREGATION OF
A MACROMOLECULE UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

二、中文發明摘要：

本發明提供一種藉由添加5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓(daltons)的聚乙炔吡咯啉酮(PVP)來減少諸如蛋白質之巨大分子在生理條件下聚集且抑制其絮凝的方法。本發明另外提供一種在皮下投與巨大分子期間將注射部位之發炎減至最小的方法。在其他態樣中，本發明提供用於皮下投與巨大分子之醫藥調配物，及治療CD20陽性癌症或自體免疫疾病之方法，其包含以本發明之醫藥調配物投與人類化抗CD20抗體。本發明另外提供一種評估賦形劑減少抗體或其他巨大分子在生理條件下聚集之能力的活體外透析方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides a method for reducing aggregation and inhibiting flocculation of a large macromolecule, such as a protein, under physiological conditions, by the addition of 5% to 20% polyvinylpyrrolidone (PVP) with a molecular weight range of 2000 to 54,000 daltons. The invention further provides a method to minimize inflammation at the injection site during subcutaneous administration of a large macromolecule. In further aspects, the invention provides pharmaceutical formulations for subcutaneous administration of a large macromolecule, and methods of treating a CD20 positive cancer or an autoimmune disease, comprising administering a humanized anti-CD20 antibody in a pharmaceutical formulation of the invention. The invention further provides an *in vitro* dialysis method to evaluate the ability of an excipient to reduce aggregation of an antibody or other large macromolecule under physiological conditions.

七、申請專利範圍：

1. 一種用於皮下投與巨分子之醫藥調配物，其包含10 mg/ml至200 mg/ml濃度範圍之巨分子及5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓(daltons)之聚乙烯吡咯啉酮(PVP)。
2. 如請求項1之調配物，其中該巨分子為蛋白質。
3. 如請求項2之調配物，其中該蛋白質為抗體。
4. 如請求項3之調配物，其中該抗體為治療性抗體。
5. 如請求項3之調配物，其中該抗體為診斷性抗體。
6. 如請求項3之調配物，其中該抗體為抗CD20抗體。
7. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含如表1中所示之抗體變異體A、B、C、D、F、G、H或I。
8. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含選自由SEQ ID NO:1-15組成之群之胺基酸序列。
9. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含輕鏈可變域SEQ ID NO:1及重鏈可變域SEQ ID NO:2。
10. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含輕鏈可變域SEQ ID NO:3及重鏈可變域SEQ ID NO:4。
11. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含輕鏈可變域SEQ ID NO:3及重鏈可變域SEQ ID NO:5。
12. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:6及全長重鏈SEQ ID NO:7。
13. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:6及全長重鏈SEQ ID NO:15。

14. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:10。
15. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:11。
16. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:12。
17. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:13。
18. 如請求項6之調配物，其中該抗體包含全長輕鏈SEQ ID NO:9及全長重鏈SEQ ID NO:14。
19. 如請求項3之調配物，其中該抗體以30 mg/ml至150 mg/ml之濃度範圍存在。
20. 如請求項3之調配物，其中該抗體以100 mg/ml至150 mg/ml之濃度範圍存在。
21. 如請求項1之調配物，其中PVP之濃度為10%。
22. 如請求項1之調配物，其中PVP之分子量範圍為7000-11,000道爾頓。
23. 如請求項3之調配物，其包含100 mg/ml之人類化2H7抗體及10%的分子量範圍7000-11,000道爾頓之PVP。
24. 如請求項23之調配物，其中該人類化2H7抗體包含如表1中所示之抗體變異體A、B、C、D、F、G、H或I。
25. 如請求項23之調配物，其另外包含30 mM乙酸鈉；5%海藻糖二水合物；及0.03%聚山梨醇酯20，pH 5.3。
26. 如請求項25之調配物，其中該人類化2H7抗體包含如表1

中所示之抗體變異體A、B、C、D、F、G、H或I。

27. 如請求項1之調配物，其藉由向含有該巨分子之調配物中添加5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓之聚乙烯吡咯啉酮(PVP)而使皮下投與該巨分子期間注射部位之發炎減至最小。
28. 一種醫藥調配物用於製造供治療CD20陽性B細胞癌症之藥物的用途，其中該調配物包含治療有效量之表1之人類化2H7抗體及5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓之聚乙烯吡咯啉酮(PVP)。
29. 如請求項28之用途，其中該CD20陽性B細胞癌症為B細胞淋巴瘤或白血病。
30. 如請求項29之用途，其中該CD20陽性B細胞癌症係選自由以下組成之群：非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma；NHL)、復發惰性(indolent) NHL及利妥昔單抗(rituximab)難治性惰性NHL、淋巴細胞為主型(predominant)霍奇金氏疾病(LPHD)、小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)及慢性淋巴細胞白血病(CLL)。
31. 如請求項29之用途，其中該人類化2H7抗體為表1之變異體A、B、C、D或H。
32. 一種醫藥調配物用於製造供治療自體免疫疾病之藥物的用途，其中該調配物包含治療有效量之表1之人類化2H7抗體及5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓之聚乙烯吡咯啉酮(PVP)。
33. 如請求項32之用途，其中該自體免疫疾病係選自由以下

組成之群：類風濕性關節炎(RA)及幼年型類風濕性關節炎，包括甲胺喋呤(methotrexate)(Mtx)反應不足者(inadequate responders)及TNF α 拮抗劑反應不足者；全身性紅斑狼瘡(SLE)，包括狼瘡腎炎；多發性硬化(MS)，包括復發緩解型多發性硬化(RRMS)；華格納氏疾病(Wegener's disease)；發炎性腸道疾病；潰瘍性結腸炎；特發性血小板減少性紫癜(ITP)；血栓性血小板減少性紫癜(TTP)；自體免疫性血小板減少症；多發性硬化；牛皮癬；IgA腎病；IgM多神經病變；重症肌無力；ANCA相關血管炎；糖尿病；雷諾氏症候群(Reynaud's syndrome)；休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)；視神經脊髓炎(NMO)；及絲球體腎炎。

34. 如請求項33之用途，其中該人類化2H7抗體為表1之變異體A、B、C、D或H。
35. 一種使注射於患者注射部位之水性皮下調配物中抗體之溶解改良或維持或沈澱最少的方法，其包含向該水性皮下調配物中添加5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓之聚乙烯吡咯啶酮(PVP)。
36. 如請求項35之方法，其中該抗體為如表1中所示之人類化抗CD20抗體變異體A、B、C、D、F、G、H或I。
37. 一種增加皮下投與之抗體之生物可用性的方法，其包含向包含該抗體之水性皮下調配物中添加5%至20%的分子量範圍2000至54,000道爾頓之聚乙烯吡咯啶酮(PVP)。
38. 如請求項37之方法，其中該抗體為如表1中所示之人類

化抗CD20抗體變異體A、B、C、D、F、G、H或I。

39. 一種評估賦形劑減少抗體或其他巨分子在生理條件下聚集之能力的活體外透析方法，其包含：

(a) 在37°C下，在恆定攪拌下，有及無該測試賦形劑之該巨分子之調配物相對於經修飾之PBS溶液(167 mM鈉、140 mM氯化物、17 mM磷酸鹽、4 mM鉀)透析；

(b) 移除該經修飾之PBS溶液之試樣；及

(c) 測量該等試樣之混濁度及蛋白質含量，其中與缺乏賦形劑之對照相比，在含有該測試賦形劑之檢定中，該等試樣之蛋白質濃度提高及混濁度降低，說明該測試賦形劑能夠減少該巨分子聚集。

40. 如請求項39之方法，其中該調配物在具有1百萬道爾頓截留分子量(molecular weight cut-off)之透析管中透析。

41. 如請求項39之方法，其中該等試樣之蛋白質濃度及混濁度係使用UV光譜測定法測量。

42. 如請求項39之方法，其另外包含目檢該經修飾之PBS溶液及該透析管內溶液之沈澱，其中與缺乏賦形劑之對照相比，含有該測試賦形劑之透析管中之沈澱減少，說明該測試賦形劑能夠減少該巨分子聚集。

八、圖式：

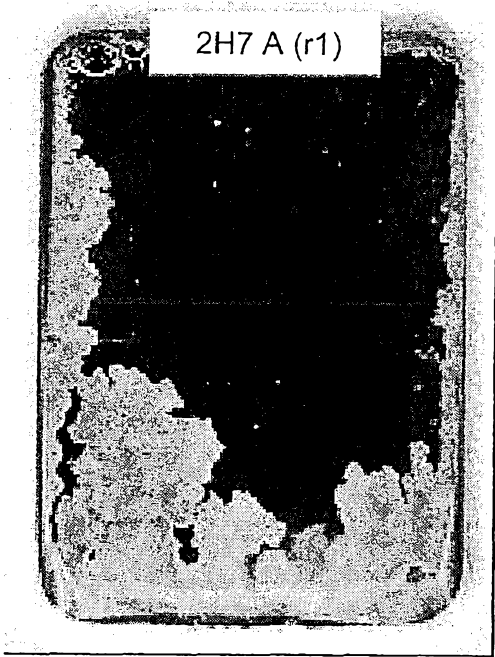


圖 1

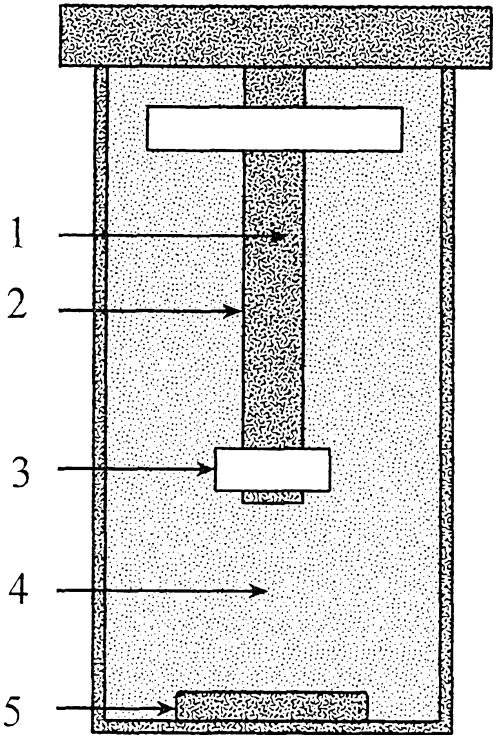


圖 2

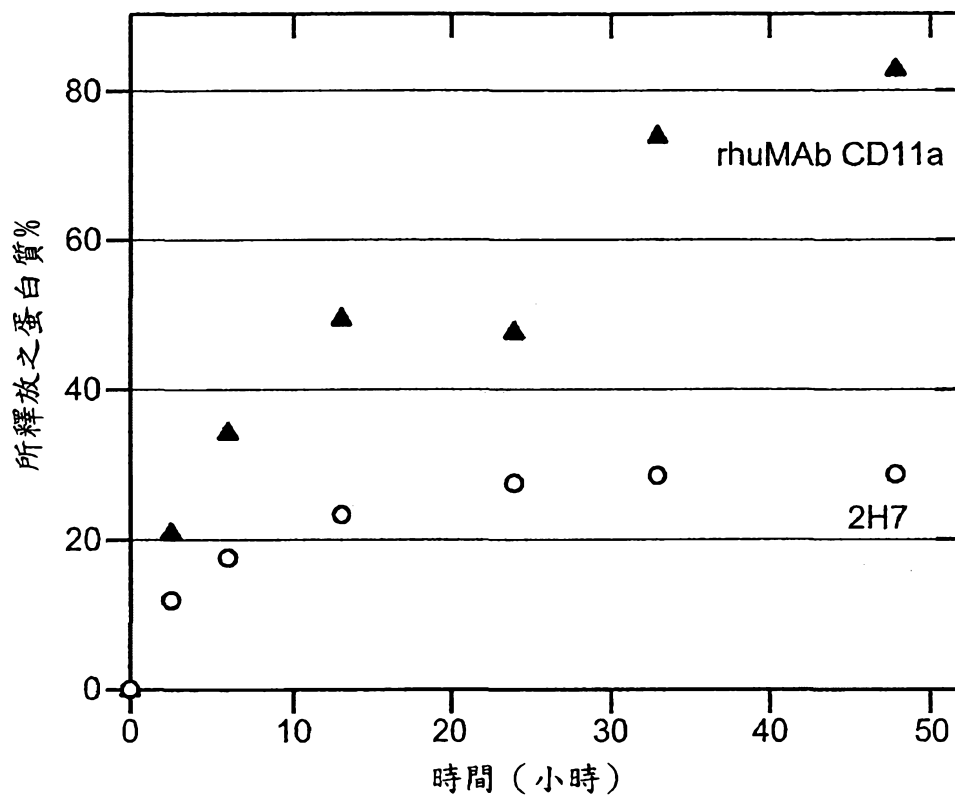


圖3

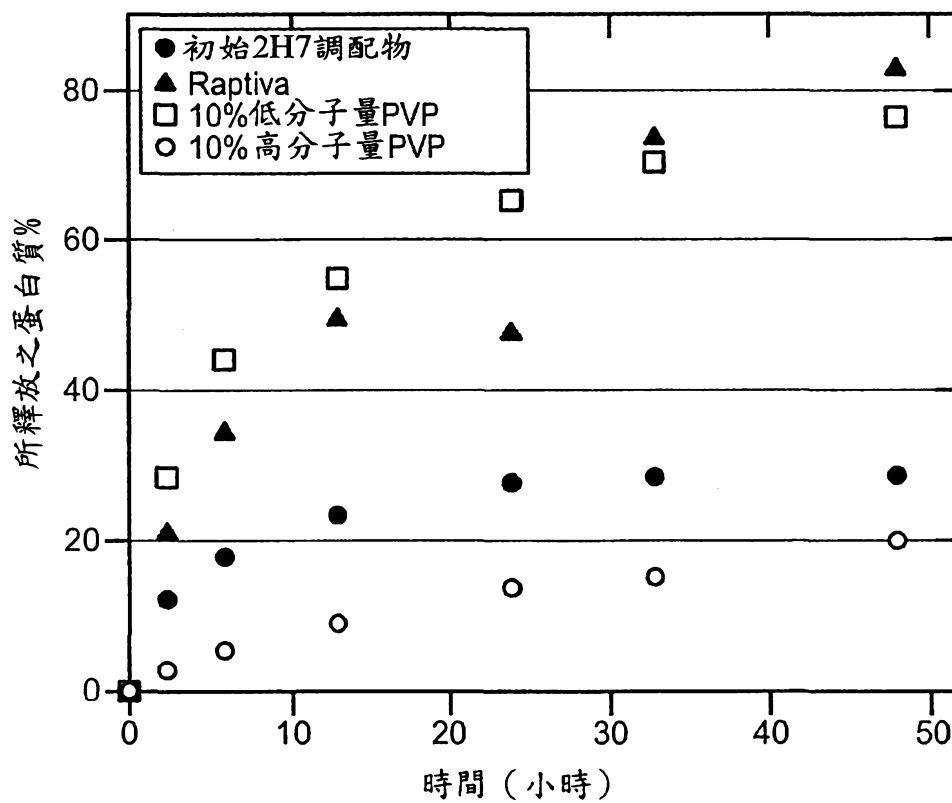


圖4

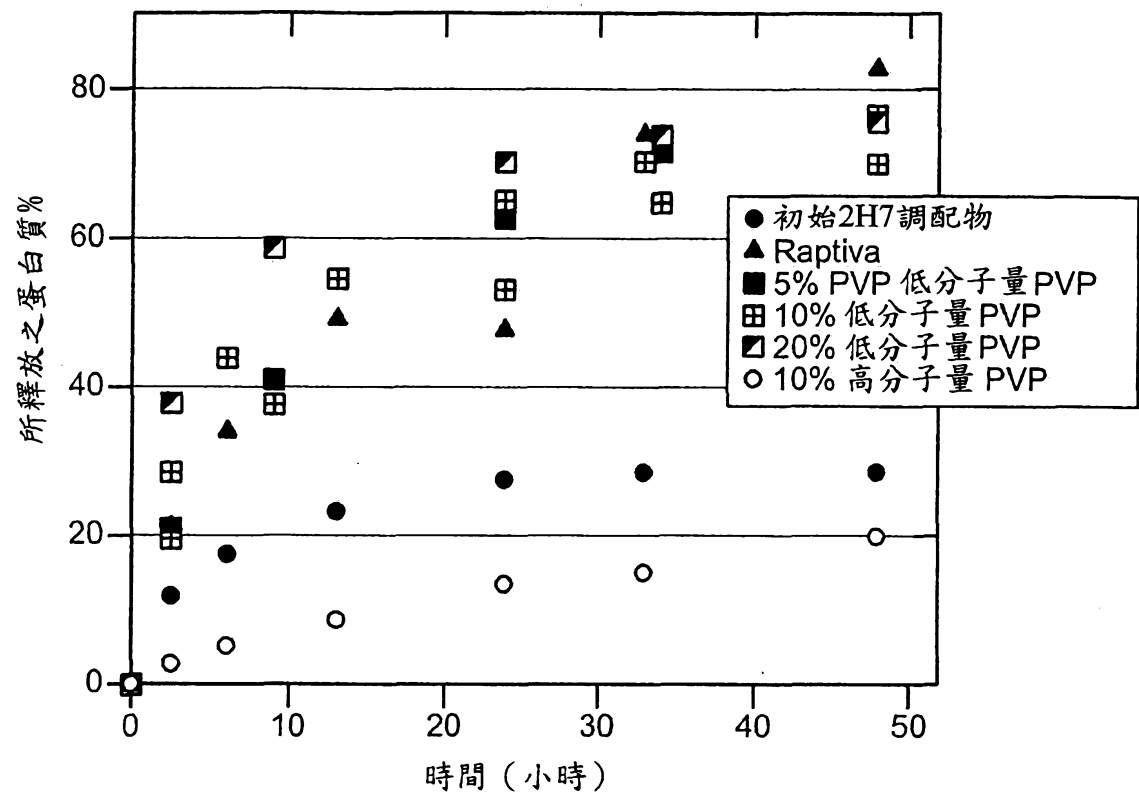


圖5

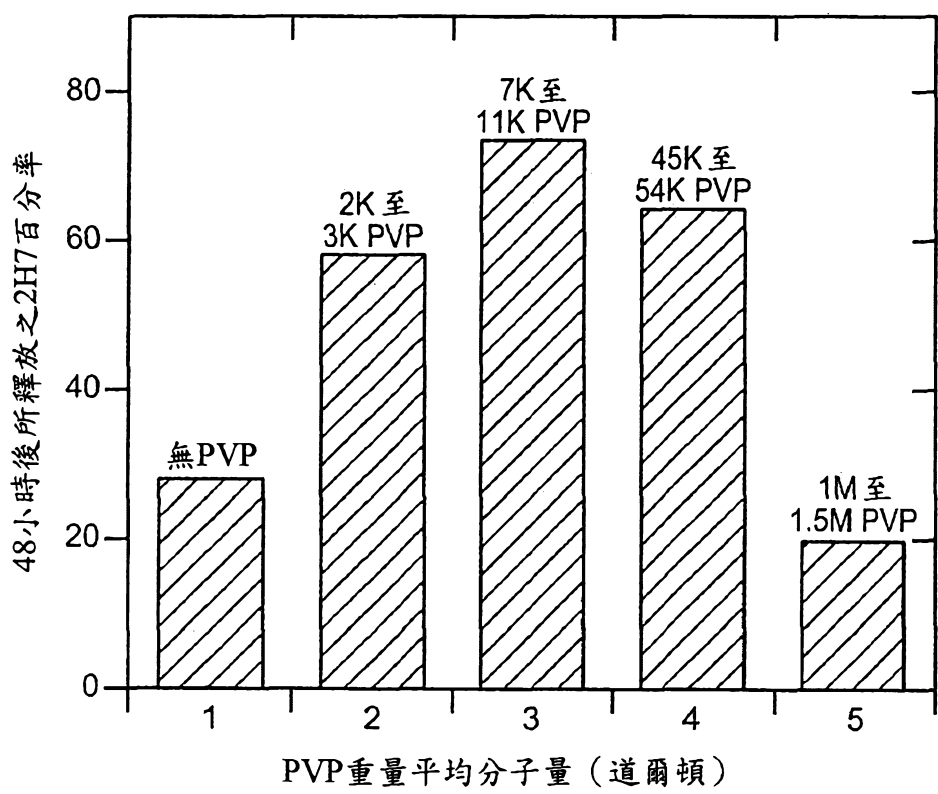


圖6

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- 1 2H7溶液
- 2 透析膜(1 M道爾頓MWCO)
- 3 夾緊裝置
- 4 經修飾之PBS溶液
- 5 攪拌棒

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)