



(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 201422238 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 16 日

---

(21)申請案號：102143567

(22)申請日：中華民國 94 (2005) 年 06 月 02 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

*A61K38/21 (2006.01)*

(30)優先權：2004/06/04 美國

60/576,993

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

美國

(72)發明人：弗絡納 保羅 FROHNA, PAUL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：6 共 102 頁

---

(54)名稱

C D 2 0 抗體於治療多發性硬化症之用途及用於該用途之物品

USE OF CD20 ANTIBODY IN TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS AND AN ARTICLE FOR THE USE

(57)摘要

本發明描述使以 CD20 抗體利用特定劑量療程來治療多發性硬化症(multiple sclerosis ; MS)之方法。本發明亦描述用於該等方法之產品物件。

|           |                                              |      |
|-----------|----------------------------------------------|------|
|           | FR1                                          | CDR1 |
|           | 10 20 30 40                                  |      |
| 2H7       | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC [RASSSVS-YMH] WYQQKP |      |
|           | * * * * *                                    |      |
| hu2H7.v16 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASSSVS-YMH] WYQQKP |      |
|           | * * * * *                                    |      |
| hum KI    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQISNYLA] WYQQKP  |      |
|           | FR2 CDR2 FR3                                 |      |
|           | 50 60 70 80                                  |      |
| 2H7       | GSSPKPWIY [APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA |      |
|           | * * * * *                                    |      |
| hu2H7.v16 | GKAPKPLIY [APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  |      |
|           | * * * *                                      |      |
| hum KI    | GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  |      |
|           | CDR3 FR4                                     |      |
|           | 90 100                                       |      |
| 2H7       | EDAATYYC [QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR             |      |
|           | * * * *                                      |      |
| hu2H7.v16 | EDFATYYC [QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR             |      |
|           | * * * *                                      |      |
| hum KI    | EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR             |      |

圖 1A

|           |                           |                     |                 |
|-----------|---------------------------|---------------------|-----------------|
|           | FR1                       | CDR1                |                 |
|           | 10 20                     | 30 40               |                 |
| 2H7       | QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS | [GYTFSTSYNMH]       | WVKQT           |
|           | *** ** * * * *            |                     | * *             |
| hu2H7.v16 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | [GYTFSTSYNMH]       | WVRQA           |
|           |                           | * * * *             |                 |
| hum III   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | [GFTFSSYAMS]        | WVRQA           |
|           | FR2                       | CDR2                | FR3             |
|           | 50 a 60                   | 70 80               |                 |
| 2H7       | PRQGLEWIG                 | [AIYPGNGDTSYNQKFKG] | KATLTVDKSSSTAYM |
|           | ** *                      |                     | ** ** *         |
| hu2H7.v16 | PGKGLEWVG                 | [AIYPGNGDTSYNQKFKG] | RFTISVDKSKNTLYL |
|           | * * * * *                 |                     | * *             |
| hum III   | PGKGLEWVA                 | [VISGDGGSTYYADSVKG] | RFTISRDNKNTLTL  |
|           | CDR3                      | FR4                 |                 |
|           | abc 90 100abcde 110       |                     |                 |
| 2H7       | QLSSLTSEDSAVYFCAR         | [VVYYSNSYWYFDV]     | WGTGTTVTVSS     |
|           | ** ** *                   |                     | * *             |
| hu2H7.v16 | QMNSLRAEDTAVYYCAR         | [VVYYSNSYWYFDV]     | WGQGLTVTVSS     |
|           |                           | ***** ** *          |                 |
| hum III   | QMNSLRAEDTAVYYCAR         | [GRVGYSLY---DY]     | WGQGLTVTVSS     |

圖 1B



(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 201422238 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 16 日

---

(21)申請案號：102143567

(22)申請日：中華民國 94 (2005) 年 06 月 02 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

*A61K38/21 (2006.01)*

(30)優先權：2004/06/04 美國

60/576,993

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

美國

(72)發明人：弗絡納 保羅 FROHNA, PAUL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：6 共 102 頁

---

(54)名稱

C D 2 0 抗體於治療多發性硬化症之用途及用於該用途之物品

USE OF CD20 ANTIBODY IN TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS AND AN ARTICLE FOR THE USE

(57)摘要

本發明描述使以 CD20 抗體利用特定劑量療程來治療多發性硬化症(multiple sclerosis ; MS)之方法。本發明亦描述用於該等方法之產品物件。

## 發明摘要

※ 申請案號：

102143567 (由94/18185分割)

※ 申請日：

94.6.2

※IPC 分類：A61K 39/395(2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

### 【發明名稱】

CD20抗體於治療多發性硬化症之用途及用於該用途之物品

USE OF CD20 ANTIBODY IN TREATMENT OF MULTIPLE  
SCLEROSIS AND AN ARTICLE FOR THE USE

### 【中文】

本發明描述使以CD20抗體利用特定劑量療程來治療多發性硬化症(multiple sclerosis；MS)之方法。本發明亦描述用於該等方法之產品物件。

### 【英文】

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（1A、1B）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

（無）

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

（無）

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

CD20抗體於治療多發性硬化症之用途及用於該用途之物品

USE OF CD20 ANTIBODY IN TREATMENT OF MULTIPLE  
SCLEROSIS AND AN ARTICLE FOR THE USE

## 【技術領域】

本發明係關於使用特定給藥方案及方式來治療受檢者中之多發性硬化症(MS)之方法，並係關於具有用於該用途的說明書之製造物品。

## 【先前技術】

### 多發性硬化症

多發性硬化症(multiple sclerosis; MS)係人類中樞神經系統(CNS)之發炎性及脫髓鞘退化性疾病。其係世界性疾病，在美國約300,000人患此疾病；其係青少年疾病，70%-80%之患者在20與40歲之間發作(Anderson等人，*Ann Neurology* 31(3):333-6 (1992); Noonan等人，*Neurology* 58:136-8 (2002))。MS係基於臨床過程、磁共振成像(MRI)掃描分析及活組織檢查與屍檢材料的病理分析之多源性病症(Lucchinetti等人，*Ann Neurol* 47:707-17 (2000))。該疾病顯示其自身具有缺失之多種可能性組合，該等缺失包括脊髓、腦幹、腦神經、小腦、大腦及認知症候群。進行性殘疾係大多數MS患者之命運，尤其當包括25年觀察時。在疾病發作的15年內，半數MS患者在行走時需要扶杖。MS係造成青年及中年人患有神經殘疾之主要原因，但直至過去十年來，吾人方才知道有益治療。MS難於診斷係因為非特異性臨床發現，其導致高度結構化診斷標準之形成，該等標準包括由MRI掃描、誘發電位及腦脊髓液(CSF)研究組成之多種技術發展。所有診

斷標準係依賴於不同時間時在中樞白質中出現的分散病變之通用原則且並非由其它病源學(例如感染、血管病症或自體免疫病症)來解釋(McDonald等人, *Ann Neurol* 50:121-7 (2001))。MS具有四種疾病類型：復發-緩解性MS(RRMS; 80%-85%之病例會發作)、原發性進行性MS(PPMS; 10%-15%會發作)、進行性復發性MS(PRMS; 5%會發作)及繼發性進行性MS(SPMS) (Kremenchutzky等人, *Brain* 122 (Pt 10):1941-50 (1999); Confavreux等人, *N Engl J Med* 343 (20): 1430-8 (2000))。據估計, 50%之RRMS患者會在10年內發展成SPMS, 且多達90%之RRMS患者最終會發展成SPMS (Weinshenker等人, *Brain* 112 (Pt 1):133-46 (1989))。

目前, 四類藥物中有六種藥物業已在美國獲准用於治療RRMS, 但沒有藥物獲准用於PPMS。RRMS治療藥物, 包括下列各物：干擾素類、IFN- $\beta$ -1a (REBIF®及AVONEX®)及IFN- $\beta$ -1b(BETASERON®); 乙酸格萊提陌(glatiramer acetate)(COPAXONE®), 其為一種多肽; 整合素(TYSABRI®); 及米托蒽醌(mitoxantrone)(NOVANTRONE®), 其為一種細胞毒素劑。亦已使用獲得不同程度成功之其它藥物, 其包括皮質類固醇、甲胺喋呤(methotrexate)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、硫唑嘌呤及靜脈內(IV)免疫球蛋白。如最近進行之兩個後設分析所建議, 目前獲批准之治療藥物的益處相對適用(約30%)於RRMS之復發率及殘疾預防(Filippini等人, *Lancet* 361:545-52 (2003))。

其它臨床研究已對MS中之其它免疫調節劑進行評估, 該等免疫調節劑包括腫瘤壞死因子- $\alpha$ 抑制劑及修飾肽配位體, 其會加劇而非改良MS(Lenercept Multiple Sclerosis Study Group及the University of British Columbia MS/MRI Neurology 53:457-65 (1999); Bielekova等人, *Nat Med* 2000; 6:1167-75 (2000), 勘誤表出現於Nat Med 6:1412

(2000)中)。

MS病理生理學之主要觀點認為，發炎主要係由CD4<sup>+</sup> Th1 T細胞來調節。基於該理論之治療方法(例如IFN-β及乙酸格萊提陌)會減少(而非完全預防)惡化之發生或殘疾之增加。

如MS診斷標準中包含之CSF寡株帶及增加的鞘內IgG合成所證實，數十年來已默認人類MS中存在體液組份(Siden A. *J Neurol* 221:39-51 (1979); McDonald等人，*Ann Neurol* 50:121-7 (2001); Andersson等人，*Eur J Neurol* 9:243-51 (2002); O'Connor, P. *Neurology* 59:S1-33 (2002))。寡株帶、增加的游離輕鏈及增加的鞘內IgM合成之存在與MS疾病活性相關，並可為更嚴重結果之預報因子(Rudick等人，*Mult Scler* 1:150-5 (1995); Zeman等人，*Acta Cytol* 45:51-9 (2001); Izquierdo等人，*Acta Neurol Scand* 105:158-63 (2002); Wolinsky J. *J Neurol Sci* 206:145-52 (2003); Villar等人，*Ann Neurol* 53:222-6 (2003))。

在患有進行性及復發形式MS之患者的血清中，已偵測到抗髓鞘抗體(髓鞘鹼性蛋白(MBP)及髓鞘寡突細胞糖蛋白(MOG))(Reindl等人，*Brain* 122:2047-56 (1999); Egg等人，*Mult Scler* 7(5):285-9 (2001))。亦已在MS患者之CSF中偵測到抗髓鞘抗體(Reindl等人，*Brain* 122:2047-56 (1999); Egg等人，*Mult Scler* 7(5):285-9 (2001); Andersson等人，*Eur J Neurol* 9:243-51 (2002))。在MS患者中已觀察到額外類型之抗體，例如抗神經結酯脂抗體或抗神經絲抗體(Mata等人，*Mult Scler* 5:379-88 (1999); Sadatipour等人，*Ann Neurol* 44:980-3 (1998))。最近報導顯示，血清抗MOG及抗MBP抗體之存在係用以確定RRMS之臨床獨立脫髓鞘事件擴展的強預報因子(Berger等人，*N Engl J Med* 349:139-45 (2003))。對於對兩種抗體均呈血清反應陽性之患者而言，經受惡化之調整危險率為76.5；而對於僅對抗MOG呈血清

反應陽性之患者而言，其為31.6。

國際病理學協會發現連接至髓鞘之抗體存在於大多數MS患者中，同時在MS病變中亦發現漿細胞及B細胞，其為體液在MS中之作用提供額外證據(Prineas與Wright, *Lab Invest* 38:409-21 (1978); Esiri M. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6:9-21 (1980); Genain等人, *Nat Med* 5:170-5 (1999); Lucchinetti等人, *Ann Neurol* 47:707-17 (2000); Wingerchuk等人, *Lab Invest* 81:263-81 (2001))。可於MS患者之CSF中偵測到B細胞，且相對高比例B細胞之存在可為更嚴重殘疾擴展之前兆(Cepok等人, *Brain* 124 (Pt 11): 2169-76 (2001))。

在患有RRMS或眼球陣攣-肌陣攣症候群之受檢者中，據報導利妥昔單抗(Rituximab)會消耗所有受檢者之外周B細胞，並會減少一些患者中之CSF B細胞數量(Pranzatelli等人, *Neurology* 60 (Suppl1) PO5.128:A395 (2003); Cross等人, "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS"(摘要)*Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis ACTRIMS* 20-1 (2003年10月))。亦參看Cree等人, "Tolerability and Effects of Rituximab "Anti-CD20 Antibody" in Neuromyelitis Optica and Rapidly Worsening Multiple Sclerosis" *Meeting of the Am. Acad. Neurol.*(2004年4月)。

### CD20抗體及其療法

淋巴細胞係造血過程中在骨髓中所產生之多種白血球類型中之一種。存在兩個主要淋巴細胞群：B淋巴細胞(B細胞)及T淋巴細胞(T細胞)。本文特別關注之淋巴細胞為B細胞。

B細胞於骨髓內成熟並離開骨髓，在其細胞表面上表現抗原結合抗體。當初始B細胞首次遇到其膜結合抗體之特異性抗原時，該細胞開始迅速分裂且其後代分化為記憶B細胞及稱為"漿細胞"之效應細

胞。記憶B細胞具有較長壽命且持續表現與原始母細胞具有相同特異性之膜結合抗體。漿細胞不產生膜結合抗體，而產生以可分泌形式存在之抗體。所分泌抗體為體液免疫性之主要效應分子。

CD20抗原(亦稱為人類B淋巴細胞限制性分化抗原，Bp35)係位於前B淋巴細胞及成熟B淋巴細胞上之具有大約35 kD分子量之疏水性跨膜蛋白(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90%以上之B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)上(Anderson等人，*Blood* 63(6): 1424-1433 (1984)))，而在造血幹細胞、祖B細胞、正常漿細胞或其它正常組織上卻並未發現(Tedder等人，*J. Immunol.* 135(2): 973-979 (1985))。CD20會調節活化過程中之用於細胞週期起始及分化之(多個)早期步驟(上述Tedder等人)且有可能充當鈣離子通道(Tedder等人，*J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990))。

若在B細胞淋巴瘤中表現CD20，則該抗原可充當"靶向"該等淋巴瘤之候選物。實質上，可將該靶向作用概述如下：將B細胞之CD20表面抗原的特異性抗體投予至患者。該等抗CD20抗體特異性結合至(表面上)正常及惡性B細胞之CD20抗原；結合至CD20表面抗原之抗體可導致贅生性B細胞之破壞及消耗。另外，可將具有破壞腫瘤之潛力之化學藥劑或放射性標記共軛至抗CD20抗體，以便將該藥劑特異性地"傳遞"至贅生性B細胞。不考慮該方法，主要目標係破壞腫瘤；該特異方法可藉由所用之特定抗CD20抗體來判定，且靶向CD20抗原之可用方法因此可顯著改變。

將利妥昔單抗(RITUXAN®)抗體在基因上設計為針對CD20抗原之嵌合鼠科動物/人類單株抗體。利妥昔單抗係1998年4月7日頒予之美國專利第5,736,137號(Anderson等人)中稱為"C2B8"之抗體。RITUXAN®適用於治療具有復發性或難治癒性低級或濾泡性、CD20-

陽性、B細胞非霍奇金氏淋巴瘤之患者。活體外作用機制研究已證實，RITUXAN®藉由補體依賴性細胞毒性(CDC)而結合人類補體並溶解淋巴B細胞株(Reff等人，*Blood* 83(2):435-445 (1994))。另外，在關於抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之檢定中，RITUXAN®具有顯著活性。最近，RITUXAN®已顯示出在氙化胸苷結合檢定中具有抗增生性效應，並直接誘發細胞凋亡，而其它抗CD19及CD20抗體並不具有該等作用(Maloney等人，*Blood* 88(10):637a (1996))。根據實驗方法亦已觀察到RITUXAN®與化學療法及毒素之間的協同作用。詳言之，RITUXAN®使抗藥物人類B細胞淋巴瘤細胞株對阿黴素、CDDP、VP-16、白喉毒素及蓖麻毒素之細胞毒素效應敏感(Demidem等人，*Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997))。活體內臨床前研究已顯示，RITUXAN®可能係藉由補體及細胞調節過程而消耗食蟹猴之外周血液、淋巴結及骨髓之B細胞(Reff等人，*Blood* 83(2):435-445 (1994))。

在美國，1997年11月批准將利妥昔單抗用於治療具有復發性或難治癒性低級或濾泡性CD20<sup>+</sup> B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)之患者，其劑量為375 mg/m<sup>2</sup>，每週分四次給藥。在2001年4月，美國食品及藥物管理局(FDA)批准用於治療低級NHL之額外申請專利範圍：再治療(每週分四次給藥)及額外給藥方案(每週分八次給藥)。已有300,000個以上之患者曝露於以單一療法或與免疫抑制劑或化學治療藥物組合使用之利妥昔單抗。亦已將利妥昔單抗作為維持療法來治療患者長達2年(Hainsworth等人，*J Clin Oncol* 21:1746-51 (2003)；Hainsworth等人，*J Clin Oncol* 20:4261-7 (2002))。

亦已在多種非惡性自體免疫病症中研究利妥昔單抗，其中B細胞及自身抗體之出現在疾病病理生理中起作用(Edwards等人，*Biochem Soc Trans* 30:824-8 (2002))。已報導，利妥昔單抗可潛在地減輕下列

疾病之症候及症狀：類風濕性關節炎(RA)(Leandro等人，*Ann Rheum Dis.* 61:883-8 (2002); Emery 等人，*Arthritis Rheum* 48(9):S439 (2003))、狼瘡(Eisenberg R. *Arthritis Res Ther* 5:157-9 (2003); Leandro 等人，*Arthritis Rheum* 46:2673-7 (2002))、免疫性血小板減少症(D'Arena等人，*Leuk Lymphoma* 44:561-2 (2003))、自體免疫性貧血症(Zaja 等人，*Haematologica* 87:189-95 (2002))(勘誤表出現在 *Haematologica* 87:336 (2002)中)、自體免疫性神經病(Pestronk等人，*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:485-9 (2003))、副腫瘤眼球陣攣-肌陣攣症候群(Pranzatelli 等人，*Neurology* 60 (Suppl1) PO5.128:A395 (2003))及復發-緩解性多發性硬化症(RRMS)(Cross等人，(摘要)Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis 20-1 (2003))。

已在患有類風濕性關節炎(RA)之患者中進行第II階段研究(WA16291)，其提供關於利妥昔單抗之安全性及功效之48週追蹤資料(Emery等人，*Arthritis Rheum* 48(9):S439 (2003); Szczepanski等人，*Arthritis Rheum* 48(9):S121 (2003))。將總計161個患者平均地隨機分為四個治療小組：甲胺喋呤、單獨利妥昔單抗、利妥昔單抗加甲胺喋呤、利妥昔單抗加環磷醯胺(CTX)。利妥昔單抗之治療方式係於第1天及第15天經靜脈內投予1 g。在大多數RA患者中，大多數患者良好地耐受利妥昔單抗之輸注，而36%之患者在其第一次輸注期間經受至少一種不利事件(與接收安慰劑患者之30%相比)。總之，吾人認為大多數不利事件僅具輕度及中度嚴重性且在所有治療組中具有良好平衡。在48週中，在四個小組中總計出現19例嚴重不利事件，在利妥昔單抗/CTX組中稍微更頻繁。感染之發病率在所有組中得到良好平衡。在該RA患者群中之平均嚴重感染率為每100個患者每年4.66，其低於社會流行病學研究中所報導的RA患者之需要入院之感染率(每

100 個患者每年為 9.57)(Doran 等人，*Arthritis Rheum* 46:2287-93 (2002))。

在少數患有神經病症(包括自體免疫性神經病(Pestronk 等人，*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:485-9 (2003))、眼球陣攣/肌陣攣症候群(Pranzatelli 等人，*Neurology* 60(Suppl1) PO5.128:A395 (2003))及 RRMS(Cross 等人，Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS (摘要)Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis 20-1 (2003)))之患者中，所報導之利妥昔單抗安全性概況類似於在腫瘤學或 RA 中所報導之概況。正在進行之調查員發起實驗(IST)對 RRMS 受檢者進行利妥昔單抗與干擾素 $\beta$ (IFN- $\beta$ )或乙酸格萊提陌之組合(上述 Cross 等人)，其中 10 名經治療受檢者中之 1 人在第一次輸注利妥昔單抗之後經受中度發熱及寒戰，其後進入醫院以進行隔夜觀察，而其它 9 名受檢者在完成四次輸注方案之後並無任何所報導的不利事件。

關於 CD20 抗體之專利及專利公開案包括：美國專利第 5,776,456、5,736,137、5,843,439、6,399,061 及 6,682,734 號與 US 2002/0197255、US 2003/0021781、US 2003/0082172、US 2003/0095963、US 2003/0147885 (Anderson 等人)；美國專利第 6,455,043 號、US 2003/0026804 及 WO 2000/09160(Grillo-Lopez, A.)；WO 2000/27428 (Grillo-Lopez 與 White)；WO 2000/27433 及 US 2004/0213784 (Grillo-Lopez 與 Leonard)；WO 2000/44788 (Braslawsky 等人)；WO 2001/10462(Rastetter, W.)；WO 2001/10461 (Rastetter 與 White)；WO 2001/10460(White 與 Grillo-Lopez)；US 2001/0018041、US 2003/0180292、WO 2001/34194 (Hanna 與 Hariharan)；US 2002/0006404 及 WO 2002/04021 (Hanna 與 Hariharan)；US 2002/0012665 及 WO 2001/74388 (Hanna, N.)；US

2002/0058029(Hanna, N.) ; US 2003/0103971 (Hariharan與Hanna) ; US 2002/0009444及WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.) ; WO 2001/97858 (White, C.) ; US 2002/0128488及WO 2002/34790 (Reff, M.) ; WO 2002/060955 (Braslawsky等人) ; WO 2002/096948 (Braslawsky等人) ; WO 2002/079255 (Reff與Davies) ; 美國專利第6,171,586號及WO 1998/56418 (Lam等人) ; WO 1998/58964(Raju, S.) ; WO 1999/22764 (Raju, S.) ; WO 1999/51642、美國專利第6,194,551號、美國專利第6,242,195號、美國專利第6,528,624號及美國專利第6,538,124號 (Idusogie等人) ; WO 2000/42072 (Presta, L.) ; WO 2000/67796 (Curd等人) ; WO 2001/03734 (Grillo-Lopez等人) ; US 2002/0004587及WO 2001/77342 (Miller與Presta) ; US 2002/0197256 (Grewal, I.) ; US 2003/0157108 (Presta, L.) ; WO 04/056312 (Lowman等人) ; US 2004/0202658及WO 2004/091657 (Benyunes, K.) ; WO 2005/000351 (Chan, A.) ; US 2005/0032130A1 (Beresini等人) ; US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.) ; 美國專利第6,565,827、6,090,365、6,287,537、6,015,542、5,843,398及5,595,721號 (Kaminski等人) ; 美國專利第5,500,362、5,677,180、5,721,108、6,120,767及6,652,852號 (Robinson等人) ; 美國專利第6,410,391號 (Raubitschek等人) ; 美國專利第6,224,866號及WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.) ; WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.) ; US2005/0079174A1 (Barbera-Guillem等人) ; WO 2000/67795 (Goldenberg) ; US 2003/0133930及WO 2000/74718 (Goldenberg與Hansen) ; US 2003/0219433及WO 2003/68821(Hansen等人) ; WO2004/058298(Goldenberg與Hansen) ; WO 2000/76542 (Golay等人) ; WO 2001/72333(Wolin與Rosenblatt) ; 美國專利第6,368,596號 (Ghetie等人) ; 美國專利第6,306,393號及US 2002/0041847 (Goldenberg, D.) ; US 2003/0026801 (Weiner與Hartmann) ; WO

2002/102312 (Engleman, E.) ; US 2003/0068664 (Albitar等人) ; WO 2003/002607 (Leung, S.) ; WO 2003/049694 、 US2002/0009427及US 2003/0185796 (Wolin等人) ; WO 2003/061694(Sing與Siegal) ; US 2003/0219818 (Bohen等人) ; US 2003/0219433及WO 2003/068821 (Hansen等人) ; US 2003/0219818(Bohen等人) ; US2002/0136719 (Shenoy等人) ; WO 2004/032828 (Wahl等人) ; 及WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter) 。 亦參看美國專利第5,849,898號及EP 330,191 (Seed等人) 、 EP332,865A2 (Meyer與Weiss) 、 美國專利第4,861,579號 (Meyer等人) 、 US2001/0056066 (Bugelski等人) 、 WO 1995/03770 (Bhat等人) 、 US 2003/0219433 A1 (Hansen等人) 、 WO 2004/035607 (Teeling等人) 、 US 2004/0093621 (Shitara等人) 、 WO 2004/103404 (Watkins等人) 、 WO 2005/000901 (Tedder等人) 、 US 2005/0025764 (Watkins等人) 、 WO2005/016969及US 2005/0069545 A1 (Carr等人) ; WO 2005/014618 (Chang等人) 。 尤其，該等文獻必定包括多發性硬化症之治療。

關於利妥昔單抗療法之公開案包括：Perotta及Abuel之"Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab" Abstract #3360 *Blood* 10(1)(第1-2部分):第88B頁(1998)；Stashi等人之"Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" *Blood* 98(4):952-957 (2001)；Matthews, R.之"Medical Heretics" *New Scientist* (2001年4月7日)；Leandro等人之"Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis* 61:833-888 (2002)；Leandro等人之"Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001)；Leandro等人

之 "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism* 46(1):2673-2677 (2002) ; Edwards及Cambridge之 "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001) ; Edwards等人之 "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):824-828 (2002) ; Edwards等人之 "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. " *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002) ; Levine及 Pestronk 之 "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999) ; DeVita等人之 "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002) ; Hidashida等人之 "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with Rituximab." , 介紹於 *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology* 中 , Oct 24-29, New Orleans, LA 2002 ; Tuscano, J.之 "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" , 介紹於 *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology* 中, Oct 24-29, New Orleans, LA 2002 ; Specks等人之 "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44(12):2836-2840 (2001) ; Anolik等人之 "B lymphocyte Depletion in the Treatment of Systemic Lupus (SLE): Phase I/II Trial of Rituximab (RITUXAN®) in SLE" *Arthritis And Rheumatism*, 46(9), S289-S289 Abstract 717 (2002年10月) ; 及 Albert等人之 "A Phase I Trial of

Rituximab (Anti-CD20) for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus" Arthritis And Rheumatism, 48(12): 3659-3659, Abstract LB9 (2003年12月)；Martin與Chan之"Pathogenic Roles of B cells in Human Autoimmunity: Insights from the Clinic" *Immunity* 20:517-527 (2004)。

### 【發明內容】

本發明至少部分涉及CD20抗體劑量之選擇，其對患有多發性硬化症(例如PPMS或RRMS)之受檢者提供安全且有效之治療方案。

因此，本發明係關於用於治療受檢者中之多發性硬化症之方法，其包含將有效劑量之CD20抗體投予至受檢者以提供約0.5至4公克之初始抗體曝露，接著提供約0.5至4公克之第二抗體曝露，第二曝露係直至初始曝露之後約16至60週才得以提供，且各抗體曝露係作為一或兩個抗體劑量提供給受檢者。

另外，本發明係關於一種製造物品，該物品包含：(a)包含CD20抗體之容器；及(b)一封裝插入物，其具有用於治療受檢者中之多發性硬化症之說明書，其中該等說明書顯示將一劑量之抗體投予至受檢者，該劑量可有效提供約0.5至4公克之初始抗體曝露，接著提供約0.5至4公克之第二抗體曝露，第二曝露係直至初始曝露之後約16至60週才得以投藥，且各抗體曝露係作為一或兩個抗體劑量提供給受檢者。

### 【圖式簡單說明】

圖1A係比較鼠科動物2H7(SEQ ID NO：1)、人化2H7.v16變異體(SEQ ID NO：2)及人類 $\kappa$ 輕鏈亞族I(SEQ ID NO：3)中之每一者的輕鏈可變區域(V<sub>L</sub>)胺基酸序列之序列比對。2H7及hu2H7.v16之V<sub>L</sub>的CDR係如下所述：CDR1(SEQ ID NO：4)、CDR2(SEQ ID NO：5)及CDR3(SEQ ID NO：6)。

圖1B係比較鼠科動物2H7(SEQ ID NO：7)、人化2H7.v16變異體

(SEQ ID NO : 8)及重鏈亞族III(SEQ ID NO : 9)的人類一致序列中之每一者的重鏈可變區域( $V_H$ )胺基酸序列之序列比對。2H7及hu2H7.v16之 $V_H$ 的CDR係如下所述：CDR1(SEQ ID NO : 10)、CDR2(SEQ ID NO : 11)及CDR3(SEQ ID NO : 12)。

如圖1A及圖1B所示，各鏈中之CDR1、CDR2及CDR3均封在括號內，與構架區域FR1-FR4側接。2H7係指鼠科動物2H7抗體。兩列序列之間的星號表示兩個序列之間的不同位置。殘基編號係根據Kabat等人之*Sequences of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)，而插入物顯示為a、b、c、d及e。

圖2顯示成熟2H7.v16輕鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO : 13)。

圖3顯示成熟2H7.v16重鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO : 14)。

圖4顯示成熟2H7.v31重鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO : 15)。  
2H7.v31之L鏈與2H7.v16之L鏈相同。

圖5顯示成熟2H7.v16L與2H7.v511輕鏈(分別為SEQ ID NOS. 13與16)之比對，其具有Kabat可變區域殘基編號及Eu恆定區域殘基編號。

圖6顯示成熟2H7.v16L與2H7.v511重鏈(分別為SEQ ID NOS. 14與17)之比對，其具有Kabat可變區域殘基編號及Eu恆定區域殘基編號。

## 【實施方式】

### I. 定義

"B細胞"係在骨髓內成熟之淋巴細胞，並包括初始B細胞、記憶B細胞或效應B細胞(漿細胞)。本文之B細胞可為正常或非惡性B細胞。

本文之"B細胞表面標記"或"B細胞表面抗原"係在B細胞表面表現之抗原，其可由結合於其上的抗體靶向。例示性B細胞表面標記包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、

CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及CD86白血球表面標記(為進行說明，參看The Leukocyte Antigen Facts Book，第二版，1997年，Barclay等人編 Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其它B細胞表面標記包括RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA及239287。與哺乳動物之其它非B細胞組織相比，本文尤其相關之B細胞表面標記較佳地表現在B細胞上，且可表現在前驅體B細胞及成熟B細胞上。本文之較佳B細胞表面標記為CD20。

"CD20"抗原或"CD20"係在外周血液或淋巴器官之90%以上B細胞的表面上所發現的約35-kDa、非糖基化磷蛋白。CD20雖存在於正常B細胞及惡性B細胞上，但並不在幹細胞上表現。在文獻中，CD20之其它名稱包括"B淋巴細胞限制性抗原"及"Bp35"。例如，CD20係描述於Clark等人之*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985)中。

本文之"抗體拮抗劑"係在結合至B細胞上的B細胞表面標記之後(例如)藉由減少或預防由B細胞引起的體液反應來破壞或消耗哺乳動物中的B細胞及/或干擾一或多種B細胞功能之抗體。該抗體拮抗劑較佳能消耗以其治療之哺乳動物中的B細胞(意即，減少循環B細胞量)。該消耗作用可經由各種機制來達成，例如由抗體依賴性細胞調節之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)、抑制B細胞增殖及/或誘導B細胞死亡(例如，經由細胞凋亡)。

"由抗體依賴性細胞調節之細胞毒性"及"ADCC"係指由細胞調節之反應，其中表現Fc受體(FcR)之非特異性細胞毒素細胞(例如自然殺傷(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)會識別靶細胞上之結合抗體，並隨後引起靶細胞溶解。用於調節ADCC之初生細胞(NK細胞)僅

表現Fc $\gamma$ RIII，而單核細胞卻表現Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及Fc $\gamma$ RIII。造血細胞上之FcR表現係概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁表3中。爲了分析相關分子的ADCC活性，可進行活體外ADCC檢定，如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號所描述者。適用於該等檢定之效應細胞包括外周血液單核細胞(PBMC)及自然殺傷(NK)細胞。另外或其它，相關分子之ADCC活性可在(例如)動物模型之活體內進行分析，諸如Clynes等人之*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)所揭示之動物模型。

"人類效應細胞"係表現一或多種FcR並執行效應功能之白血球。較佳地，該等細胞至少表現Fc $\gamma$ RIII且執行ADCC效應功能。調節ADCC之人類白血球之實例包括外周血液單核細胞(PBMC)、自然殺傷(NK)細胞、單核細胞、細胞毒素T細胞及嗜中性白血球；其中PBMC及NK細胞爲較佳。

術語"Fc受體"或"FcR"係用於描述結合至抗體之Fc區域之受體。較佳FcR爲自然序列人類FcR。此外，較佳FcR係結合IgG抗體( $\gamma$ 受體)者且包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及Fc $\gamma$ RIII亞類之受體，該等受體包括其對偶基因變異體及其它剪切形式。Fc $\gamma$ RII受體包括Fc $\gamma$ RIIA("活化受體")及Fc $\gamma$ RIIB("抑制受體")，其具有主要在其胞質區域內有所不同之類似胺基酸序列。活化受體Fc $\gamma$ RIIA在其胞質區域內含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體Fc $\gamma$ RIIB在其胞質區域內含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)。(參看Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR係綜述於下列文獻中：Ravetch與Kinet之*Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)；Capel等人之*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人之*J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)。其它FcR(包括彼等將來所識別者)係由本文之術語"FcR"涵蓋。該術語亦包括新生受體、FcRn，其係造成母體IgG轉移至胎兒之<sub>S</sub>

原因 (Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976); 及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

"補體依賴性細胞毒性"或"CDC"係指在補體存在下由分子來溶解目標之能力。補體活化路徑係藉由將補體系統之第一組份(C1q)結合至與同源抗原錯合之分子(例如抗體)來起始。爲了分析補體活化作用,可執行(例如)如 Gazzano-Santoro 等人之 *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)所述之CDC檢定。

"生長抑制"抗體係彼等阻止或減少表現抗體所結合抗原之細胞的增殖作用者。例如,該抗體可阻止或減少活體外及/或活體內B細胞之增殖。

"誘發細胞凋亡"之抗體係彼等誘發(例如)B細胞之漸進式細胞死亡者,如標準細胞凋亡檢定所判定,例如膜聯蛋白V之結合、DNA斷裂、細胞收縮、內質網膨脹、細胞破裂及/或形成膜小泡(稱爲細胞凋亡體)。

本文之術語"抗體"係以最廣泛涵義來使用且特定地涵蓋單株抗體、多株抗體、由至少兩個完整抗體形成之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及展示所要生物活性之抗體片段。

"抗體片段"包含完整抗體之一部分,較佳地包含其抗原結合區域。抗體片段之實例包括:Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及Fv片段;微型雙功能抗體;線性抗體;單鏈抗體分子;及由抗體片段形成之多特異性抗體。

爲達成本文之目的,"完整抗體"係包含重可變區域及輕可變區域及Fc區域者。

"自然抗體"通常係約150,000道爾頓之雜四聚體糖蛋白,其包含兩條相同輕(L)鏈及兩條相同重(H)鏈。雖然在不同免疫球蛋白同型的重鏈中之雙硫鍵數目不同,但各輕鏈均係藉由一共價雙硫鍵連接至重

鏈。各重鏈及輕鏈亦具有規則間隔之鏈內雙硫橋。各重鏈之一端具有一可變區域( $V_H$ )，其後具有多個恆定區域。各輕鏈之一端具有一可變區域( $V_L$ )且另一端具有一恆定區域；輕鏈之恆定區域對準重鏈之第一恆定區域，且輕鏈可變區域對準重鏈之可變區域。據信，特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變區域之間形成界面。

術語"可變"係指下列事實，即可變區域之特定部分在在抗體之間的序列中廣泛不同且用於各特定抗體對其特定抗原之結合作用及特異性。然而，可變性並未均勻分佈在抗體之全部可變區域中。其集中在三個在輕鏈及重鏈可變區域中稱為高變區域之區段中。可變區域之較高度保留部分稱為構架區域(FR)。自然重鏈及輕鏈之可變區域各包含由三個高變區域連接之四個FR(主要採用 $\beta$ 薄片組態)，其形成環連接且在一些情況下形成 $\beta$ 薄片結構之部分。各鏈中之高變區域藉由FR而與另一鏈之高變區域結合在一起(密切接近)，且有助於形成抗體之抗原結合位點(參看Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定區域雖不直接涉及抗體與抗原之結合，但展示各種效應功能，例如該抗體參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

抗體之木瓜蛋白酶消化會產生兩個相同抗原結合片段(稱為"Fab"片段，各具有單一抗原結合位點)及一殘餘"Fc"片段，其名稱反映其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理會產生 $F(ab')_2$ 片段，其具有兩個抗原結合位點且亦可交聯抗原。

"Fv"為最小之抗體片段，其含有完整的抗原識別位點及抗原結合位點。該區域係由一重鏈及一輕鏈可變區域以緊密、非共價結合所形成之二聚體組成。在該組態中，各可變區域之三個高變區域交互作用以界定 $V_H$ - $V_L$ 二聚體表面上之抗原結合位點。總之，六個高變區域賦

予抗體以抗原結合特異性。然而，雖然單一可變區域(或僅包含三個抗原特異性高變區域之Fv的一半)具有比整個結合位點更低之親和力，但其亦具有識別及結合抗原之能力。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定區域及重鏈之第一恆定區域(CH1)。Fab'片段不同於Fab片段，因為其重鏈CH1區域之羧基末端增加少數殘基(包括抗體鉸鏈區之一或多種半胱胺酸)。Fab'-SH在本文中表示Fab'，其中恆定區域之(多個)半胱胺酸殘基具有至少一自由硫醇基。F(ab')<sub>2</sub>抗體片段最初係作為成對Fab'片段而產生，其間具有鉸鏈半胱胺酸。抗體片段之其它化學偶合亦已為吾人所知。

任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)"輕鏈"均可根據其恆定區域之胺基酸序列而被指定為兩種明顯不同類型(稱為卡帕( $\kappa$ )及拉姆達( $\lambda$ ))中之一種。

視重鏈恆定區域之胺基酸序列而定，可將抗體指定為不同種類。存在五種主要種類之完整抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等種類中之幾種可進一步分成亞類(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。對應於不同抗體種類之重鏈恆定區域分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。不同種類免疫球蛋白之次單位結構及三維組態已為吾人所熟知。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>區域，其中該等區域存在於單一多肽鏈中。較佳地，Fv多肽進一步在V<sub>H</sub>與V<sub>L</sub>區域之間包含多肽鏈聯劑，其使scFv能夠形成用於抗原結合之所要結構。關於scFv之綜述可參看*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*中Plückthun，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

術語"微型雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含與同一多肽鏈(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)中的輕鏈可變區域(V<sub>L</sub>)連接

之重鏈可變區域( $V_H$ )。使用過短以致不能使同一鏈上的兩個區域配對之鍵聯劑，藉此迫使該等區域與另一鏈之互補區域配對並產生兩個抗原結合位點。微型雙功能抗體係更完整地描述於(例如)EP 404,097、WO 93/11161及Hollinger等人之*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

如本文所用之術語"單株抗體"係指獲自實質上同類抗體之群之抗體，意即包含該群之個別抗體係相同的及/或結合相同抗原決定部位，而可在單株抗體產生期間出現之可能性變異體除外，該等變異體通常以少量存在。與通常包括對抗不同決定子(抗原決定部位)的不同抗體之多株抗體製劑相比，各單株抗體僅對抗抗原上之單一決定子。除了特異性之外，單株抗體亦係有利的，因為其未受其它免疫球蛋白污染。修飾語"單株"表明該抗體之特徵在於其係獲自實質上同類抗體群，且不應理解為需要藉由任何特定方法來產生該抗體。例如，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由Kohler等人(*Nature*, 256:495 (1975))首先描述之融合瘤方法製得，或可藉由重組DNA方法製得(參看，例如美國專利第4,816,567號)。例如，亦可使用Clackson等人(*Nature*, 352:624-628 (1991))及Marks等人(*J. Mol. Biol*, 222:581-597 (1991))描述之技術自噬菌體抗體庫中分離"單株抗體"。

本文之單株抗體特定地包括"嵌合"抗體(免疫球蛋白)，其中重鏈及/或輕鏈之部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中的相應序列相同或一致，而該(該等)鏈之剩餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中的相應序列以及該等抗體之片段相同或一致，條件係其展示所要生物活性(美國專利第4,816,567號；Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。本文之相關嵌合抗體包括"靈長類動物化"抗體，其包含源自非人類靈長類動物(例如舊大陸猴(Old World Monkey)，例如狒狒、恆河猴或食蟹

猴)之可變區域抗原結合序列及人類恆定區域序列(美國專利第5,693,780號)。

非人類(例如鼠科動物)抗體之"人化"形式係含有源自非人類免疫球蛋白的最小序列之嵌合抗體。人化抗體主要為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中接受者之高變區域殘基係經非人類物種(供體抗體)(例如小鼠、大鼠、家兔或具有所要特異性、親和力及能力之非人類靈長類動物)之高變區域殘基替代。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區域(FR)殘基係由相應非人類殘基替代。此外，人化抗體可包含在接受者抗體或供體抗體中未發現之殘基。進行該等修飾以進一步改進抗體效能。通常，人化抗體將包含至少一個且通常兩個可變區域中之實質上所有可變區域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之彼等高變環，且所有或實質上所有FR均為人類免疫球蛋白序列之彼等FR，而如上所述之(多個)FR取代作用除外。人化抗體亦將視情況包含免疫球蛋白恆定區域中之至少部分，通常包含人類免疫球蛋白之至少部分。進一步詳述見下列文獻：Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

術語"高變區域"在本文中使用时係指抗體之胺基酸殘基，其係造成抗原結合之原因。高變區域包含"互補判定區域"或"CDR"之胺基酸殘基(例如，輕鏈可變區域中之殘基24-34(L1)、50-56(L2)與89-97(L3)及重鏈可變區域中之31-35(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/或彼等來自"高變環"之殘基(例如，輕鏈可變區域中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)與91-96(L3)及重鏈可變區域中之26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)；Chothia與Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917

(1987))。如本文所定義之"構架"或"FR"殘基係除高變區域殘基以外之彼等可變區域殘基。

"裸抗體"係未與異質分子(例如細胞毒素部分或放射性標記)共軛之抗體(如本文所定義)。

結合CD20抗原之抗體的實例包括：目前稱為"利妥昔單抗(Rituximab)"("RITUXAN®")之"C2B8"(美國專利第5,736,137號)；指定為"Y2B8"或"替坦異貝莫單抗(Ibritumomab Tiuxetan)"(ZEVALIN®)之釷-[90]-標記2B8鼠科動物抗體(美國專利第5,736,137號；1993年6月22日以ATCC登記號HB11388寄存之2B8)，其可購自IDEC Pharmaceuticals, Inc.；鼠科動物IgG2a "B1"，亦稱為"托西莫單抗(Tositumomab)"，其係視情況經<sup>131</sup>I標記以產生可購自Corixa之"<sup>131</sup>I-B1"或"碘I131托西莫單抗"抗體(BEXXAR™)(亦參看美國專利第5,595,721)；鼠科動物單株抗體"1F5"(Press等人，*Blood* 69(2):584-591 (1987))及其包括"構架修補"或人化1F5之變異體(WO03/002607, Leung, S.；ATCC寄存號HB-96450)；鼠科動物2H7及嵌合2H7抗體(美國專利第5,677,180號)；人化2H7；huMax-CD20(Genmab, Denmark; WO2004/035607)；AME-133(Applied Molecular Evolution)；A20抗體或其變異體，例如嵌合或人化A20抗體(分別為cA20、hA20)或IMMU-106(US 2003/0219433, Immunomedics)；CD20結合抗體，其包括消耗抗原決定部位之Leu-16、1H4或2B8，其係視情況與IL-2共軛，如US 2005/0069545A1及WO 2005/16969(Carr等人)所述；結合CD22及CD20之雙特異性抗體，例如hLL2xhA20(WO2005/14618, Chang等人)；及可購自International Leukocyte Typing Workshop之單株抗體L27、G28-2、93-1B3、B-C1或NU-B2(Valentine等人，於：*Leukocyte Typing III*(McMichael編，第440頁，Oxford University Press (1987)中)；1H4(Haisma等人，*Blood* 92:184 (1998))；抗CD20金抑素(auristatin)E<sub>5</sub>

共軛物 (Seattle Genetics) ; 抗 CD20-IL2(EMD/Biovation/City of Hope) ; 抗 CD20 Mab 療法 (EpiCyte) ; 及 抗 CD20 抗體 TRU 015(Trubion)。

本文之術語"利妥昔單抗"或"RITUXAN®"係指基因上所設計的用於對抗CD20抗原之嵌合鼠科動物/人類單株抗體且在美國專利第5,736,137號中稱為"C2B8"，其包括保持與CD20結合的能力之其片段。利妥昔單抗可購自 Genentech。

完全為達成本文之目的且除非另有說明，否則"人化2H7"係指結合人類CD20之人化抗體或其抗原結合片段，其中該抗體可有效消耗活體內之靈長類動物B細胞，該抗體在其H鏈可變區域(V<sub>H</sub>)中包含來自抗人類CD20抗體之SEQ ID NO：12之至少一CDR H3序列(圖1B)及實質上人類重鏈亞族III(V<sub>H</sub>III)之人類一致構架(FR)殘基。在一較佳實施例中，該抗體進一步包含SEQ ID NO：10之H鏈CDR H1序列及SEQ ID NO：11之CDR H2序列，且更佳地進一步包含SEQ ID NO：4之L鏈CDR L1序列、SEQ ID NO：5之CDR L2序列、SEQ ID NO：6之CDR L3序列及實質上人類輕鏈κ亞族I(V<sub>κ</sub>I)之人類一致構架(FR)殘基，其中V<sub>H</sub>區域可結合至人類IgG鏈恆定區域，其中該區域可為(例如)IgG1或IgG3。在一較佳實施例中，該抗體包含V<sub>H</sub>序列SEQ ID NO：8(v16，如圖1B所示)，其亦視情況包含V<sub>L</sub>序列SEQ ID NO：2(v16，如圖1A所示)，其可在H鏈中具有D56A及N100A之胺基酸取代且在L鏈(v96)中具有S92A之胺基酸取代。該抗體較佳為完整抗體，其分別包含如圖2及3所示之輕鏈及重鏈胺基酸序列SEQ ID NOS：13及14。在另一較佳實施例中，該抗體為2H7.v31，其分別包含如圖2及4中所示之輕鏈及重鏈胺基酸序列SEQ ID NOS：13及15。本文之抗體可在Fc區域中進一步包含改良ADCC及/或CDC活性之至少一胺基酸取代，例如其中胺基酸取代為S298A/E333A/K334A者，更佳為具有重鏈胺基酸序列SEQ

ID NO : 15(如圖4所示)之2H7.v31。該等抗體中之任何抗體均可在Fc區域中進一步包含降低CDC活性之至少一胺基酸取代，例如至少包含取代K322A。參看美國專利第6,528,624B1號(Idusogie等人)。

較佳之人化2H7為完整抗體或抗體片段，其包含可變輕鏈序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIY  
APSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTF  
GQGTEVEIKR(SEQ ID NO : 2) ;

及可變重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNHWVRQAPGKGLE  
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTA  
VYYCARWYYSNSYWFYD VWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 8)。

其中人化2H7抗體為完整抗體，其較佳包含輕鏈胺基酸序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIY  
APSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTF  
GQGTEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYA  
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO : 13) ;

及重鏈胺基酸序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNHWVRQAPGKGLE  
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTA  
VYYCARWYYSNSYWFYD VWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDICKVEPKSCDKTHTCPPCP  
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG S

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 14)

或重鏈胺基酸序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE  
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTA  
VYYCARWYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS  
NKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQIDNO : 15)。

在本發明之較佳實施例中，基於2H7版本16之變異體可變區域將具有v16之胺基酸序列，而下表所示之胺基酸取代之位置除外。除非另有說明，否則2H7變異體將具有與v16相同之輕鏈。

| 2H7<br>版本 | 重鏈(V <sub>H</sub> )<br>變化 | 輕鏈(V <sub>L</sub> )<br>變化 | Fc變化                              |
|-----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 31        | -                         | -                         | S298A, E333A, K334A               |
| 96        | D56A, N100A               | S92A                      |                                   |
| 114       | D56A, N10                 | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A               |
| 115       | D56A, N100A               | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A, E356D, M358L |

"經分離"抗體係已經識別且自天然環境之組份中分離及/或回收者。其天然環境之污染物組份係將會干擾抗體之診斷或治療用途之材料，且可包括酶類、激素類及其它蛋白或非蛋白溶質。在較佳實施例中，該抗體將純化至(1)如Lowry方法所測定，95重量%以上之抗體且

最佳地99重量%以上之抗體，(2)足以藉由使用旋轉杯式定序儀來獲得N-末端或內部胺基酸序列的至少15個殘基之程度，或(3)在還原或非還原條件下使用庫馬斯藍(Coomassie)或較佳地銀染色由SDS-PAGE來達到均質性。經分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體，因為將不存在抗體天然環境之至少一組份。然而，經分離之抗體通常將藉由至少一純化步驟來製備。

本文之"受檢者"為人類受檢者。通常，受檢者符合多發性硬化症之治療條件。為達成本文之目的，合格受檢者係正在經受、已經受或可能經受多發性硬化症之一或多種症候、症狀或其它指標者；已診斷為多發性硬化症者，例如，無論最近經診斷("新發作"MS)者、先前診斷為新復發或惡化者、先前經診斷者及未發作者等；及/或具有形成多發性硬化症之危險者。可視情況將患有多發性硬化症者或具有其危險者識別為已對血清、腦脊髓液(CSF)及/或MS病變中之高含量CD20陽性B細胞進行篩選及/或使用偵測自身抗體的檢定進行篩選、定性且較佳地定量進行分析者。該等與多發性硬化症有關之例示性自身抗體包括抗髓鞘鹼性蛋白(MBP)、抗髓鞘寡突細胞糖蛋白(MOG)、抗神經結酯脂及/或抗神經絲抗體。該等自身抗體可在受檢者之血清、腦脊髓液(CSF)及/或MS病變中加以偵測。本文之自身抗體或B細胞含量"增高"意謂該等自身抗體或B細胞之(該等)含量顯著地超過無MS個體中之(多個)含量。

本文之受檢者"治療"係指治療性治療及預防性措施。彼等需要治療者包括彼等已患有多發性硬化症者及彼等欲預防多發性硬化症者。因此，受檢者可經診斷為患有多發性硬化症或可易受或易患多發性硬化症。

MS之"症狀"係受檢者所經受及MS所顯示之任何疾病現象或結構、功能或感覺異常。

"多發性硬化症"係指中樞神經系統之慢性疾病且通常為致殘疾病，其特徵為髓鞘之進行性破壞。存在四種國際上公認的MS形式，即原發性進行性多發性硬化症(PPMS)、復發-緩解性多發性硬化症(RRMS)、繼發性進行性多發性硬化症(SPMS)及進行性復發性多發性硬化症(PRMS)。

"原發性進行性多發性硬化症"或"PPMS"之特徵在於該疾病自其發作時便逐漸擴展，而完全沒有階段性復發及緩解。可存在疾病活動性穩定之時期且可存在良好及不良疾病日或疾病週。PPMS不同於RRMS及SPMS，因為PPMS通常係在三十歲晚期或四十歲早期發作，男子與女子同樣可形成該疾病，且初始疾病活動性通常存在於脊髓而非腦中。PPMS通常轉移至腦中，但對腦部區域之損害可能比RRMS或SPMS更小；例如，患有PPMS之人較少可能形成認知問題。PPMS係在MRI掃描時最少有可能顯示發炎性(鈣增強)病變之MS亞類。該疾病之原發性進行性形式會影響所有患有多發性硬化症之人中的10%至15%。PPMS可根據McDonald等人之*Ann Neurol* 50:121-7 (2001)中之標準來定義。本文治療之PPMS受檢者通常係具有PPMS之可能或確定診斷者。

"復發-緩解性多發性硬化症"或"RRMS"之特徵在於其可在出現新症狀及舊症狀再出現或惡化時復發(亦稱為惡化)。在復發之後為緩解時期，其間病人完全或部分地恢復復發期間所獲得之缺失。復發可持續數天、數週或數月且可緩慢及逐漸或幾乎即刻恢復。大多數呈現MS之人首先診斷為RRMS。雖然已知診斷較早或較晚，但此疾病通常在其二十多歲或三十多歲時發生。兩倍於男子之女子呈現該MS亞類。在復發期間，髓鞘(在中樞神經系統(CNS)白質區域中之神經纖維(神經元)周圍的保護性絕緣鞘)可由身體自身免疫系統在發炎性反應中造成損害。此引起多種神經症狀，其根據CNS損害區域而顯著不同。

在復發之後不久，發炎性反應逐漸消失且CNS中之特殊類型神經膠質細胞(稱為寡突細胞)開始再形成髓鞘－可藉以修復軸突周圍髓鞘之過程。該再形成髓鞘過程可為造成緩解之原因。大約50%之RRMS患者在疾病發作的10年內轉化為SPMS。在30年之後，該數字升至90%。在任一時間，該疾病之復發-緩解形式均佔所有MS病人之約55%。

"繼發性進行性多發性硬化症"或"SPMS"之特徵在於在臨床神經損害穩定擴展時具有或不具有階段性復發及較少緩解及平穩狀態。形成SPMS之人先前已經受一段時間的RRMS，該RRMS可已持續二至四十年或更久。任何階段性復發及緩解均傾向於隨時間變少。自該疾病之繼發性進行性階段發作時起，殘疾開始比其在RRMS期間更快地擴展，儘管該過程在一些個體中亦可相當緩慢。10年之後，50%之RRMS病人將形成SPMS。經過25至30年，該數字將升至90%。SPMS傾向於與比RRMS更低之發炎性病變形成水平相關，而疾病之總負擔持續擴展。在任一時間，SPMS均佔所有多發性硬化症病人之約30%。

"進行性復發性多發性硬化症"係指"PRMS"之特徵在於在臨床神經損害穩定擴展時存在階段性復發及緩解。在復發不久之後存在顯著恢復，而在復發之間存在症狀之逐漸惡化。PRMS會影響所有多發性硬化症病人之約5%。一些神經學家認為PRMS為PPMS之變異。

術語"有效劑量"係指有效預防、改善或治療多發性硬化症之抗體(或其它藥物)之劑量。該有效劑量通常將引起MS症候、症狀或其它指標之改善，例如減少復發率、預防殘疾、減少腦MRI病變之數量及/或體積、改善定時25英尺行走、延長疾病擴展時間(例如使用Expanded Disability Status Scale，EDSS)等。

"抗體曝露"係指在約1-20天之時期內以一或多次所投劑量與本文之抗體接觸或曝露至該抗體。該等劑量可在該曝露時期內一次給予或5

以固定或不規則時間間隔給予。如本文中所詳述，初始及隨後(例如第二或第三次)抗體曝露在時間上交互分開。

如本文所用，用於佐劑療法之術語"免疫抑制劑"係指用作抑制或掩蔽正接受本文治療之哺乳動物的免疫系統之物質。此將包括抑制細胞激素產生、下調或抑制自身抗原表現或掩蔽MHC抗原之物質。該等藥劑之實例包括：2-胺基-6-芳基-5-經取代嘧啶(參看美國專利第4,665,077號)；非類固醇抗發炎藥物(NSAID)；更昔洛韋(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)；糖皮質激素，例如可的松(cortisol)或醛固酮(aldosterone)；抗發炎藥劑，例如環加氧酶抑制劑、5-脂加氧酶抑制劑或白三烯(leukotriene)受體拮抗劑；嘌呤拮抗劑，例如硫唑嘌呤或酶黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil)(MMF)；烷化劑，例如環磷醯胺；溴隱亭(bromocryptine)；達那唑(danazol)；達普松(dapsone)；戊二醛(其掩蔽MHC抗原，如美國專利第4,120,649號所述)；MHC抗原及MHC片段之抗同型抗體；環孢素A；類固醇，諸如皮質類固醇或糖皮質類固醇或糖皮質激素類似物，例如潑尼松(prednisone)、甲潑尼龍(methylprednisolone)及地塞米松(dexamethasone)；諸如甲胺喋呤之二氫葉酸還原酶抑制劑(經口或經皮下)；羥化氯喹；磺胺塞拉金(sulfasalazine)；來氟米特(leflunomide)；細胞激素或細胞激素受體拮抗劑，其包括抗干擾素 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\gamma$ 抗體、抗腫瘤壞死因子- $\alpha$ 抗體(英利昔單抗(infliximab)或阿達木單抗(adalimumab))、抗TNF- $\alpha$ 免疫黏附素(依那西普(etanercept))、抗腫瘤壞死因子- $\beta$ 抗體、抗介白素-2抗體及抗IL-2受體抗體；抗LFA-1抗體，其包括抗CD11a及抗CD18抗體；抗L3T4抗體；異源抗淋巴細胞球蛋白；pan-T抗體，較佳為抗CD3或抗CD4/CD4a抗體；含有LFA-3結合區域之可溶肽(7/26/90公開之WO 90/08187)；鏈激酶；TGF- $\beta$ ；鏈道酶；來自宿主之RNA或DNA；FK506；RS-61443；去氧斯匹胍素

(deoxyspergualin)；雷帕黴素(rapamycin)；T-細胞受體(Cohen等人，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；Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989)；及WO 91/01133)；及T細胞受體抗體(EP 340,109)，例如T10B9。

如本文所用之術語"細胞毒素劑"係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語係用以包括放射性同位素(例如At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>及Lu之放射性同位素)、化學治療劑及毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素)或其片段。

"化學治療劑"係適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括：烷化劑，例如噻替哌(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸酯，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；吡丙啶，例如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米茄多巴(meturedopa)及脲多巴(uredopa)；伸乙亞胺及甲基蜜胺類(methylamelamine)，其包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三乙烯磷醯胺、三乙烯硫磷醯胺及三羥甲基密胺(trimethylolomelamine)；番荔枝素(acetogenin)(尤其泡番荔枝辛(bullatacin)及泡番荔枝辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚蟲素(bryostatin)；考司他汀(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)；隱藻素(cryptophycin)(特別係隱藻素1及隱藻素8)；海兔毒肽(dolastatin)；多卡黴素(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；潘克拉司他汀(pancratistatin)；薩克得汀(sarcodictyin)；斯旁司他汀(spongistatin)；氮芥，例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氯嗪(chlonaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺<sub>5</sub>

(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、鹽酸氧化氮芥、美法侖(melphalan)、諾文比星(novembichin)、苯固醇(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、烏拉莫司汀(uracil mustard)；硝脲，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及蘭尼司汀(ranimustine)；抗生素，例如烯二炔類抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 $\gamma$ II(calicheamicin gammaII)及卡奇黴素歐米伽II (calicheamicin omegaII)(參看，例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186 (1994))；地尼黴素(dynemicin)，其包括地尼黴素A；雙膦酸鹽，例如氯屈膦酸鹽(clodronate)；艾斯博拉黴素(esperamicin)；及新制癌菌素發色團及相關色素蛋白烯二炔抗生素發色團、艾可拉昔黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、奧拉黴素(authramycin)、重氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycins)、放線菌素(cactinomycin)、卡拉比星(carabycin)、卡米諾黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、更生黴素(dactinomycin)、柔紅黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮胺酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、ADRIAMYCIN®阿黴素(doxorubicin)(包括嗎啉基-阿黴素、氘嗎啉基-阿黴素、2-吡咯啉基-阿黴素及去氧阿黴素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、黃膽素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins)(例如絲裂黴素C)、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素、培洛黴素(peplomycin)、波特黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲佐菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他汀

(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，例如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)；葉酸類似物，例如迪諾特寧(denopterin、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，例如氟達拉賓(fludarabine)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，例如安西他賓(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他賓(enocitabine)、氟脫氧尿苷(floxuridine)；雄激素，例如卡普甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺素，例如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充物(folic acid replenisher)，例如複老內酸(frolinic acid)；乙酸葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；愛內拉斯(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；百思特巴斯(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；衣得拉賽(edatraxate)；得法胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吡醌(diaziqune)；愛而佛內辛(elfornithine)；依利乙酸鉍(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂(gallium nitrate)；羥基脲(hydroxyurea)；香菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，例如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蔥醌；冒吡代冒(mopidanmol)；硝胺(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；苯麥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蔥醌(losoxantrone)；足葉草酸(podophyllinic acid)；2-乙醯肼(2-ethylhydrazide)；甲基苄肼(procarbazine)；PSK®多<sup>S</sup>

醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；利索新(rhizoxin)；西佐糖(sizofiran)；鍺螺旋胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴毒素(trichothecenes)(尤其 T-2 毒素、府拉克林(verracurin)A、桿孢菌素 A 及蛇形菌毒素(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；蓋托新(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C")；環磷醯胺；噻替哌(thiotepa)；類毒素(taxoids)，例如 TAXOL® 紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™ 無乙烯化氧脂肪醇、紫杉醇之白蛋白工程奈米微粒調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及 TAXOTERE® 多西他賽(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥(chloranbucil)；GEMZAR® 吉西他賓(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)；巯基嘌呤(mercaptopurine)；甲胺喋呤(methotrexate)；鉑類似物，例如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺(ifosfamide)；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；NAVELBINE® 長春瑞賓(vinorelbine)；米托蒽醌(novantrone)；替尼泊甙(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔毛黴素(daunomycin)；胺基蝶呤(aminopterin)；截瘤達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視色素，例如類視色素酸；卡西他賓(capecitabine)；及上述任何物質的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

在該定義中亦包括：用於調節或抑制激素對腫瘤的作用之抗激素

劑，例如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，其包括(例如)泰莫西芬(tamoxifen)(包括 NOLVADEX® 泰莫西芬)、雷諾昔酚(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基泰莫西芬、曲沃昔芬(troxifene)、基奧昔芬(keoxifene)、LY117018、奧納司酮(onapristone)及 FARESTON-托瑞米芬(toremifene)；抑制酶芳香酶之芳香酶抑制劑，其調節腎上腺中之雌激素產生，例如4(5)-咪唑、胺魯米特(aminoglutethimide)、MEGASE® 乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN® 依西美坦(exemestane)、福美司坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR® 伏羅唑(vorozole)、FEMARA® 來曲唑(letrozole)及 ARIMIDEX® 安美達錠(anastrozole)；及抗雄激素，例如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；及曲沙他賓(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，特別係彼等抑制異常細胞增殖所涉及的訊號路徑中之基因表現者，例如 PKC- $\alpha$ 、Raf 及 H-Ras；疫苗，例如基因治療疫苗，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；及上述任何物質的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

術語"細胞激素"係由一細胞群釋放之蛋白的專業術語，該等蛋白作為細胞間介體作用於另一細胞。該等細胞激素之實例為：淋巴激素類、單核球激素類；介白素類(IL)，例如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15；腫瘤壞死因子，例如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ；及其它多肽因子，其包括LIF及套組配體(KL)。如本文所用，術語細胞激素包括源自天然來源或重組細胞培養物之蛋白及自然序列細胞激素之生物活性均等物，其包括合成產生

之小分子實體及其醫藥學上可接受之衍生物及鹽。

術語"激素"係指多肽激素，其通常係由具有導管之腺器官分泌。該等激素包括(例如)：生長激素，例如人類生長激素、N-甲硫丁胺醯基人類生長激素及牛生長激素；甲狀旁腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原(prorelaxin)；糖蛋白激素，例如卵泡刺激激素(FSH)、甲狀腺刺激激素(TSH)及黃體生成激素(LH)；催乳素、胎盤催乳素、小鼠促性腺激素相關肽、抑制素；促進素；穆勒氏(mullerian)-抑制物質；及血小板生成素。如本文所用，術語激素包括源自天然來源或重組細胞培養物之蛋白及自然序列激素之生物活性均等物，其包括合成產生之小分子實體及其醫藥學上可接受之衍生物及鹽。

術語"生長因子"係指促進生長之蛋白，且其包括(例如)：肝生長因子；纖維母細胞生長因子；血管內皮生長因子；神經生長因子，例如NGF- $\beta$ ；血小板衍生之生長因子；轉型生長因子(TGFs)，例如TGF- $\alpha$ 及TGF- $\beta$ ；類胰島素生長因子-I及-II；紅血球生成素(EPO)；骨引導因子；干擾素，例如干擾素- $\alpha$ 、- $\beta$ 及- $\gamma$ ；及群落刺激因子(CSFs)，例如巨噬細胞-CSF(M-CSF)；粒細胞-巨噬細胞-CSF(GM-CSF)；及粒細胞-CSF(G-CSF)。如本文所用，術語生長因子包括源自天然來源或重組細胞培養物之蛋白及自然序列生長因子之生物活性均等物，其包括合成產生之小分子實體及其醫藥學上可接受之衍生物及鹽。

術語"整合素"係指使細胞結合至細胞外基質並對其作出反應之受體蛋白，且其涉及多種細胞功能，例如傷口癒合、細胞分化、腫瘤細胞之返巢及細胞凋亡。其係涉及細胞-細胞外基質及細胞-細胞交互作用之細胞黏著受體大家族中之部分。功能性整合素係由兩種稱為 $\alpha$ 及 $\beta$ 之非共價結合跨膜糖蛋白次單位組成。該等 $\alpha$ 次單位彼此均共有一些同源性， $\beta$ 次單位亦如此。該等受體經常含有一 $\alpha$ 鏈及一 $\beta$ 鏈。實例包

括 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 7\beta 1$ 、LFA-1、 $\alpha 4$ 整合素等。如本文所用，術語整合素包括源自天然來源或重組細胞培養物之蛋白及自然序列整合素之生物活性均等物，其包括合成產生之小分子實體及其醫藥學上可接受之衍生物及鹽。

本文之"整合素拮抗劑或抗體"實例包括：LFA-1抗體，例如可購自Genentech之伊發單抗(Efalizumab) (RAPTIVA®)； $\alpha 4$ 整合素抗體，例如可購自Biogen之整合素(natalizumab)(TYSABRI®)；二氮環苯丙胺酸衍生物(WO 2003/89410)；苯丙胺酸衍生物(WO 2003/70709、WO 2002/28830、WO 2002/16329及WO 2003/53926)；苯丙酸衍生物(WO 2003/10135)；烯胺衍生物(WO 2001/79173)；丙酸衍生物(WO 2000/37444)；烷酸衍生物(WO 2000/32575)；經取代之苯基衍生物(美國專利第6,677,339及6,348,463號)；芳族胺衍生物(美國專利第6,369,229號)；及ADAM去整合素區域多肽(US2002/0042368)、 $\alpha v\beta 3$ 整合素之抗體(EP 633945)；氮橋接之雙環胺氨基酸衍生物(WO 2002/02556)等。

為達成本文之目的，"腫瘤壞死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )"係指人類TNF $\alpha$ 分子，其包含如Pennica等人之*Nature*, 312:721 (1984)或Aggarwal等人之*JBC*, 260:2345 (1985)所述的胺基酸序列。

本文之"TNF $\alpha$ 抑制劑"係於某種程度上抑制TNF $\alpha$ 生物功能之藥劑，該抑制作用通常係藉由結合至TNF $\alpha$ 並中和其活性來完成。TNF抑制劑之實例在本文中特定地涵蓋依那西普(Etanercept)(ENBREL®)、英利昔單抗(Infliximab) (REMICADE®)及阿達木單抗(Adalimumab) (HUMIRA™)。

"疾病調節性抗風濕藥物"或"DMARD"之實例包括羥化氯喹、磺胺塞拉金(sulfasalazine)、甲胺喋呤、來氟米特、依那西普、英利昔單抗(連同經口及經皮下之甲胺喋呤)、硫唑嘌呤、D-青黴胺、金

(Gold)(經口)、金(經肌肉內)、二甲胺四環素(minocycline)、環孢素、葡萄球菌(Staphylococcal)蛋白A免疫吸附劑，亦包括其鹽及衍生物等。

"非類固醇抗發炎藥物"或"NSAID"之實例為乙醯水楊酸、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林酸(sulindac)、托美汀(tolmetin)，亦包括其鹽及衍生物等。

"皮質類固醇"係指幾種具有類固醇通用化學結構的合成或天然存在物質中之任何一種，該等類固醇會模擬或增強天然存在皮質類固醇之作用。合成皮質類固醇之實例包括潑尼松、潑尼龍(包括甲潑尼龍)、地塞米松、糖皮質激素及倍他米松(betamethasone)。

"封裝插入物"係用於指通常包括於治療產品的商業封裝中之說明書，其含有關於該等治療產品的適應症、用法、劑量、投藥、禁忌症、與封裝產品結合之其它治療產品及/或涉及使用之警告等。

## II. 療法

本發明提供一種用於治療患病受檢者中之多發性硬化症之方法，其包含將有效劑量之結合至B細胞表面標記(較佳地CD20抗體)的抗體投予至受檢者。本文待治療之MS包括原發性進行性多發性硬化症(PPMS)、復發-緩解性多發性硬化症(RRMS)、繼發性進行性多發性硬化症(SPMS)及進行性復發性多發性硬化症(PRMS)，而PPMS或RRMS之療法為本文之較佳實施例。

根據較佳給藥方式，該方法包含將有效劑量之CD20抗體投予至MS受檢者以提供約0.5至4公克(較佳地，約1.5至2.5公克)之初始抗體曝露，接著提供約0.5至4公克(較佳地，約1.5至2.5公克)之第二抗體曝露，第二抗體曝露係直至初始抗體曝露之後約16至60週才得以提供。為達成本發明之目的，第二抗體曝露係在初始抗體曝露之後再次用CD20抗體治療受檢者，在初始曝露與第二曝露之間不存在插入的

CD20抗體治療或曝露。

在初始與第二或隨後抗體曝露之間之時間間隔可自初始抗體曝露之第一或第二劑量來量測，但較佳地自初始抗體曝露之第一劑量來量測。

在本文之較佳實施例中，抗體曝露相隔約24週或6個月；或相隔約48週或12個月。

在一實施例中，第二抗體曝露係直至初始曝露之後約20至30週才得以提供，接著視情況進行約0.5至4公克(較佳地，約1.5至2.5公克)之第三抗體曝露，第三曝露係直至初始曝露之後約46至60週(較佳地，約46至54週)才得以投藥，且接著較佳在初始曝露之後至少約70-75週才提供進一步抗體曝露。

在替代實施例中，第二抗體曝露係直至初始曝露之後約46至60週才得以提供，且若提供隨後之抗體曝露，則該隨後曝露係直至先前抗體曝露之後約46至60週才得以提供。

可將本文之任何一或多次抗體曝露作為單一劑量抗體或作為兩個單獨劑量抗體(意即，包括第一及第二劑量)提供給受檢者。各抗體曝露所用劑量之特定數量(無論一或兩次)係取決於(例如)所治療MS之類型、所用抗體之類型、是否使用第二醫藥品及其類型及投藥之方法與頻率。若投予兩次單獨劑量，則較佳在投予第一劑量之時間後約3至17天(更佳地約6至16天且最佳地約13至16天)時投予第二劑量。若投予兩次單獨劑量，則抗體之第一及第二劑量較佳為約0.5至1.5公克，更佳為約0.75至1.3公克。

在一實施例中，將至少約三次或至少約四次抗體曝露提供給受檢者，例如約3至60次曝露且更特定言之約3至40次曝露，最特定言之約3至20次曝露。較佳地，每隔一段時間投予該等曝露，各時間為約24週或6個月或48週或12個月。在一實施例中，各抗體曝露係作為單一

劑量抗體來提供。在替代實施例中，各抗體曝露係作為兩個單獨抗體劑量來提供。然而，各抗體曝露並非均需作為單一劑量或兩個單獨劑量來提供。

抗體可為裸抗體或可與另一分子(例如細胞毒素劑，例如放射性化合物)共軛。本文之較佳抗體為利妥昔單抗、人化2H7(例如，包含SEQ ID NOS. 2及8中之可變區域序列)或包含SEQ ID NOS. 23及24中的可變區域序列之人化2H7或huMax-CD20(Genmab)。

在一實施例中，受檢者先前從未接受(多種)藥物(例如，(多種)免疫抑制劑)治療以治療多發性硬化症及/或先前從未用B細胞表面標記之抗體治療(例如，先前從未用CD20抗體治療)。

該抗體係藉由任何適當方式來投用，該等方式包括非經腸、局部、經皮下、經腹腔內、經肺內、經鼻內及/或病變內投予。非經腸輸注包括經肌肉內、經靜脈內、經動脈內、經腹腔內或經皮下投藥。亦涵蓋鞘內投藥(參看，例如美國專利申請案第2002/0009444號，Grillo-Lopez, A concerning intrathecal delivery of a CD20 antibody)。另外，該抗體可適當地藉由脈衝輸注來投用，例如藉由緩慢減少抗體劑量來投用。較佳地，經靜脈內、經皮下或經鞘內給藥，最佳地藉由靜脈輸注給藥。

雖然CD20抗體可為用於投予至受檢者以治療多發性硬化症之唯一藥物，但吾人可視情況投用第二醫藥品，例如細胞毒素劑、化學治療劑、免疫抑制劑、細胞激素、細胞激素拮抗劑或抗體、生長因子、激素、整合素、整合素拮抗劑或抗體(例如LFA-1抗體，例如可購自Genentech之伊發單抗(RAPTIVA®)；或 $\alpha 4$ 整合素抗體，例如可購自Biogen之整合素(TYSABRI®))等，同時該抗體結合B細胞表面標記(例如CD20抗體)。

在組合療法之較佳實施例中，使該抗體與干擾素類藥物組合，例

如下列藥物：IFN- $\beta$ -1a(REBIF® 及 AVONEX®) 或 IFN- $\beta$ -1b(BETASERON®)；寡肽，例如乙酸格萊提陌(COPAXONE®)；細胞毒素劑，例如米托蒽醌(NOVANTRONE®)、甲胺喋呤、環磷醯胺、苯丁酸氮芥、硫唑嘌呤；靜脈內免疫球蛋白( $\gamma$ 球蛋白)；消耗淋巴細胞療法(例如米托蒽醌、環磷醯胺、坎帕斯(Campath)、抗CD4、克拉屈濱(cladribine)、全身照射、骨髓移植)；皮質類固醇(例如甲潑尼龍、潑尼松、地塞米松或類皮質糖)，其包括全身皮質類固醇療法；消耗非淋巴細胞免疫抑制療法(例如黴酚酸嗎啉乙酯(MMF)或環孢素)；"他汀"類之降低膽固醇藥物，其包括薛利伐他汀(cerivastatin)(BAYCOL®)、氟伐他汀(fluvastatin)(LESCOL®)、阿托伐他汀(atorvastatin)(LIPITOR®)、洛伐他汀(MEVACOR®)、普伐他汀(PRAVACHOL®)、司伐他汀(Simvastatin)(ZOCOR®)；雌二醇；睪固酮(視情況於高劑量；Stuve等人，*Neurology* 8:290-301 (2002))；激素替代療法；治療MS繼發或與MS相關之症狀(例如痙攣、失禁、疼痛、疲勞)；TNF抑制劑；疾病調節性抗風濕藥物(DMARD)；非類固醇抗發炎藥物(NSAID)；血漿置換術；左甲狀腺素；環孢素A；體抑素類似物；細胞激素或細胞激素受體拮抗劑；抗代謝物；免疫抑制劑；復原手術；放射碘；甲狀腺摘除術；其它B細胞表面拮抗劑/抗體等。

第二醫藥品係與初始曝露及/或隨後曝露之CD20抗體一起投用，該組合投藥包括使用單獨調配物或單一醫藥調配物之共投藥及以任何次序實施之連續投藥，其中較佳地存在所有活性劑同時發揮其生物活性之時期。

除將抗體投予至受檢者之外，本申請案涵蓋藉由基因療法來投予抗體。術語投用"有效劑量"之抗體涵蓋該編碼抗體之核酸投用。參看，例如1996年3月14日公開之關於使用基因療法來產生細胞內抗體

之WO96/07321。

存在兩種使核酸(視情況包含於載體內)進入受檢者細胞之主要方法；活體內及活體外。對於活體內傳遞而言，將核酸直接注入受檢者中，通常直接注入於需要抗體之位點。對於活體外治療而言，移除受檢者之細胞，將核酸引入該等經分離之細胞中並將經修飾的細胞直接或(例如)封裝在植入受檢者中之多孔膜內投予至受檢者(參看，例如美國專利第4,892,538及5,283,187號)。存在多種可用於將核酸引入活細胞中之技術。該等技術視是否於活體外或活體內將核酸轉移至預期宿主之細胞中而變化。適用於在活體外將核酸轉移至哺乳動物細胞中之技術包括使用脂質體、電穿孔法、顯微注射、細胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸鈣沉澱方法等。通常用於活體外基因傳遞之載體為反轉錄病毒。

目前較佳之活體內核酸轉移技術包括用病毒載體(例如腺病毒、單純疱疹I病毒或腺相關病毒)及脂質基系統(例如，適用於經脂質調節基因轉移之脂質為DOTMA、DOPE及DC-Chol)進行轉染。在一些情況下需要提供具有以靶細胞作為目標的藥劑之核酸來源，例如對細胞表面膜蛋白或靶細胞具有特異性之抗體、用於靶細胞上的受體之配位體等。若使用脂質體，則結合至內吞作用相關的細胞表面膜蛋白之蛋白可用於靶向及/或促進攝取(例如)針對特定細胞類型之衣殼蛋白或其片段、用於在循環中經受內化作用的蛋白之抗體及以細胞內定位為目標且增加細胞內半衰期之蛋白。由受體調節之內吞作用之技術係由(例如)Wu等人之*J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)及Wagner等人之*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990)來描述。目前已知之基因標記及基因治療方式之綜述見於Anderson等人之*Science* 256:808-813 (1992)。亦參看WO 93/25673及在其中所引用之文獻。

### III. 抗體之產生

本發明之方法及製造物品使用或引入結合至B細胞表面標記(尤其結合至CD20)之抗體。因此，用於產生該等抗體之方法將在本文中描述。

用於產生或篩選抗體之B細胞表面標記可為(例如)含有所要抗原決定部位之可溶形式的標記或其部分。另外或其它，在細胞表面表現標記之細胞可用於產生或篩選抗體。熟習此項技術者將明白適用於產生抗體之其它形式B細胞表面標記。

下文描述用於產生根據本發明使用之抗體的例示性技術。

#### *(i) 多株抗體*

較佳地，藉由在動物中多次經皮下(sc)或經腹腔內(ip)注射相關抗原及佐劑而產生多株抗體。其可適用於將相關抗原共軛至在待免疫物種中免疫之蛋白，例如透孔螺血藍蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或使用雙功能或衍生藥劑之大豆胰蛋白酶抑制劑，例如馬來醯亞胺苯甲醯磺醯基琥珀醯亞胺酯(藉由半胱胺酸殘基來共軛)、N-羥基琥珀醯亞胺(藉由離胺酸殘基來共軛)、戊二醛、琥珀酸酐、 $\text{SOCl}_2$ 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中R及 $\text{R}^1$ 為不同烷基。

例如，將100  $\mu\text{g}$ 或5  $\mu\text{g}$ 蛋白或共軛物(分別用於家兔或小鼠)與3體積弗氏完全佐劑共軛，並於多個位點經皮內注射該溶液，藉此使該等動物對抗原、免疫原共軛物或衍生物免疫。一個月之後，藉由於多個位點經皮下注射而對動物追加弗氏完全佐劑中之1/5至1/10原始劑量之肽或共軛物。7至14天之後，使動物出血並檢定血清之抗體滴度。對動物追加劑量，直至滴度穩定。較佳地，對動物追加抗原相同(但與不同蛋白共軛及/或藉由不同交聯藥劑共軛)之共軛物。亦可於重組細胞培養物中製備作為蛋白融合物之共軛物。諸如礬之聚集劑亦適用於增強免疫反應。

#### *(ii) 單株抗體*

單株抗體係得自實質上同種抗體之群體，意即包含該群之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定部位，而在單株抗體產生期間出現之可能性變異體除外，該等變異體通常以較小量存在。因此，修飾語"單株"顯示抗體之特徵在於其並非離散或多株抗體之混合物。

例如，單株抗體可使用首先由Kohler等人之Nature, 256:495 (1975)描述之融合瘤方法製得，或可藉由重組DNA方法製得(美國專利第4,816,567號)。

在融合瘤方法中，將小鼠或其它適當宿主動物(例如倉鼠)如上文所述進行免疫以誘導產生或能夠產生將會特異性地結合至用於免疫的蛋白之抗體之淋巴細胞。或者，可將淋巴細胞於活體外免疫。接著，使用合適之融合劑(例如聚乙二醇)將淋巴細胞與骨髓瘤細胞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在適當培養基中接種並生長，該培養基較佳地含有一或多種抑制未融合、親本骨髓瘤細胞的生長或存活之物質。例如，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT或HPRT)，則用於融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質會阻止缺乏HGPRT之細胞的生長。

較佳之骨髓瘤細胞係彼等有效融合、藉由所選之抗體產生細胞來提供抗體之穩定高水平產生且對諸如HAT培養基之培養基敏感的骨髓瘤細胞。其中，較佳之骨髓瘤細胞株為鼠科動物骨髓瘤株，例如彼等衍生自可購自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤與可購自American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA之SP-2或X63-Ag8-653細胞者。人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞株亦已描述人類單株

抗體之產生(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984) ; Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

檢定融合瘤細胞於其中生長之培養基以用於產生對抗抗原之單株抗體。較佳地，藉由免疫沉澱反應或活體外結合檢定(例如放射性免疫檢定(RIA)或酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA))來判定由融合瘤細胞產生之單株抗體的結合特異性。

例如，單株抗體之結合親和力可藉由 Munson 等人之 *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)的斯卡查德(Scatchard)分析來判定。

在識別出產生具有所要特異性、親和力及/或活性的抗體之融合瘤細胞之後，該等純系可藉由限制稀釋程序來進行次選殖並藉由標準方法而生長(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。適用於達成該目的之培養基包括(例如)D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，融合瘤細胞可於活體內生長，如動物中之腹水腫瘤。

由次純系分泌之單株抗體適於藉由習知免疫球蛋白純化程序而自培養基、腹水或血清中分離，例如，該等習知程序為蛋白A瓊脂糖、羥磷灰石層析法、凝膠電泳、透析或親和力層析法。

使用習知程序(例如，藉由使用能夠特異性結合至編碼鼠科動物抗體重鏈及輕鏈之基因之寡核苷酸探針)易於分離編碼單株抗體之DNA並對其定序。融合瘤細胞充當該DNA之較佳來源。一旦分離，則可將該DNA置於表現載體中，接著將其轉染至諸如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或不另外產生免疫球蛋白的骨髓瘤細胞之宿主細胞中，以在重組宿主細胞中獲得合成之單株抗體。關於在編碼抗體之DNA的細菌中重組表現之綜述文章包括 Skerra等人之 *Curr. Opinion in Immunol*, 5:256-262 (1993)及Plückthun<sup>S</sup>

之*Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)。

在其它實施例中，抗體或抗體片段可自使用McCafferty等人之*Nature*, 348:552-554 (1990)所述技術而產生之抗體噬菌體庫中分離。Clackson等人之*Nature*, 352:624-628 (1991)及Marks等人之*J. Mol Biol*, 222:581-597 (1991)分別描述使用噬菌體庫來分離鼠科動物及人類抗體。隨後之公開案描述藉由將鏈改組(Marks等人, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))與組合感染及活體內重組作為用於構造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，該等技術可用作用於分離單株抗體之習知單株抗體融合瘤技術。

DNA亦可加以修飾，例如以人類重鏈及輕鏈恆定區域之編碼序列來替代同源鼠科動物序列(美國專利第4,816,567號；Morrison等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984))，或將非免疫球蛋白多肽之全部或部分編碼序列共價接合至免疫球蛋白編碼序列。

通常以該等非免疫球蛋白多肽來替代抗體之恆定區域，或以其來替代抗體之一抗原結合位點的可變區域以形成嵌合二價抗體，該嵌合二價抗體包含對抗原具有特異性之一抗原結合位點及對不同抗原具有特異性之另一抗原結合位點。

### (iii)人化抗體

此項技術中已描述用於人化非人類抗體之方法。較佳地，人化抗體中已引入一或多個非人類來源之胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常稱為"輸入"殘基，其通常取自"輸入"可變區域。根據Winter及輔助工人(Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann等人, *Nature*, 332-323-327 (1988)；Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988))之方法，可基本上藉由以高變區域序列替代人類抗體之相應序列來進行人化作用。因此，該等"人化"抗體係嵌合抗體(美國專利第

4,816,567號)，其中完整人類可變區域並非實質上已由非人類物種之相應序列替代。實務上，人化抗體通常為人類抗體，其中一些高變區域殘基及一些可能性FR殘基係由齧齒動物抗體中之類似位點的殘基替代。

用於製備人化抗體之人類可變區域(輕及重)之選擇對減少抗原性極其重要。根據所謂"最適合(best-fit)"方法，根據整個已知人類可變區域序列庫來篩選齧齒動物抗體之可變區域序列。接著，將最接近齧齒動物序列之人類序列視為人類構架區域(FR)以用於人化抗體(Sims等人，*J. Immunol*, 151:2296 (1993)；Chothia等人，*J. Mol Biol*, 196:901 (1987))。另一方法所用之特定構架區域係衍生自輕鏈或重鏈可變區域的特定亞族之所有人類抗體的一致序列。該相同構架可用於幾種不同人化抗體(Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；Presta等人，*J. Immunol*, 151:2623 (1993))。

另外重要的係，使人化抗體對抗原保持高親和力且具有其它良好生物特性。為達成該目的，根據較佳方法，藉由分析親本序列及各種概念性人化產物之方法使用親本及人化序列之三維模型來製備人化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可用並為熟習此項技術者所熟習。可用電腦程式來說明並展示所選候選免疫球蛋白序列之可能性三維構形結構。對該等展示進行之檢驗允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列功能中之可能性作用，意即分析殘基對候選免疫球蛋白與其抗原結合之能力的影響。由此，可自接受及輸入序列中選擇並組合FR殘基以達到所要抗體特徵，例如增加對(多個)靶抗原之親和力。通常，高變區域殘基直接並實質上極其涉及對抗原結合之影響。

#### (iv)人類抗體

作為人化作用之替代物，可產生人類抗體。例如，目前可能產生轉殖基因動物(例如小鼠)，其在免疫之後隨即能夠產生缺乏內因性免

疫球蛋白產生之全套人類抗體。例如，已描述抗體重鏈連接區域( $J_H$ )基因在嵌合及種系突變小鼠中之純合缺失會引起內因性抗體產生之完全抑制。在該種系突變小鼠中之人類種系免疫球蛋白基因陣列轉移將在抗原攻毒之後導致人類抗體之產生。參看，例如Jakobovits等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，*Nature*, 362:255-258 (1993)；Bruggermann等人，*Year in Immuno.*, 7:33 (1993)；及美國專利第5,591,669、5,589,369及5,545,807號。

或者，噬菌體呈現技術(McCafferty等人，*Nature* 348:552-553 (1990))可用於自未免疫供體之免疫球蛋白可變(V)區域基因全套中活體外產生人類抗體及抗體片段。根據該技術，將抗體V區域基因於框架內選殖於絲狀噬菌體(例如M13或fd)之較大或較小外殼蛋白基因中，並作為功能性抗體片段呈現於噬菌體顆粒之表面上。由於絲狀顆粒含有噬菌體基因組之單股DNA複本，基於抗體功能特性之選擇亦引起對展示彼等特性的抗體進行編碼之基因的選擇。因此，該噬菌體模擬B細胞之一些特性。噬菌體呈現技術可以多種格式來進行；關於其綜述見於(例如)Johnson、Kevin S.與Chiswell、David J.之*Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。幾種V-基因區段之來源可用於噬菌體呈現。Clackson等人之*Nature*, 352:624-628 (1991)自衍生自免疫小鼠脾的V基因之小型隨機組合庫中分離抗噁唑酮抗體之不同陣列。可構造來自未免疫人類供體之全套V基因，並基本上可根據Marks等人之*J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)或Griffith等人，*EMBO J.* 12:725-734 (1993)所述之技術來分離不同抗原陣列(包括自身抗原)之抗體。亦參看美國專利第5,565,332及5,573,905號。

人類抗體亦可由活體外活化之B細胞產生(參看美國專利案5,567,610及5,229,275)。

#### (v) 抗體片段

已形成各種用於產生抗體片段之技術。通常，該等片段係經由完整抗體之解蛋白消化作用而衍生(參看，例如Morimoto等人之*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992)及Brennan等人之*Science*, 229:81 (1985))。然而，該等片段目前可藉由重組宿主細胞而直接產生。例如，該等抗體片段可自上述抗體噬菌體庫中分離。或者，Fab'-SH片段可自大腸桿菌中直接回收並進行化學偶合以形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，F(ab')<sub>2</sub>片段可直接自重組宿主細胞培養物中分離。其它用於產生抗體片段之技術對熟習之從業者而言係顯而易見的。在其它實施例中，所選抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參看WO 93/16185、美國專利第5,571,894號及美國專利第5,587,458號。抗體片段亦可為"線性抗體"，例如美國專利5,641,870所述。該等線性抗體片段可具單特異性或雙特異性。

#### (vi) 雙特異性抗體

雙特異性抗體係對至少兩個不同抗原決定部位具有結合特異性之抗體。例示性雙特異性抗體可結合至B細胞表面標記之兩個不同抗原決定部位。其它該等抗體可結合B細胞表面標記並進一步結合第二個不同B細胞表面標記。或者，可將抗B細胞表面標記結合臂與結合至白血球上的觸發分子(例如T細胞受體分子(例如CD2或CD3)或IgG之Fc受體(FcγR)(例如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及FcγRIII(CD16)))之臂結合，以將細胞防衛機制集中於B細胞。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒素劑限定至B細胞。該等抗體具有B細胞表面標記結合臂及結合細胞毒素劑(例如沙泊寧、抗干擾素α、長春花生物鹼、蓖麻毒素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。可將雙特異性抗體製備為全長抗體或抗體片段(例如F(ab')<sub>2</sub>雙特異性抗體)。

用於製造雙特異性抗體之方法在此項技術中已為吾人所知。全長

雙特異性抗體之習知產生係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共同表現，其中兩條鏈具有不同特異性(Millstein等人，*Nature*, 305:537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重及輕鏈之隨機分類，該等融合瘤(quadromas)產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。通常藉由親和性層析步驟來進行之正確分子純化係相當麻煩的，且產物之產量低。類似程序係揭示於WO 93/08829及Traunecker等人之*EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)中。

根據不同方法，將具有所需結合特異性(抗體抗原結合位點)之抗體可變區域融合至免疫球蛋白恆定區域序列。該融合作用較佳係由至少部分包含鉸鏈、CH2及CH3區域之免疫球蛋白重鏈恆定區域來進行。含有輕鏈結合所需位點之第一重鏈恆定區域(CH1)最好存在於至少一種融合中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合之DNA及(若須要)免疫球蛋白輕鏈插入單獨表現載體中，並將其共同轉染至合適的宿主生物體中。當用於構造中之三條多肽鏈之不等比率提供最佳產量時，此為調整實施例中之三個多肽片段的相互比例提供極大可撓性。然而，當至少兩條多肽鏈之相等比率表現會引起高產量時或當比率並不特別重要時，可將用於兩條或全部三條多肽鏈之編碼序列插入一表現載體中。

在該方法之較佳實施例中，雙特異性抗體之一臂包含具有第一結合特異性之混合免疫球蛋白重鏈且另一臂包含混合免疫球蛋白重鏈輕鏈對(提供第二結合特異性)。吾人發現該不對稱結構有助於將所要雙特異性化合物自不良免疫球蛋白鏈組合中分離，因為僅一半雙特異性分子中之免疫球蛋白輕鏈之存在為分離提供簡易途徑。該方法係揭示於WO 94/04690中。關於雙特異性抗體產生之進一步詳述，參看(例如)Suresh等人之*Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

根據描述於美國專利第5,731,168號中之另一方法，可將一對抗體分子之間之界面設計為使重組細胞培養物中所回收之雜二聚體的百分

比最大。較佳之界面包含抗體恆定區域之C<sub>H</sub>3區域中之至少部分。在該方法中，將第一抗體分子界面之一或多條小胺基酸側鏈用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替代。用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或酰胺酸)替代大胺基酸側鏈，藉此於第二抗體分子界面上形成該(該等)大側鏈之相同或相似尺寸的互補"空腔"。此舉提供用於將雜二聚體產量增加至超過其它不良最終產物(例如均二聚體)之機制。

雙特異性抗體包括交聯或"雜共軛"之抗體。例如，可將雜共軛物中之抗體之一偶合至抗生物素蛋白，而將另一抗體偶合至生物素。例如，已提議將該等抗體用於將免疫系統細胞靶向不良細胞(美國專利第4,676,980號)，並用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373及EP 03089)。可使用任何便利的交聯方法來製造雜共軛抗體。合適之交聯劑在此項技術中已為吾人所知，並揭示於美國專利第4,676,980號與多種交叉技術中。

用於自抗體片段中產生雙特異性抗體之技術已揭示於文獻中。例如，可使用化學鍵聯來製備雙特異性抗體。Brennan等人之*Science*, 229: 81 (1985)描述一種程序，其中將完整抗體以蛋白水解方法裂解以產生F(ab')<sub>2</sub>片段。將該等片段於二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原以穩定鄰二硫醇並防止分子間二硫化物之形成。接著，將所產生之Fab'片段轉化為硫硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接著，藉由用半胱胺進行還原而將Fab'-TNB衍生物中之一種再轉化為Fab'-硫醇，並與等莫耳量之其它Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作酶之選擇性固定藥劑。

亦已描述各種用於直接自重組細胞培養物中製造並分離雙特異性抗體片段之技術。例如，已使用白胺酸拉鏈(zipper)來產生雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽連接至兩種不同抗體之Fab'部

分。將抗體均二聚體在鉸鏈區域中還原以形成單體，並接著使其再氧化以形成抗體雜二聚體。該方法亦可用於抗體均二聚體之產生。由 Hollinger 等人之 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) 所描述的"微型雙功能抗體(diabody)"技術已提供用於製造雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含藉由一鍵聯劑而連接至輕鏈可變區域( $V_L$ )之重鏈可變區域( $V_H$ )，所用鍵聯劑因過短而不能在同一鏈上之兩個區域之間配對。因此，使一片段之  $V_H$  及  $V_L$  區域與另一片段之互補  $V_L$  及  $V_H$  區域配對，藉此形成兩個抗原結合位點。亦已報導藉由使用單鏈 Fv(sFv) 二聚體來製造雙特異性抗體片段之另一策略。參看 Gruber 等人，*J. Immunol*, 152:5368 (1994)。

本發明涵蓋具有兩個以上原子價之抗體。例如，可製備三特異性抗體。Tutt 等人，*J. Immunol*. 147: 60 (1991)。

#### IV. 抗體之共軛物及其它修飾

可視情況將該等方法所用或本文製造物品所包括之抗體與細胞毒素劑共軛。例如，可將該抗體與如 WO2004/032828 所述之藥物共軛。

適用於產生該等抗體-細胞毒素劑共軛物之化學治療劑已在上文中有所描述。

本文亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素之共軛物，例如卡奇黴素、美登素(美國專利第 5,208,020 號)、黴菌毒素及 CC1065。在本發明之一實施例中，將抗體共軛至一或多個美登素分子(例如，每個抗體分子約 1 至約 10 個美登素分子)。例如，可將美登素轉化為 May-SS-Me，其可還原為 May-SH3 並與經修飾之抗體反應(Chari 等人，*Cancer Research* 52: 127-131 (1992))以產生類美登素-抗體共軛物。

或者，將抗體共軛至一或多個卡奇黴素分子。抗生素之卡奇黴素家族能夠在低於皮可莫耳(picomolar)之濃度瞎產生雙股 DNA 斷裂。可用卡奇黴素之結構類似物包括(但不限於)： $\gamma_1^I$ 、 $\alpha_2^I$ 、 $\alpha_3^I$ 、N-乙醯-

$\gamma_1^I$ 、PSAG及 $\theta_1^I$ (Hinman等人之 *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) 及Lode等人之 *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998))。

可用之酶促活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、 $\alpha$ -帶麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、洋商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻楓樹蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、撒跑那日(sapaonaria officinalis)抑制劑、天堂果蛋白(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、依諾黴素(enomycin)及黴菌毒素。參看(例如)1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋與具有溶核活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸內切酶，例如脫氧核糖核酸酶；DNase)共軛之抗體。

多種放射性同位素可用於產生放射性共軛之抗體。實例包括 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 及Lu之放射性同位素。

可使用多種雙官能基蛋白偶合劑製造抗體與細胞毒素劑之共軛物，例如，該等偶合劑為N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸酯、亞胺硫堊(IT)、亞胺酯之雙官能衍生物類(例如己二醯亞胺酸二甲酯HCL)、活性酯類(例如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(例如戊二醛)、雙疊氮基化合物類(例如雙(對疊氮苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物類(例如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯類(例如2,6-二異氰酸亞苄酯)及雙活性氟化合物類(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，可如Vitetta等人之 *Science* 238: 1098 (1987)所述來製備蓖麻毒素免疫

毒素。經碳14標記之1-異硫氰基苄基-3-甲基二乙三胺五乙酸(MX-DTPA)係用於將放射性核苷酸共軛至抗體之例示性螯合劑。參看WO94/11026。鍵聯劑可為有助於釋放細胞中的細胞毒素藥物之"可裂解鍵聯劑"。例如，可使用酸不穩定鍵聯劑、肽酶敏感性鍵聯劑、二甲基鍵聯劑或含有二硫化物之鍵聯劑(Chari等人，*Cancer Research* 52: 127-131 (1992))。

或者，舉例而言，可藉由重組技術或肽合成方法來製造包含抗體與細胞毒素劑之融合蛋白。

在另一實施例中，可將抗體共軛至用於腫瘤預靶向之"受體"(如抗生蛋白鏈菌素(streptavidin))，其中將抗體-受體共軛物投予受檢者，接著使用清潔劑自循環中移除未經結合之共軛物且接著投用與細胞毒素劑(例如放射性核苷酸)共軛之"配位體"(例如抗生蛋白)。

亦可將本發明抗體與可將前藥(例如肽基化學治療劑，參看WO81/01145)轉化為活性抗癌藥物之前藥活化酶共軛。參看(例如)WO 88/07378及美國專利第4,975,278號。

該等共軛物之酶組份包括任何能以此方式作用於前藥以將前藥轉化為其較強活性、細胞毒素形式之酶。

適用於本發明方法之酶包括(但不限於)：適用於將含有磷酸鹽之前藥轉化為游離藥物之鹼性磷酸酶；適用於將含有硫酸鹽之前藥轉化為游離藥物之芳基硫酸酯酶；適用於將無毒5-氟胞嘧啶轉化為抗癌藥物5-氟尿嘧啶之胞嘧啶脫胺酶；蛋白酶，例如沙雷氏菌(*serratia*)蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶(subtilisin)、羧肽酶及組織蛋白酶(例如組織蛋白酶B及L)，其適用於將含有肽之前藥轉化為游離藥物；D-丙胺醯基羧肽酶，其適用於轉化含有D-胺基酸取代基之前藥；碳水化合物裂解酶，例如適用於將糖基化之前藥轉化為游離藥物之 $\beta$ -半乳糖苷酶及神經胺酸苷酶；適用於將 $\beta$ -內醯胺類衍生之藥物轉化為

游離藥物之 $\beta$ -內醯胺酶；及青黴素醯胺酶，例如青黴素V醯胺酶或青黴素G醯胺酶，其適用於將在胺氮處分別由苯氧基乙醯基或苯乙醯基衍生之藥物轉化為游離藥物。或者，具有酶活性之抗體(此項技術中亦稱為"抗體酶(abzyme)")可用於將本發明之前藥轉化為游離活性藥物(參看，例如Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987))。可如本文所述來製備抗體-抗體酶共軛物以用於將抗體酶傳遞至腫瘤細胞群。

可藉由此項技術中熟知之技術將本發明之酶共價地結合至抗體，例如使用上述雜雙官能基交聯劑。或者，可使用此項技術中熟知之重組DNA技術來構造融合蛋白，其至少包含本發明抗體之抗原結合區域，該抗原結合區域係連接至本發明酶之至少一功能活性部分(參看，例如Neuberger等人，*Nature*, 312: 604-608 (1984))。

本文涵蓋抗體之其它修飾。例如，可將抗體連接至多種非蛋白聚合物中之一種，例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚烷二醇或聚乙二醇與聚丙二醇之共聚物。連接至一或多個PEG分子之抗體片段(例如Fab')為本發明之尤其較佳實施例。

亦可將本文所揭示之抗體調配為脂質體。含有該抗體之脂質體係藉由此項技術中已知之方法來製備，例如下列文獻所揭示之方法：Epstein等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985)；Hwang等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980)；美國專利第4,485,045及4,544,545號；及1997年10月23日公開之WO97/38731中之方法。循環時間增加之脂質體係揭示於美國專利第5,013,556號中。

使用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組合物，可藉由逆相蒸發方法來產生特別適用之脂質體。藉由具有界定微孔尺寸之過濾器來擠壓脂質體以產生具有所要直徑之脂質體。如Martin等人之*J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982)所述，可經由二硫化物互換反應將本發明抗體之Fab'片段共軛至脂質體。化學<sub>5</sub>

治療劑可視情況含於脂質體中。參看 Gabizon 等人，*J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989)。

本發明涵蓋抗體之(多種)胺基酸序列修飾。例如，可需要改良抗體之結合親和力及/或其它生物特性。抗體之胺基酸序列變異體係藉由將適當核苷酸變化引入抗體核酸中或藉由肽合成方法來製備。該等修飾包括(例如)刪除及/或插入及/或取代抗體胺基酸序列中之殘基。進行刪除、插入及取代之任何組合以達成最終構造，使最終構造具有所要特徵。胺基酸變化亦可改變抗體之後轉譯過程，例如改變糖基化位點之數目或位置。

如 Cunningham 與 Wells 之 *Science*, 244:1081-1085 (1989) 所述，適用於識別抗體之特定殘基或區域(較佳之突變發生位置)之方法稱為"丙胺酸掃描突變"。此處，目標殘基之殘基或基團(例如帶電荷之殘基，例如精胺酸、天冬胺酸、組胺酸、離胺酸及麩胺酸)係經識別並由帶中性或負電荷之胺基酸(最佳為丙胺酸或聚丙胺酸)替代以影響胺基酸與抗原之交互作用。接著，藉由在取代位點處引入另外或其它變異體來精選彼等對取代顯示官能敏感性之胺基酸位置。因此，雖然已預定用於引入胺基酸序列變異之位點，但不需預定突變本身之性質。例如，為了於特定位點處分析突變之效能，於目標密碼子或區域中進行丙胺酸掃描或隨機突變發生並篩選經表現抗體變異體之所要活性。

胺基酸序列插入物包括胺基及/或羧基末端融合物(其長度介於一殘基至含有一百個或更多殘基之多肽)與單個或多個胺基酸殘基之序列內插入物。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫丁胺醯基殘基之抗體或融合至細胞毒素多肽之抗體。其它抗體分子之插入變異體包括融合至抗體之N-或C-末端之酶或多肽，其增加抗體之血清半衰期。

另一類型之變異體為胺基酸取代變異體。該等變異體在抗體分子中具有經不同殘基替代之至少一胺基酸殘基。用於抗體之取代突變發

生之最相關位點包括高變區域，但亦涵蓋FR改變。保守取代基以"較佳取代基"之標題顯示於表1中。若該等取代基引起生物活性變化，則接著可引入更多實質變化(在表1中名為"例示性取代基"，或如下文參考胺基酸類進一步描述)並篩選產物。

表1

| 初始殘基     | 例示性取代基                      | 較佳取代基 |
|----------|-----------------------------|-------|
| 丙胺酸(A)   | 纈胺酸、白胺酸、異白胺酸                | 纈胺酸   |
| 精胺酸(R)   | 離胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸              | 離胺酸   |
| 天冬醯胺酸(N) | 麩醯胺酸、組胺酸、天冬胺酸、離胺酸、精胺酸       | 麩醯胺酸  |
| 天冬胺酸(D)  | 麩胺酸、天冬醯胺酸                   | 麩胺酸   |
| 半胱胺酸(C)  | 絲胺酸、丙胺酸                     | 絲胺酸   |
| 麩醯胺酸(Q)  | 天冬醯胺酸、麩胺酸                   | 天冬醯胺酸 |
| 麩胺酸(E)   | 天冬胺酸、麩醯胺酸                   | 天冬胺酸  |
| 甘胺酸(G)   | 丙胺酸                         | 丙胺酸   |
| 組胺酸(H)   | 天冬醯胺酸、麩醯胺酸、離胺酸、精胺酸          | 精胺酸   |
| 異白胺酸(I)  | 白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、正亮胺酸  | 白胺酸   |
| 白胺酸(L)   | 正亮胺酸、異白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸 | 異白胺酸  |
| 離胺酸(K)   | 精胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸              | 精胺酸   |
| 甲硫胺酸(M)  | 白胺酸、苯丙胺酸、異白胺酸               | 白胺酸   |
| 苯丙胺酸(F)  | 色胺酸、白胺酸、纈胺酸、異白胺酸、丙胺酸、酪胺酸    | 酪胺酸   |
| 脯胺酸(P)   | 丙胺酸                         | 丙胺酸   |
| 絲胺酸(S)   | 酰胺酸                         | 酰胺酸   |
| 酰胺酸(T)   | 纈胺酸、絲胺酸                     | 絲胺酸   |
| 色胺酸(W)   | 酪胺酸、苯丙胺酸                    | 酪胺酸   |
| 酪胺酸(Y)   | 色胺酸、苯丙胺酸、酰胺酸、絲胺酸            | 苯丙胺酸  |
| 纈胺酸(V)   | 異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、丙胺酸、正亮胺酸 | 白胺酸   |

抗體生物特性中之實質性修飾係藉由選擇取代來完成，該等取代

對於以下情形之影響顯著不同：(a)維持取代區域中之多肽骨架的結構，例如薄片或螺旋構形；(b)維持分子於目標位點處之電荷或疏水性；或(c)維持側鏈之大小。胺基酸可根據其側鏈特性之類似性來分組 (A. L. Lehninger, *Biochemistry*, 第二版, 第 73-75 頁, Worth Publishers, New York (1975))：

(1)非極性：丙胺酸(A)、纈胺酸(V)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)、脯胺酸(P)、苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)；

(2)無電荷極性：甘胺酸(G)、絲胺酸(S)、酰胺酸(T)、半胱胺酸(C)、酪胺酸(Y)、天冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q)；

(3)酸性：天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；

(4)鹼性：離胺酸(K)、精胺酸(R)、組胺酸(H)。

或者，可基於常見之側鏈特性將天然存在之殘基分為下列各組：

(1)疏水性：正亮胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸；

(2)中性親水性：半胱胺酸、絲胺酸、酰胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸；

(3)酸性：天冬胺酸、麩胺酸；

(4)鹼性：組胺酸、離胺酸、精胺酸；

(5)影響鏈定向之殘基：甘胺酸、脯胺酸；

(6)芳族：色胺酸、酪胺酸、苯丙氨酸。

非保守性取代基需要將該等種類中之一種之一員交換為另一種類。

通常亦可將未涉及抗體之適當構形保持之任何半胱胺酸殘基經絲胺酸取代以改良分子之氧化穩定性，並預防異常交聯。相反，可將(多個)半胱胺酸鍵添加至抗體中以改良其穩定性(特別地，當其中抗體為諸如Fv片斷之抗體片斷時)。

取代變異體之特別較佳類型涉及取代親本抗體之一或多個高變區域殘基。通常，為進一步發展而選擇之所得變異體將具有相對於產生變異體的親本抗體有所改良之生物特性。便於產生該等取代變異體之方法係使用噬菌體呈現來進行親和性成熟。簡言之，將若干高變區域位點(例如6-7個位點)突變以於各位點產生所有可能的胺基取代基。將如此產生之抗體變異體以單價方式由作為融合物之絲狀噬菌體顆粒呈現為封裝於各顆粒內之M13的基因III產物。接著，如本文所示來篩選經噬菌體呈現之變異體的生物活性(例如，結合親和力)。為了識別用於修飾之候選高變區域位點，可進行丙胺酸掃描突變以識別對抗原結合起顯著作用之高變區域殘基。或者或另外，分析抗原抗體複合物之晶體結構可有益於識別抗體與抗原之間的接觸點。根據本文詳述之技術將該等接觸殘基與臨近殘基用作取代候選物。一旦產生該等變異體，則使變異體之面板經受如本文所述之篩選，並可於一或多個相關檢定中選擇具有優良特性之抗體以用於進一步發展。

抗體之另一類型胺基酸變異體會改變抗體之原始糖基化類型。該改變包括刪除一或多個在抗體中所發現之碳水化合物部分及/或添加一或多個在抗體中不存在之糖基化位點。

多肽之糖基化作用通常係經N連接或經O連接。經N連接係指碳水化合物部分連接至天冬醯胺酸殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-酰胺酸(其中X係除脯胺酸以外之任何胺基酸)係用於將碳水化合物部分酶連接至天冬醯胺酸側鏈之識別序列。因此，該等三肽序列中之任一者在多肽中之存在均會產生潛在的糖基化位點。經O連接之糖基化作用係指將糖類N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一者連接至羥胺酸，最通常地連接至絲胺酸或酰胺酸，儘管亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

將糖基化位點添加至抗體係便利地藉由改變胺基酸序列來完成，

以使其含有上述三肽序列(用於N連接糖基化位點)中之一或多者。該改變亦可藉由將一或多個絲胺酸或酰胺酸殘基添加至原始抗體之序列(用於經O連接之糖基化位點)中或由該或該等殘基進行取代而製得。

若抗體包含Fc區域，則可改變連接至其中之碳水化合物。例如，具有成熟碳水化合物結構之抗體(其缺乏連接至抗體之Fc區域之海藻糖)係描述於美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號(Presta, L)中。亦參看關於CD20抗體組合物之US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在連接至抗體Fc區域之碳水化合物中具有平分N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)之抗體係參照Jean-Mairet等人的WO03/011878及Umana等人的美國專利第6,602,684號。在連接至抗體Fc區域之寡糖中具有至少一半乳糖殘基之抗體係報導於Patel等人的WO97/30087中。亦參看WO98/58964 (Raju, S.)及WO99/22764 (Raju, S.)，其係關於具有連接至抗體Fc區域的經改變碳水化合物之抗體。

本文之較佳糖基化變異體包含Fc區域，其中連接至Fc域之碳水化合物結構缺乏海藻糖。該等變異體具有改良之ADCC功能。視情況，該Fc區域進一步包含一或多個其中進一步改良ADCC之胺基酸取代，例如於Fc區域之298、333及/或334位置處進行取代(殘基之Eu編號)。關於"去海藻糖化"或"缺乏海藻糖"抗體之公開案之實例包括：美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；WO 00/61739A1；WO01/29246A1；US2003/0115614A1；US2002/0164328A1；US2004/0093621A1；US2004/0132140A1；US2004/0110704A1；US2004/0110282A1；US2004/0109865A1；WO03/085119A1；WO03/084570A1；WO2005/035778；WO2005/035586(描述海藻糖化作用之RNA抑制作用(RNAi))；Okazaki等人，J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。產生去海藻糖化抗體之細胞株的實例包括：缺乏蛋白海藻糖化之

Lec13 CHO細胞(Ripka等人，Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986))；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1，Adams等人，尤其係於實例11)；及基因剔除細胞株，例如 $\alpha$ -1,6-海藻糖基轉移酶基因、FUT8、基因剔除CHO細胞(Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))。

編碼抗體的胺基酸序列變異體之核酸分子係藉由此項技術中已知之多種方法來製備。該等方法包括(但不限於)：自天然來源(在自然存在之胺基酸序列變異體情況下)進行分離；或藉由抗體的早期製備變異體或非變異體形式之寡核苷酸調節(或定點)突變、PCR突變及序列盒突變來製備。

需要改良本發明抗體之效應功能，(例如)以增強抗體之抗原依賴性細胞調節之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。此可藉由將一或多個胺基酸取代基引入抗體抗體之Fc區域中而達成。或者或另外，可將(多個)半胱胺酸殘基引入Fc區域中，藉此允許在該區域內形成鏈間二硫鍵。因此產生之均二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增強之補體調節細胞殺傷力及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參看Caron等人之*J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992)及Shopes, B.之*J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。亦可使用Wolff等人之*Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)所述的雜雙官能交聯劑來製備抗腫瘤活性增強之均二聚抗體。或者，可設計具有雙重Fc區域之抗體並可使其藉此具有增強之補體溶解及ADCC能力。參看Stevenson等人，*Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

WO00/42072(Presta, L.)描述在人類效應細胞存在下具有改良ADCC功能之抗體，其中該等抗體在其Fc區域中包含胺基酸取代。較佳地，具有改良ADCC之抗體在Fc區域之298、333及/或334位置上包含取代。較佳地，經改變之Fc區域為人類IgG1 Fc區域，其包含在該

等位置中的一、二或三個位置處之取代或由該等取代組成。

具有經改變的C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)之抗體係描述於WO99/51642、美國專利第6,194,551B1號、美國專利第6,242,195B1號、美國專利第6,528,624B1號及美國專利第6,538,124號(Idusogie等人)中。該等抗體在其Fc區域的胺基酸位置270、322、326、327、329、313、333及/或334中之一或多處包含胺基酸取代。

舉例而言，爲了增加抗體之血清半衰期，吾人可如美國專利5,739,277號所述將一補救受體結合抗原決定部位引入抗體(尤其抗體片斷)中。如本文所用，術語"補救受體結合抗原決定部位"係指IgG分子(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>或IgG<sub>4</sub>)之Fc區域的抗原決定部位，其係造成活體內IgG分子之血清半衰期增加的原因。在Fc區域具有取代且血清半衰期增加之抗體亦係描述於WO00/42072(Presta, L.)中。

本發明亦涵蓋經設計爲具有三個或三個以上(較佳爲四個)功能性抗原結合位點之抗體(美國申請案第US2002/0004587 A1號，Miller等人)。

## V. 醫藥調配物

藉由將具有所要純度之抗體與醫藥學上可接受之選擇性載劑、賦形劑或穩定劑混合來製備根據本發明使用之抗體的治療調配物，以用於以凍乾調配物或水溶液之形式儲存(*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第16版，Osol, A.編輯(1980))。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量或濃度下對接受者無毒，且包括：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其它有機酸；抗氧化劑，其包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如氯化十八基二甲基苄基銨；氯化六氫季銨；氯苄烷銨；氯化苄銨松寧(benzethonium chloride)；苯酚、丁基或苄基醇；對羥基苯甲酸烷基酯類，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約

10個殘基)多肽類；蛋白類，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物類，例如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸類，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其它碳水化合物類，例如葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖類，例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；形成鹽之抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物類(例如Zn-蛋白錯合物)；及/或非離子界面活性劑，例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

例示性抗CD20抗體調配物係描述於WO98/56418中。該公開案描述了一種液體多劑量調配物，其包含40 mg/mL利妥昔單抗、25 mM乙酸鹽、150 mM海藻糖、0.9%苧醇、0.02%聚山梨醇酯20，其pH值為5.0且在2-8 °C下儲存時具有兩年之最小存放期。另一相關之抗CD20調配物包含10 mg/mL利妥昔單抗(溶於9.0 mg/mL氯化鈉中)、7.35 mg/mL二水合檸檬酸鈉、0.7 mg/mL聚山梨醇酯80及無菌注射用水(pH 6.5)。

適用於經皮下投藥之凍乾調配物係描述於美國專利第6,267,958號(Andya等人)中。可用合適之稀釋劑將該等凍乾調配物復原至高蛋白濃度且可將該復原調配物經皮下投予至本文中之待治療哺乳動物。

本發明亦涵蓋抗體或抗體之結晶形式。參看，例如US 2002/0136719A1(Shenoy等人)。

本文之調配物亦可含有用於治療特定適應症所需之一種以上活性化合物，彼等化合物較佳地具有不會彼此造成不利影響之互補活性。例如，可需要在調配物中進一步提供下列各物：細胞毒素劑、化學治療劑、免疫抑制劑、細胞激素、細胞激素拮抗劑或抗體、生長因子、激素、整合素、整合素拮抗劑或抗體(例如，LFA-1抗體，例如可購自Genentech之伊發單抗/RAPTIVA；或 $\alpha 4$ 整合素抗體，例如可購自Biogen之整合素/TYSABRI®)；干擾素類藥物，例如IFN- $\beta$ -1a(REBIF®

及AVONEX®)或IFN- $\beta$ -1b(BETASERON®)；寡肽，例如乙酸格萊提陌(COPAXONE®)；細胞毒素劑，例如米托蒽醌(NOVANTRONE®)、甲胺喋呤、環磷醯胺、苯丁酸氮芥或硫唑嘌呤；靜脈內免疫球蛋白( $\gamma$ 球蛋白)；消耗淋巴細胞之藥物(例如米托蒽醌、環磷醯胺、坎帕斯、抗CD4或克拉屈濱)；不消耗淋巴細胞之免疫抑制藥物(例如黴酚酸嗎啉乙酯(MMF)或環孢素)；"他汀"類之降低膽固醇藥物；雌二醇；睪固酮；激素替代療法；治療MS繼發或MS相關之症狀(例如痙攣、失禁、疼痛、疲勞)的藥物；TNF抑制劑；疾病調節性抗風濕藥物(DMARD)；非類固醇抗發炎藥物(NSAID)；皮質類固醇(例如甲潑尼龍、潑尼松、地塞米松或類皮質糖)；左甲狀腺素；環孢素A；體抑素類似物；細胞激素拮抗劑；抗代謝物；免疫抑制劑；整合素拮抗劑或抗體(例如，LFA-1抗體，例如伊發單抗；或 $\alpha 4$ 整合素抗體，例如整合素)；或另一B細胞表面拮抗劑/抗體等。該等其它藥劑之類型及有效劑量視存在於調配物中之抗體劑量、所治療之多發性硬化症類型及受檢者之臨床參數而定。該等藥劑通常以與前文所用相同之劑量及投藥路徑來使用或以前文所用劑量之約1至99%來使用。

例如，藉由凝聚技術或藉由界面聚合作用亦可將活性成份誘捕於所製備之微膠囊中，例如分別在膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或在微乳液中之羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊。該等技術係揭示於*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第16版，Osol, A.編輯(1980)中。

可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之合適實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半通透性基質，該等基質係以成形物品之形式存在，例如薄膜或微膠囊。持續釋放型基質之實例包括聚酯類、水凝膠類(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯

類(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 $\gamma$ 乙基-L-麩胺酸之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOT™, 包含乳酸-乙醇酸共聚物與乙酸亮丙瑞林之可注射微球)及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

欲用於活體內投藥之調配物必須無菌。藉由經無菌過濾膜過濾易於達成此目的。

## VI. 製造物品

在本發明之另一實施例中, 提供含有適用於治療上述多發性硬化症之材料之製造物品。較佳地, 該製造物品包含: (a)一容器, 該容器內包含含有結合至B細胞表面標記(例如CD20抗體)的抗體及醫藥學上可接受的載劑或稀釋劑之組合物; 及(b)一封裝插入物, 其具有用於將該組合物投予至罹患多發性硬化症的受檢者之說明書, 以提供約0.5至4公克之初始抗體曝露, 接著提供約0.5至4公克之第二抗體曝露, 第二曝露係直至初始曝露之後約16至60週才得以提供; 或具有用於將該組合物投予至罹患PPMS的受檢者之說明書。

該製造物品包含一容器及在該容器上或與該容器有關之標籤或封裝插入物。合適之容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器等。該等容器可由多種材料形成, 例如玻璃或塑料。該等容器容納或含有有效治療多發性硬化症之組合物且可具有無菌接取口(例如, 該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺破的塞子之小瓶)。該組合物中之至少一種活性劑為抗體。標籤或封裝插入物顯示該組合物適用於治療患病受檢者中之多發性硬化症, 同時提供關於抗體之給藥劑量與時間間隔及任何其它藥物之明確指導。該製造物品可進一步包含一第二容器, 其包含醫藥學上可接受之稀釋劑緩衝劑, 例如抑菌注射用水(BWFI)、經磷酸鹽緩衝之鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。該製造物品可進一步包括基於商業及使用者立場所需之其它材料, 其包括其

它緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

本文之製造物品可視情況進一步包含一容器，其包含不同於治療抗體之藥劑且進一步包含關於用該藥劑來治療哺乳動物之說明書，該藥劑較佳為：化學治療劑或免疫抑制劑；干擾素類藥物，例如IFN- $\beta$ -1a(REBIF®及AVONEX®)或IFN- $\beta$ -1b(BETASERON®)；寡肽，例如乙酸格萊提陌(COPAXONE®)；細胞毒素劑，例如米托蒽醌(NOVANTRONE®)、甲胺喋呤、環磷醯胺、苯丁酸氮芥或硫唑嘌呤；靜脈內免疫球蛋白( $\gamma$ 球蛋白)；消耗淋巴細胞之藥物(例如米托蒽醌、環磷醯胺、坎帕斯、抗CD4、克拉屈濱)；不消耗淋巴細胞之免疫抑制藥物(例如黴酚酸嗎啉乙酯(MMF)或環孢素)；"他汀"類之降低膽固醇藥物；雌二醇；睪固酮；激素替代療法；治療MS繼發或與MS相關之症狀(例如痙攣、失禁、疼痛、疲勞)的藥物；TNF抑制劑；疾病調節性抗風濕藥物(DMARD)；非類固醇抗發炎藥物(NSAID)；皮質類固醇(例如甲潑尼龍、潑尼松、地塞米松或類皮質糖)；左甲狀腺素；環孢素A；體抑素類似物；細胞激素或細胞激素受體拮抗劑；抗代謝物；免疫抑制劑；整合素拮抗劑或抗體(例如，LFA-1抗體，例如伊發單抗；或 $\alpha$ 4整合素抗體，例如整合素)；及另一B細胞表面標記抗體等。

本發明之進一步詳述係由下列非限制性實例來說明。本說明書中之所有引文的揭示內容均係以引用的方式清楚地併入本文中。

### 實例1

#### 原發性進行性多發性硬化症(PPMS)之治療

在該實例中，以CD20抗體來治療根據McDonald等人之 *Ann Neurol* 50:121-7 (2001)所定義經診斷為PPMS之受檢者。

將利妥昔單抗(可購自Genentech)調配為溶於9.0 mg/mL氯化鈉、0.7 mg/mL聚山梨醇酯80、7.35 mg/mL脫水檸檬酸鈉及無菌注射用水

(pH 6.5)中之無菌產品以用於IV投藥。

治療之第一過程將由在1天及15天中之每一天投予1 g靜脈內(IV)利妥昔單抗之劑量組成。受檢者將在每次輸注開始之前30-60分鐘經口接收乙醯胺苯酚(1 g)及二苯基海卓胺HCl(50 mg)或均等物。

治療之隨後過程將在第24週(第169天)、第48週(第337天)及第72週(第505天)開始投藥。治療之隨後過程的第二次輸注將在第一次輸注之後14 ± 1天。

經受第一次復發之受檢者可接收用IV或經口皮質類固醇進行之援救治療。可使用不超過適於治療MS復發之曝露或持續時間之方案來投用全身性皮質類固醇。下文均為復發之定義：

- 神經異常之急性出現持續至少24小時；
- 不歸因於發熱、感染、外傷、伴隨性藥物治療或其它病源學之變化；
- 根據盲法審查調查員之審查具有客觀變化之事件，其包括下列FS尺度之一的最小1點變化：椎體、腦神經、小腦、感官、視覺或步態。

可使用皮質類固醇之下列方案：每天投用1 g之IV甲潑尼龍，持續3天；接著每天投用60 mg潑尼松，持續5天；且此後每天逐漸減少10 mg增量。若IV甲潑尼龍不可用，則每天可用150 mg IV地塞米松替代，持續3天。為治療惡化，應僅投用一療程之皮質類固醇。隨後的免疫學研究及MRI掃描應在皮質類固醇方案完成之後至少4週時獲得。可使用皮質類固醇吸入器(經口及經鼻)或關節內注射。

欲視情況與CD20抗體組合之額外治療包括IFN-β、乙酸格萊提陌、甲胺喋呤、環磷醯胺或米托蒽醌。

主要功效結果量測係證實疾病擴展之時間。疾病擴展係定義為基線疾病狀態擴展評估表(EDSS)(Kurtzke J. Neurology 33(11):1444-52

(1983))之 $\geq 1.0$ 點之增加(若基線EDSS係在2.0與5.5點(包括)之間)；或係定義為 $\geq 0.5$ 點之增加(若基線EDSS為 $\geq 5.5$ 點(包括))，此變化並不歸因於另一病源學(例如，發熱、併發疾病、MS復發或惡化或伴隨性藥物治療)。疾病擴展之證實可發生在初始擴展之後的至少12週(84天)定期檢查中。

次要功效結果量測包括：

- 自基線至第96週時，在腦MRI掃描上之T2病變的總體積變化；
- 自基線至第96週時，在腦MRI掃描上之腦體積的變化。

視情況，對以下情形中之任何一或多種進行改良：

-多發性硬化症功能性複合評估表(Multiple Sclerosis Functional Composite Scale, MSFCS)；

-EDSS；

-如使用EDSS所判定，在第96週時已證實疾病擴展之受檢者的比例；

- 上肢功能，如9-Hole Peg Test(MSFCS之次尺度)所量測；
- 行走能力，如Timed 25-Foot Walk(MSFCS之次尺度)所量測；
- 認知力，如Paced Auditory Serial Addition Test(僅3秒鐘；MSFCS之次尺度)所量測；

-在MRI掃描上之腦T2病變的總體積(第48週及第122週)；

-在MRI掃描上之腦T1病變的總體積；

-在MRI掃描上之頸髓的截面面積；

-在MRI掃描上之腦體積(第48週及第122週)。

根據以上結果量測中之任何一或多種，如本文所述以利妥昔單抗治療之受檢者將顯示PPMS症候、症狀或其它指標之改善。

## 實例2

### 復發-緩解性多發性硬化症之治療

在該實例中，以CD20抗體來治療如McDonald等人之 *Ann Neurol* 50:121-7 (2001)所定義患有RRMS之受檢者，其中抗體曝露間隔約6個月。

將利妥昔單抗(可購自Genentech)調配為溶於9.0 mg/mL氯化鈉、0.7 mg/mL聚山梨醇酯80、7.35 mg/mL脫水檸檬酸鈉及無菌注射用水(pH 6.5)中之無菌產品以用於IV投藥。

治療之第一過程將由在1天及15天中之每一天投用1 g靜脈內(IV)利妥昔單抗之劑量組成。受檢者將在每次輸注開始之前30-60分鐘時經口接收乙醯胺苯酚(1 g)及二苯基海卓胺HCl(50 mg)或均等物。

治療之隨後過程將在第24週(第169天)、第48週(第337天)及第72週(第505天)時開始投藥。治療之隨後過程的第二次輸注將在第一次輸注之後14 ± 1天。

較佳地，利妥昔單抗係治療RRMS之唯一投用藥劑。然而，受檢者可視情況接收IV或經口皮質類固醇、IFN- $\beta$ 、乙酸格萊提陌、甲胺喋呤、環磷醯胺或米托蒽醌。

經受第一次復發之受檢者可接收用IV或經口皮質類固醇進行之援救治療。可使用不超過適於治療MS復發之曝露或持續時間之方案來投用全身性皮質類固醇。在該實例中，復發之定義係如下所述：

與MS一致之新近或再發神經症狀的出現在受檢者中持續48小時以上，該受檢者已在至少30天內具有相對穩定或改善之神經狀態。神經症狀之變化必須伴隨客觀神經惡化，該客觀神經惡化與在EDSS上增加之至少半個步驟或在適當功能系統評估表(FSS)之一中增加的2點或在適當FSS中之兩者或兩者以上中增加的1點相一致。該變化必須由審核調查員驗證且必須影響所選之FS尺度(意即椎體、步態、小腦、腦幹、感官或視覺)。症狀必須持續24小時或更久且不應歸因於混淆的臨床因素(例如發熱、感染、損

傷、伴隨藥物治療之不利反應)。突發性症狀(例如強直性痙攣)之單一事件不會復發，然而，若伴隨新近出現之相應客觀表現，則突發性症狀之多次發生在超過至少24小時新近發作可復發。沒有臨床檢查、疲勞、情緒變化或膀胱或腸急迫或失禁之感官症狀將不足以確定為復發。

主要功效結果量測係釐增強病變之MRI端點或證實疾病擴展之時間(定義為基線疾病狀態擴展評估表(EDSS)之 $\geq 1.0$ 點的增加；Kurtzke J. *Neurology* 33(11):1444-52 (1983))。主要功效端點可為第12、16、20及24週時在腦連續MRI掃描上所觀察的釐增強T1病變總數目。

次要功效結果量測包括：復發之頻率；自基線至第96週時，在腦MRI掃描上之T2病變的總體積變化(例如自審核至第24週及第36週時，在腦MRI掃描上之T2病變的總體積變化)；自基線至第96週時，在腦MRI掃描上之腦體積變化；多發性硬化症功能性複合評估表(MSFCS)及其次尺度；上肢功能，如9-Hole Peg Test(MSFCS之次尺度)所量測；行走能力，如Timed 25-Foot Walk(MSFCS之次尺度)所量測；認知力，如Paced Auditory Serial Addition Test(MSFCS之次尺度)所量測；Life-54(MSQOL-54)之多發性硬化症品質調查表；在MRI掃描上之腦T1病變的總體積(例如第20、28及36週時，在腦之連續MRI掃描上所觀察的釐增強T1病變之總數目)；在MRI掃描上之頸髓截面積；24週(意即在第0週與第24週之間)及36週(意即在第0週與第36週之間)時，受檢者復發之比例；第24週及第36週之組合獨特活性量測(Combined Unique Activity Measure)。

在以上結果量測中之任何一或多者中，如上所述以利妥昔單抗來治療患者將顯示出改良。

### 實例3

#### 復發-緩解性多發性硬化症之治療

如McDonald等人之*Ann Neurol* 50:121-7 (2001)所定義，用本文之CD20抗體來治療RRMS受檢者。在該實例中，抗體曝露間隔約1年。

將利妥昔單抗(可購自Genentech)調配為溶於9.0 mg/mL氯化鈉、0.7 mg/mL聚山梨醇酯80、7.35 mg/mL脫水檸檬酸鈉及無菌注射用水(pH 6.5)中之無菌產品以用於IV投藥。

治療之第一過程將由在1天及15天中之每一天投用1 g靜脈內(IV)利妥昔單抗之劑量組成。受檢者將在每次輸注開始之前30-60分鐘經口接收乙醯胺苯酚(1 g)及二苯基海卓胺HCl(50 mg)或均等物。

治療之隨後過程將在第48週及第96週開始投藥。治療之隨後過程的第二次輸注將在第一次輸注之後14 ± 1天。

較佳地，利妥昔單抗係治療RRMS之唯一投用藥劑。然而，受檢者可視情況接收IV或經口皮質類固醇、IFN-β、乙酸格萊提陌、甲胺喋呤、環磷醯胺或米托蒽醌。

經受第一次復發之受檢者可接收用IV或經口皮質類固醇進行之援救治療。可使用不超過適於治療MS復發之曝露或持續時間之方案來投用全身性皮質類固醇。在該實例中，復發之定義係如下所述：

與MS一致之新近或再發神經症狀的出現在受檢者中持續48小時以上，該受檢者已在至少30天內具有相對穩定或改善之神經狀態。神經症狀之變化必須伴隨客觀神經惡化，該客觀神經惡化與在EDSS上增加之至少半個步驟或在適當功能系統評估表(FSS)之一中增加的2點或在適當FSS中之兩者或兩者以上中增加的1點相一致。該變化必須由審核調查員驗證且必須影響所選之FS尺度(意即椎體、步態、小腦、腦幹、感官或視覺)。症狀必須持續24小時或更久且不應歸因於混淆的臨床因素(例如發熱、感染、損傷、伴隨藥物治療之不利反應)。突發性症狀(例如強直性痙攣)之單一事件不會復發，然而，若伴隨新近出現之相應客觀表現，則

突發性症狀之多次發生在超過至少24小時新近發作可復發。沒有臨床檢查、疲勞、情緒變化或膀胱或腸急迫或失禁之感官症狀將不足以確定為復發。

主要功效結果量測係釐增強病變之MRI端點或證實疾病擴展之時間(定義為自基線疾病狀態擴展評估表(EDSS)之 $\geq 1.0$ 點的增加；Kurtzke J. Neurology 33(11):1444-52 (1983))。主要功效端點可為第12、16、20及24週時在腦連續MRI掃描上所觀察的釐增強T1病變之總數目。

次要功效結果量測包括：復發之頻率；自基線至第96週時在腦MRI掃描上之T2病變的總體積變化(例如自審核至第24週及第36週時，在腦MRI掃描上之T2病變的總體積變化)；自基線至第96週時，在腦MRI掃描上之腦體積變化；多發性硬化症功能性複合評估表(MSFCS)及其次尺度；上肢功能，如9-Hole Peg Test(MSFCS之次尺度)所量測；行走能力，如Timed 25-Foot Walk(MSFCS之次尺度)所量測；認知力，如Paced Auditory Serial Addition Test(MSFCS之次尺度)所量測；Life-54(MSQOL-54)之多發性硬化症品質調查表；在MRI掃描上之腦T1病變的總體積(例如第20、28及36週時，在腦之連續MRI掃描上所觀察的釐增強T1病變之總數目)；在MRI掃描上之頸髓截面積；24週(意即在第0週與第24週之間)及36週(意即在第0週與第36週之間)時，受檢者復發之比例；第24週及第36週之組合獨特活性量測。

在以上結果量測中之任何一或多者中，以上述利妥昔單抗來治療患者將顯示出改良。

#### 實例4

#### 人化2H7變異體

該實例描述用於本文所揭示方法之人化2H7抗體變異體。該人化

2H7抗體較佳地包含下列CDR序列中之一種、兩種、三種、四種、五種或六種：

CDR L1序列RASSSVSYXH，其中X為M或L(SEQ ID NO. 18)，例如SEQ ID NO：4(圖1A)；

SEQ ID NO：5之CDR L2序列(圖1A)；

CDR L3序列QQWXFNPPT，其中X為S或A(SEQ ID NO. 19)，例如SEQ ID NO：6(圖1A)；

SEQ ID NO：10之CDR H1序列(圖1B)；

AIYPGNGXTSYNQKFKG之CDR H2序列，其中X為D或A(SEQ ID NO. 20)，例如SEQ ID NO：11(圖1B)；及

VVYYSSXXYWYFDV之CDR H3序列，其中X在位置6處為N、A、Y、W或D，且該X在位置7處為S或R(SEQ ID NO. 21)，例如SEQ ID NO：12(圖1B)。

以上CDR序列通常存在於人類可變輕構架序列及可變重構架序列中，例如實質上人類輕鏈 $\kappa$ 亞族I(V<sub>L</sub>6I)之人類一致FR殘基及實質上人類重鏈亞族III(V<sub>H</sub>III)之人類一致FR殘基。亦參看WO 2004/056312(Lowman等人)。

可變重區域可結合至人類IgG鏈恆定區域，其中該區域可為(例如)IgG1或IgG3，其包括自然序列及變異體恆定區域。

在一較佳實施例中，該抗體包含SEQ ID NO：8之可變重區域序列(v16，如圖1B所示)，亦視情況包含SEQ ID NO：2之可變輕區域序列(v16，如圖1A所示)，其視情況在可變重區域中之位置56、100及/或100a(例如D56A、N100A或N100Y及/或S100aR)處包含一或多個胺基酸取代，且在可變輕區域之位置32及/或92(例如M32L及/或S92A)處包含一或多個胺基酸取代。較佳地，該抗體係包含SEQ ID NOs. 13或16之輕鏈胺基酸序列及SEQ ID NO. 14、15、17、22或25之重鏈胺基酸

序列之完整抗體。

較佳之人化2H7抗體為奧克利單抗(ocrelizumab) (Genentech)。

本文之抗體可在Fc區域中進一步包含改良ADCC活性之至少一胺基酸取代，例如其中使用重鏈殘基之Eu編號在位置298、333及334(較佳地S298A、E333A及K334A)處進行胺基酸取代者。亦參看美國專利第6,737,056B1號，Presta。

該等抗體中之任何抗體均可在Fc區域中包含改良FcRn結合或血清半衰期之至少一取代，例如於重鏈位置434處進行取代，例如N434W。亦參看美國專利第6,737,056B1號，Presta。

該等抗體中之任何抗體均可在Fc區域中進一步包含增強CDC活性之至少一胺基酸取代，例如包含位置326(較佳地K326A或K326W)處之至少一取代。亦參看美國專利第6,528,624B1號(Idusogie等人)。

一些較佳之人化2H7抗體係彼等包含SEQ ID NO：2之可變輕區域及SEQ ID NO：8之可變重區域者，其包括彼等在Fc區域(若存在)中具有或不具有取代者，且包括彼等包含下列各區域者：在SEQ ID NO：8中具有改變N100A(或D56A及N100A；或D56A、N100Y及S100aR)之可變重區域；及在SEQ ID NO：2中具有改變M32L(或S92A；或M32L及S92A)之可變輕區域。

在2H7.v16的可變重區域中之M34已識別為抗體穩定性之潛在來源且係用於取代之另一潛在候選物。

在本發明之一些不同較佳實施例的概述中，根據2H7.v16之變異體的可變區域包含v16之胺基酸序列，而下表所示之胺基酸取代的位置除外。除非另有說明，否則該2H7變異體將具有與v16的輕鏈相同之輕鏈。

## 例示性人化2H7抗體變異體

| 2H7<br>版本   | 重鏈(V <sub>H</sub> )<br>變化 | 輕鏈(V <sub>L</sub> )<br>變化 | Fc變化                                 |
|-------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 16，<br>用於參考 |                           |                           | -                                    |
| 31          | -                         | -                         | S298A, E333A, K334A                  |
| 73          | N100A                     | M32L                      |                                      |
| 75          | N100A                     | M32L                      | S298A, E333A, K334A                  |
| 96          | D56A, N100A               | S92A                      |                                      |
| 114         | D56A, N100A               | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A                  |
| 115         | D56A, N100A               | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A, E356D,<br>M358L |
| 116         | D56A, N100A               | M32L, S92A                | S298A, K334A, K322A                  |
| 138         | D56A, N100A               | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A, K326A           |
| 477         | D56A, N100A               | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A, K326A,<br>N434W |
| 375         | -                         | -                         | K334L                                |
| 588         | -                         | -                         | S298A, E333A, K334A, K326A           |
| 511         | D56A, N100Y,<br>S100aR    | M32L, S92A                | S298A, E333A, K334A, K326A           |

一較佳之人化2H7包含2H7.v16可變輕區域序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIY  
APSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTF  
GQGTKVEIKR(SEQ ID NO：2)；

及2H7.v16可變重區域序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE  
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTA  
VYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO：8)；

其中該人化2H7.v16抗體為完整抗體，其可包含輕鏈胺基酸序  
列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIY  
 APSNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTF  
 GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVY  
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO : 13) ;

及SEQ ID NO. 14之重鏈胺基酸序列；或

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE  
 WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTA  
 VYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK  
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO : 22) 。

另一較佳之人化2H7包含2H7.v511可變輕區域序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIY  
 APSNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTF  
 GQGTKVEIKR(SEQ ID NO : 23) ;

及2H7.v511可變重區域序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE  
 WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAV  
 YYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 24) 。

其中該人化2H7.v511抗體為完整抗體，其可包含輕鏈胺基酸序  
 列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIY  
APSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTF  
GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY  
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO : 16) ;

及SEQ ID NO. 17之重鏈胺基酸序列；或

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE  
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAV  
YYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO. 25) 。

序列表

<110> 建南德克公司

<120> 治療多發性硬化之方法

<130> 14639-20138.56

<140> 094118185

<141> 2005-06-02

<150> US 60/576,993

<151> 2004-06-04

<160> 25

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 2

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

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 3  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 4  
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 5  
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 6  
 Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 7  
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Val Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 8  
 <211> 122  
 <212> PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 8

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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 9

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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;400&gt; 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His  
 1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;400&gt; 11

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

&lt;210&gt; 12

201422238

<211> 13  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<400> 12  
Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

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

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 13  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
35 40 45  
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80  
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr  
85 90 95  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110  
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125  
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140  
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160  
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175  
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190  
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205  
Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 14  
<211> 452  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 14  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125  
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr



```

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

```

<210> 15

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 15

```

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

```

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

<210> 16

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 16

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



<210> 17  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 17  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr  
 290 295 300  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335  
 Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 405 410 415  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 18

5

<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<220>  
<221> 變體  
<222> 9  
<223> Xaa = Met or Leu

<400> 18  
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His  
1 5 10

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<220>  
<221> 變體  
<222> 4  
<223> Xaa = Ser or Ala

<400> 19  
Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr  
1 5

<210> 20  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<220>  
<221> 變體  
<222> 8  
<223> Xaa = Asp or Ala

<400> 20  
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 21  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<220>  
<221> 變體  
<222> 6  
<223> Xaa = Asn, Ala, Tyr, Trp, or Asp

<220>  
<221> 變體  
<222> 7  
<223> Xaa = Ser or Arg

<400> 21



# 201422238

Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 22  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 22  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125  
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140  
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160  
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175  
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190  
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205  
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220  
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
225 230 235 240  
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255  
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270  
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285  
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300  
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320  
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335  
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350  
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365  
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380  
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400  
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415  
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430  
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445  
Ser Pro Gly  
450

<210> 23

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 23  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 24  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 24  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 25  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

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



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

## 申請專利範圍

1. 一種治療受檢者多發性硬化症之方法，其包含投予受檢者有效劑量之CD20抗體，以提供約0.5至4公克之初始抗體曝露，接著提供約0.5至4公克之第二抗體曝露，該第二曝露係直至該初始曝露之後約16至60週才提供，且每一抗體曝露係以一或兩劑之抗體提供予該受檢者。
2. 如請求項1之方法，其中該第二曝露係直至該初始曝露之後約20至30週才提供。
3. 如請求項1或2之方法，其中該初始及該第二抗體曝露各係提供約1.5至2.5公克之含量。
4. 如請求項2－3中任一項之方法，其額外包含投予受檢者有效劑量之CD20抗體，以提供約0.5至4公克之第三抗體曝露，該第三曝露係直至該初始曝露之後約46至60週才投用。
5. 如請求項4之方法，其中該第三抗體曝露係提供約1.5至2.5公克之含量。
6. 如請求項4或5之方法，其中該第三曝露係直至該初始曝露之後約46至54週才提供。
7. 如請求項4－6中任一項之方法，其中額外抗體曝露係直至該初始曝露之後至少約70－75週才提供。
8. 如請求項1之方法，其中該第二曝露係直至該初始曝露之後約46至60週才提供。
9. 如請求項1－8中任一項之方法，其中每一抗體曝露係以一劑抗體提供予該受檢者。
10. 如請求項1－8中任一項之方法，其中每一抗體曝露係以兩劑抗體提供予該受檢者，其中該兩劑構成第一劑及第二劑。

11. 如請求項10之方法，其中該第二劑係從投用該第一劑之時間起約3－17天時投用。
12. 如請求項11之方法，其中該第二劑係從投用該第一劑之時間起約6－16天時投用。
13. 如請求項12之方法，其中該第二劑係從投用該第一劑之時間起約13－16天時投用。
14. 如請求項10－13中任一項之方法，其中該第一劑及該第二劑抗體各約0.5至1.5公克。
15. 如請求項10－14中任一項之方法，其中該第一劑及該第二劑抗體各約0.75至1.3公克。
16. 如請求項1－15中任一項之方法，其中係將三種或三種以上之抗體曝露投予該受檢者。
17. 如請求項1－16中任一項之方法，其中係將四種或四種以上之抗體曝露投予該受檢者。
18. 如請求項1－17中任一項之方法，其中第二醫藥品係與該初始曝露或該等隨後曝露投用，其中該CD20抗體為第一醫藥品。
19. 如請求項18之方法，其中該第二醫藥品係選自由下列各物組成之群：干擾素、乙酸格萊提陌(glatiramer acetate)、細胞毒素劑、化學治療劑、米托蒽醌(mitoxantrone)、甲胺喋呤(methotrexate)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、硫唑嘌呤(azathioprine)、珈瑪－球蛋白、坎帕斯(Campath)、抗－CD4、克拉屈濱(cladribine)、皮質類固醇、黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil；MMF)、環孢素、他汀(statin)類之降低膽固醇藥物、雌二醇、睪固酮、激素替代藥物、TNF抑制劑、疾病調節性抗風濕藥物(disease－modifying anti－rheumatic drug；DMARD)、非類固醇抗發炎藥物(non－steroidal

anti-inflammatory drug ; NSAID)、左甲狀腺素(levothyroxine)、環孢素A、體抑素類似物、細胞激素或細胞激素受體拮抗劑、抗代謝物、免疫抑制劑、整合素拮抗劑或抗體、LFA-1抗體、伊發單抗(efalizumab)、阿爾法4整合素抗體、那特單抗(natalizumab)及其他B-細胞表面標記抗體。

20. 如請求項1-19中任一項之方法，其中該多發性硬化症為復發-緩解性多發性硬化症(relapsing-remitting multiple sclerosis ; RRMS)。
21. 如請求項1-19中任一項之方法，其中該多發性硬化症為原發性進行性多發性硬化症(primary progressive multiple sclerosis ; PPMS)。
22. 如請求項1-21中任一項之方法，其中該受檢者先前從未以CD20抗體治療。
23. 如請求項1-22中任一項之方法，其中該抗體為裸抗體。
24. 如請求項1-22中任一項之方法，其中該抗體係與另一分子共軛。
25. 如請求項24之方法，其中該另一分子為細胞毒素劑。
26. 如請求項1-25中任一項之方法，其中該抗體係經靜脈內投藥。
27. 如請求項26之方法，其中該抗體係經靜脈內投藥以進行每一抗體曝露。
28. 如請求項1-25中任一項之方法，其中該抗體係經皮下投藥。
29. 如請求項1-25中任一項之方法，其中該抗體係經鞘內投藥。
30. 如請求項1-29中任一項之方法，其中該CD20抗體係投予該受檢者以治療該多發性硬化症之唯一醫藥品。
31. 如請求項1-30中任一項之方法，其中該抗體為利妥昔單抗(Rituximab)。

32. 如請求項1－30中任一項之方法，其中該抗體係經人化2H7，其包含SEQ ID NOS.2及8中的可變區域序列。
33. 如請求項1－30中任一項之方法，其中該抗體係經人化2H7，其包含SEQ ID NOS.23及24中的可變區域序列。
34. 如請求項1－32中任一項之方法，其中該受檢者具有上升之抗－髓鞘鹼性蛋白(myelin basic protein；MBP)、抗－髓鞘寡突細胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein；MOG)、抗－神經結酯脂及/或抗－神經絲抗體含量。
35. 如請求項1－33中任一項之方法，其中高含量之B細胞係存在於該受檢者之腦脊髓液(cerebrospinal fluid；CSF)、多發性硬化症病灶或血清中。
36. 一種產物件，其包含：(a)一容器，其包含CD20抗體；及(b)一包裝插入頁，其具有用於治療受檢者多發性硬化症之說明，其中該等說明顯示將一劑量之抗體投予該受檢者以有效提供約0.5至4公克之初始抗體曝露，接著提供約0.5至4公克之第二抗體曝露，該第二曝露係直至該初始曝露之後約16至60週才投用，且每一該等抗體曝露係以一或兩劑抗體提供予該受檢者。
37. 如請求項36之物品，其進一步包含一包含第二醫藥品之容器，其中該CD20抗體為第一醫藥品，且其進一步在該封裝插入頁上包含用於以該第二醫藥品來治療該受檢者之說明。
38. 如請求項37之物品，其中該第二醫藥品係選自由下列各物組成之群：干擾素、乙酸格萊提陌、細胞毒素劑、化學治療劑、米托蒽醌、甲胺喋呤、環磷醯胺、苯丁酸氮芥、硫唑嘌呤、珈瑪球蛋白、坎帕斯、抗－CD4、克拉屈濱、皮質類固醇、黴酚酸嗎啉乙酯(MMF)、環孢素、他汀類之降低膽固醇藥物、雌二醇、睪固酮、激素替代藥物、TNF抑制劑、疾病調節性抗風濕藥物

(DMARD)、非類固醇抗發炎藥物(NSAID)、左甲狀腺素、環孢素A、體抑素類似物、細胞激素或細胞激素受體拮抗劑、抗代謝物、免疫抑制劑及其他B細胞表面標記抗體。

圖式

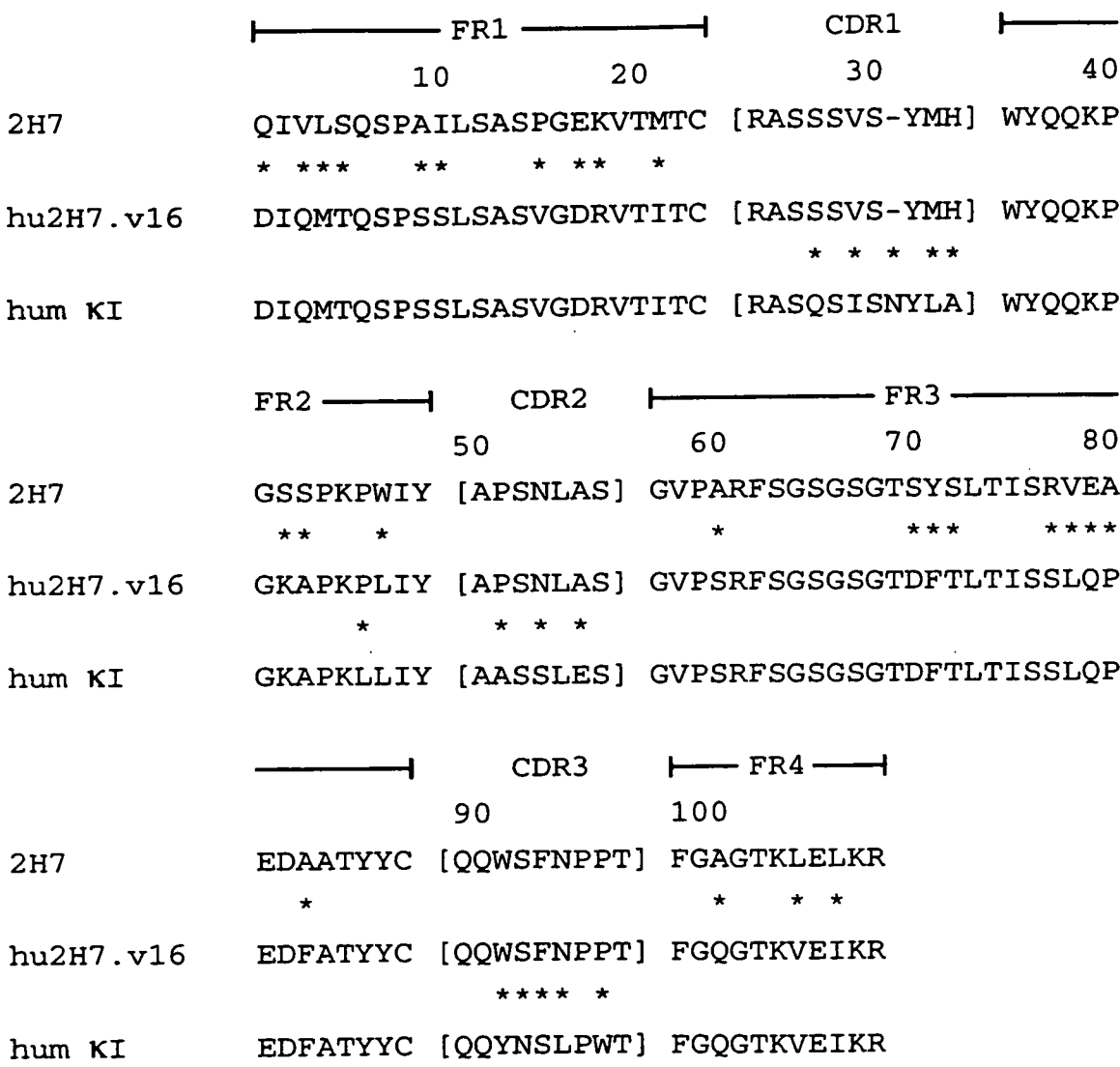


圖 1A

|           |                                                                                                    |                  |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|           | <div><div>FR1</div><div>1020</div></div> <div>CDR1</div> <div><div>3040</div></div>                |                  |
| 2H7       | QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS [GYTFTSYNMH] WVKQT                                                       | *** ** * * * * * |
| hu2H7.v16 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GYTFTSYNMH] WVRQA                                                       | * * * *          |
| hum III   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA                                                       |                  |
|           | <div><div>FR2</div><div>50a60</div></div> <div>CDR2</div> <div><div>FR3</div><div>7080</div></div> |                  |
| 2H7       | PRQGLEWIG [AIYPGNGDTSYNQKFKG] KATLTVDKSSSTAYM                                                      | ** * ** * *      |
| hu2H7.v16 | PGKGLEWVG [AIYPGNGDTSYNQKFKG] RFTISVDKSKNTLYL                                                      | * * * * * * *    |
| hum III   | PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLTL                                                       |                  |
|           | <div><div>90</div></div> <div>CDR3</div> <div><div>FR4</div><div>110</div></div>                   |                  |
| 2H7       | QLSSLTSEDSAVYFCAR [VYYYSNSYWYFDV] WGTGTTVTVSS                                                      | ** ** * *        |
| hu2H7.v16 | QMNSLRAEDTAVYYCAR [VYYYSNSYWYFDV] WGQGLTVTVSS                                                      | ***** * * *      |
| hum III   | QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLY---DY] WGQGLTVTVSS                                                      |                  |

圖 1B



DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK  
VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

圖 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK  
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY  
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

圖 3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK  
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY  
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

圖 4

|            |     |     |                                                             |
|------------|-----|-----|-------------------------------------------------------------|
| hu2H7.v16  | 1   | 32  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP<br>***** |
| hu2H7.v511 |     |     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP          |
| hu2H7.v16  | 52  |     | SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG<br>***** |
| hu2H7.v511 |     |     | SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG          |
| hu2H7.v16  | 102 |     | TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD<br>***** |
| hu2H7.v511 |     |     | TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD          |
| hu2H7.v16  | 152 |     | NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL<br>*****      |
| hu2H7.v511 |     |     | NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL               |
| hu2H7.v16  | 202 | 214 | SSPVTKSFNRGEC<br>*****                                      |
| hu2H7.v511 |     |     | SSPVTKSFNRGEC                                               |

圖 5



|            |     |                                                    |
|------------|-----|----------------------------------------------------|
| hu2H7.v16  | 1   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW               |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW               |
| hu2H7.v16  | 37  | 52a                                                |
|            |     | 82abc                                              |
|            |     | VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL |
| hu2H7.v16  | 83  | 100abcde                                           |
|            |     | 113                                                |
|            |     | RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS              |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | RAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGLTVTVSS              |
| hu2H7.v16  | 118 | ASTKGPSVFPLAPS                                     |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | ASTKGPSVFPLAPS                                     |
| hu2H7.v16  | 132 | SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS |
| hu2H7.v16  | 182 | LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA |
| hu2H7.v16  | 232 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  |
| hu2H7.v16  | 282 | VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP  |
| hu2H7.v16  | 332 | IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW |
|            |     | * *****                                            |
| hu2H7.v511 |     | IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW |
| hu2H7.v16  | 382 | ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA  |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA  |
| hu2H7.v16  | 432 | 447                                                |
|            |     | LHNHYTQKSLSLSPGK                                   |
|            |     | *****                                              |
| hu2H7.v511 |     | LHNHYTQKSLSLSPGK                                   |

圖 6