



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I664191 B

(45)公告日：中華民國 108(2019)年 07 月 01 日

(21)申請案號：100142827

(22)申請日：中華民國 100(2011)年 11 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/02 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/22 美國

61/415,973

(71)申請人：天賜製藥公司 (法國) INNATE PHARMA SA (FR)
法國(72)發明人：安卓 帕斯卡 ANDRE, PASCALE (FR)；巴菲 雷諾 BUFFET, RENAUD (FR)；
羅森維 馬歇 ROZENCWEIG, MARCEL (US)；堤歐力 傑洛 TIOLIER, JEROME
(FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2009/0196850A1

US 2010/0189723A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：6 共 140 頁

(54)名稱

NK 細胞調節治療及治療血液惡性疾病之方法

NK CELL MODULATING TREATMENTS AND METHODS FOR TREATMENT OF
HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

(57)摘要

本發明提供包含可中和 NK 細胞抑制性受體之化合物的組合物及使用該等組合物治療血液惡性疾病之方法。

Compositions comprising compounds that neutralize NK cell inhibitory receptors and methods of using such compositions in the treatment of hematological malignancies are provided.

指定代表圖：

符號簡單說明：
(無元件符號說明)

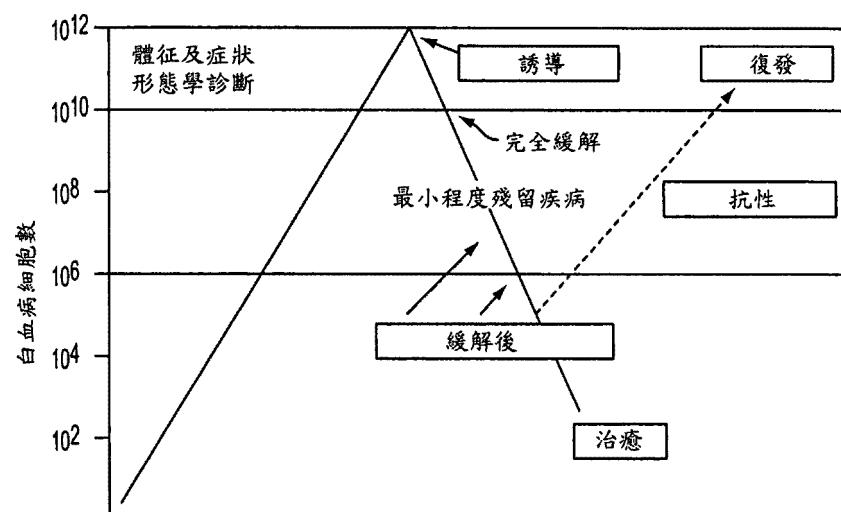


圖 1

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於調節NK細胞活性以治療血液惡性疾病。

本申請案主張2010年11月22日申請之臨時申請案第61/415,973號的優先權，其揭示內容(包括所有序列資訊)以引用方式併入本文中。

【先前技術】

自然殺手(NK)細胞為充當細胞毒性免疫細胞之大顆粒淋巴細胞之子集。由天然針對靶細胞(例如癌細胞、病毒感染細胞)之NK細胞介導之細胞毒性活性一般表現為分別由活化細胞表面受體及抑制性細胞表面受體傳遞之正信號與負信號「平衡」的結果。

NK細胞可由多種已知細胞表面標記鑑別，該等已知細胞表面標記在物種之間有所不同(例如，在人類中通常使用CD56、CD16、NKp44、NKp46及NKp30；在小鼠中通常使用NK1.1、Ly49A-W、CD49b)。在活性狀態下，NK細胞能夠殺死某些自體性、同種異體及甚至異種腫瘤細胞、病毒感染細胞、某些細菌(例如傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhi*))及其他靶細胞。NK細胞似乎優先殺死在表面上幾乎不表現第I類主要組織相容性(Major Histocompatibility Class I，「MHCI」或「MHC-I」)分子的靶細胞。NK細胞亦殺死已連接抗體分子之靶細胞，此為一種稱為抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之機制。在針對靶細胞之作用中，NK細胞可釋放稱作穿孔素(perforin)之成孔蛋白、稱作顆粒酶



(granzyme)之蛋白水解酶及細胞激素/趨化因子(例如 TNF α 、IFN γ 等)，其直接導致靶細胞凋亡或溶解，或調節其他免疫反應。在活化時，NK細胞亦可表現Fas配體(FasL)，使得此等細胞能夠誘導表現Fas之細胞發生細胞凋亡。

充足之NK細胞活性及NK細胞計數通常皆為發動充分之NK細胞介導性免疫反應所必需。NK細胞可以正常數目存在於個體體內，但此等細胞若未經活化，則其將無效於發揮重要的免疫系統功能，諸如消除異常細胞。NK細胞活性降低與多種疾病產生及進展有關。舉例而言，研究表明NK細胞活性較低會導致較易感染疾病，諸如慢性疲勞症候群(CFS)、病毒感染及產生癌症。

NK細胞活性由NK細胞活性調節受體(「NKCAMR」或簡稱為「AMR」)調節，該等受體可能對各種配體具有特異性，諸如MHC-I分子、MHC-I同源物、或靶細胞上表現之其他生物分子。NK細胞在個體體內通常呈現多種活化受體及抑制性受體。NK細胞之活性係由經由此等活化受體及抑制性受體所轉導之信號平衡來調節。接著在下文中簡要論述各類型之NKCAMR。大多數NKCAMR似乎屬於兩類蛋白質中之一類：免疫球蛋白(Ig)樣受體超家族(IgSF)或C型凝集素樣受體(CTLR)超家族(參見例如 Radaev及Sun, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2003 32:93-114)。然而，已知其他形式之NKCAMR。

針對NKCAMR(諸如殺手免疫球蛋白樣受體(KIR))之抗

體先前已經描述且亦存在至少一些提議將抗NK受體抗體(諸如抗KIR抗體)與先前技術中之其他抗癌劑組合。舉例而言，WO2004056392描述將抗NKp30抗體及/或抗NKp46抗體與介白素-2(IL-2)混合使用。WO2005009465描述治療性抗體(例如美羅華(Rituxan))與阻斷NK細胞之抑制性受體或刺激NK細胞之活化受體的化合物(例如抗KIR mAb，諸如mAb DF200或抗NKp30 mAb)組合以增強用治療性抗體治療人類個體的功效(亦參見US 20050037002)。WO2008/084106描述抗KIR調配物、劑量及給藥方案。WO2005079766亦描述用於癌症療法中之包括抗KIR抗體之抗體(例如抗組織因子抗體)的組合。WO2005003168及WO2005003172描述多種抗KIR抗體與多種藥劑(包括IL-2及IL-21)之組合。WO2005037306類似地描述IL-21、IL-21衍生物及IL-21類似物連同抗KIR抗體之組合。

雖然NK細胞在科學文獻中在其潛在地促成由結合腫瘤抗原之抗體所介導的抗腫瘤反應方面受到廣泛關注，但幾乎沒有研究旨在研究活體內功效或直接藉由調節NK細胞受體來增強NK細胞之細胞毒性。以NK細胞調節化合物進行治療迄今為止已一般設想為可潛在地恢復NK細胞殺死靶細胞之能力。可能考慮到NK細胞免疫監視作用在重大疾病(例如腫瘤負荷)情況下受損的跡象，該等治療不用於無晚期疾病之患者。舉例而言，對於骨髓瘤，侵襲性多發性骨髓瘤(MM)伴有NK細胞量減少及功能衰竭。在患有晚期MM之患者體內，NK細胞計數亦減少且NK細胞對刺激

具低反應性。

因此，在此項技術中需要使用NK細胞調節來向患者提供改善之效益的方法。調節NK細胞活性之化合物(例如抗+NKCIR抗體及其片段)可尤其適用於治療癌症。

【發明內容】

本發明提供治療患有或先前已患有血液惡性疾病或惡性疾病前期之個體的方法。該等方法包含投與該個體治療活性量之抑制NK細胞抑制性受體(NKCIR)之化合物。較佳在個體之疾病程度最小或不可偵測時向個體投與化合物。另外，本發明涵蓋抑制NKCIR(自然殺手細胞抑制性受體)之化合物的用途，其係用於製備一種醫藥組合物，該醫藥組合物用於治療患有或先前已患有血液惡性疾病前期或血液惡性疾病之個體，用於在個體之疾病程度最小或不可偵測時投與至個體，該組合物包含治療活性量之抑制NKCIR(自然殺手細胞抑制性受體)之化合物。

在本發明之一個實施例中，個體患有血液惡性疾病前期。在一特定實施例中，個體患有SMM(潛伏性骨髓瘤)、MGUS(意義未明之單株 γ 球蛋白病)或MDS(骨髓增生不良症候群)。

在本發明之另一實施例中，個體具有或先前已具有血液惡性疾病或與血液惡性疾病發病風險增加相關之基因突變。在一特定實施例中，個體患有或先前已患有白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或淋巴惡性疾病。在一較佳實施例中，個體患有或先前已患有AML(急性骨髓白血病)、MM(多發性

骨髓瘤)、SMM(潛伏性骨髓瘤)、CML(慢性骨髓性白血病)或CLL(慢性淋巴球性白血病)。

在一個實施例中，在投與化合物之前，個體已針對血液惡性疾病或血液惡性疾病前期用第一治療進行治療。該第一治療可選自用以下進行治療：化學治療劑、免疫調節劑、放射療法、手術、抗激素劑或抗血管生成劑，或任何上述者之組合。較佳地，個體對用第一治療進行之治療有部分反應或完全反應。個體可因第一治療而有所緩解，疾病程度不可偵測，無症狀及/或異常細胞數目較低。

在一個實施例中，血液惡性疾病為白血病，即急性骨髓白血病(AML)。較佳地，個體視情況在以第一治療進行治療後有所緩解，無症狀，疾病程度不可偵測及/或異常細胞數目較低。在一特定實施例中，個體全身白血病負荷低於約 10^9 個細胞及/或骨髓中母細胞小於5%及/或無白血病體征或症狀。

在一個實施例中，血液惡性疾病為骨髓瘤，即多發性骨髓瘤(MM)。較佳地，個體視情況在以第一治療進行治療後有部分或完全反應，有所緩解，無症狀，疾病程度不可偵測及/或異常細胞數目較低。在一特定實施例中，個體之血清蛋白M含量降低25%以上。較佳地，個體之血清蛋白M含量降低50%以上。

在一個實施例中，血液惡性疾病為潛伏性多發性骨髓瘤(SMM)。較佳地，個體視情況在以第一治療進行治療後有部分或完全反應，有所緩解，無症狀，疾病程度不可偵測

及/或異常細胞數目較低。在本發明之一特定態樣中，個體骨髓中有10%或10%以上漿細胞，但其不符合多發性骨髓瘤(MM)之準則。在本發明之另一態樣中，個體之血清M蛋白 ≥ 3 g/dL。在本發明之另一態樣中，個體骨髓中有10%或10%以上漿細胞而無終末器官損傷(CRAB)跡象。在另一實施例中，個體之血清M蛋白 ≥ 3 g/dL，且該個體骨髓中亦有10%或10%以上漿細胞，其視情況進一步無終末器官損傷跡象。

在一個實施例中，血液惡性疾病為無症狀性意義未知之單株 γ 球蛋白病(MGUS)。在該實施例中，個體骨髓中較佳有10%以下之漿細胞。

本發明亦涵蓋方法，其包含：

- (a) 確定患有或已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測；及
- (b) 若該個體之疾病程度最小或不可偵測，則用治療活性量之抑制NKCIR之化合物治療該個體。

此外，本發明包括方法，其包含：

- (a) 確定個體是否患有潛伏性多發性骨髓瘤(SMM)、無症狀性意義未知之單株 γ 球蛋白病(MGUS)或骨髓增生不良症候群(MDS)；

- (b) 若該個體患有SMM、MGUS或MDS，則用治療活性量之抑制NKCIR之化合物治療該個體。

此外，本發明包括方法，其包含：

- (a) 用第一治療(例如一或多種誘導療法及視情況選用之

一或多種鞏固療法)治療患有血液惡性疾病之個體，視情況其中該第一治療為化學治療劑或免疫調節劑(例如Imid)，以使個體之疾病程度最小或不可偵測(例如疾病有所緩解及/或個體對第一治療有反應)；

(b) 用治療活性量之抑制NKCIR之化合物治療疾病程度最小或不可偵測之個體。視情況，步驟(a)進一步包括確定患有或已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測。

另外，本發明涵蓋化合物之用途，其係用於製備一種組合物，該組合物含有偵測患有或先前已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測的部分，且若該個體之疾病程度最小或不可偵測，則用治療活性量之抑制NKCIR之化合物治療該個體。

本發明亦涵蓋化合物之用途，其係用於製備一種組合物，該組合物含有偵測個體是否患有潛伏性多發性骨髓瘤(SMM)、無症狀性意義未知之單株 γ 球蛋白病(MGUS)或骨髓增生不良症候群(MDS)的部分，且若該個體患有SMM、MGUS或MDS，則用治療活性量之抑制NKCIR之化合物治療該個體。

此外，本發明包括化合物之用途，其係用於製備一種用於治療患有血液惡性疾病之個體的組合物，該組合物以第一治療治療個體，以使個體之疾病程度最小或不可偵測，且用治療活性量之抑制NKCIR之化合物治療疾病程度最小或不可偵測的個體。

在一個實施例中，根據標準醫藥準則來確定患有或已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測，其是否有所緩解，有部分或完全反應及/或具有特定病變(例如SMM、MGUS、AML、CML、MDS、MM等)。

在一個實施例中，確定患有或已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測、其是否有所緩解或有部分或完全反應包含鑑別異常細胞之群體或異常細胞數目(例如骨髓中漿細胞之百分比)。視情況，該鑑別係藉由流動式細胞量測術來達成。視情況，該方法進一步包含分選或分離異常細胞群體。

在一個實施例中，確定患有或已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測，其是否有所緩解及/或有完全反應包含偵測細胞遺傳學異常(例如評估核型)。

在一個實施例中，偵測最小程度疾病包含分選異常細胞群體；及使自所分選細胞分離之核酸與一或多種靶向與血液惡性疾病發病可能性提高有關之基因重排的核酸接觸，其中該接觸確定細胞遺傳學異常之存在；從而偵測最小程度疾病之存在。在一個實施例中，遺傳標記為FLT3或NpM1中與患有AML之個體存活之不良預後有關的突變。在另一實施例中，遺傳標記為免疫球蛋白(Ig)及/或T細胞受體基因重排。

在一個實施例中，確定患有或已患有血液惡性疾病之個體的疾病是否程度最小或不可偵測、其是否有所緩解及/或有部分或完全反應(例如在MM中)包含評估個體體內血

清單株蛋白(M蛋白)之含量。

在一個實施例中，確定個體是否患有SMM或MGUS包含評估個體體內血清單株蛋白(M蛋白)之含量；視情況其中若M蛋白含量為至少3 g/dL，則確定該患者患有SMM。在一個實施例中，確定個體是否患有SMM或MGUS包含評估個體體內之骨髓漿細胞；視情況其中若個體具有至少10%骨髓漿細胞，則確定該患者患有SMM。

如上文所論述，基於一或多種預測因素，患者具有不良疾病預後，例如有較高之進展風險。在一個實施例中，患者患有SMM且根據表2中之分類處於第1組內。在一個實施例中，患者有基於基因突變之不良預後，例如患者患有AML且有FLT3或NpM1中與不良預後有關之突變。

在一個實施例中，使用抑制NKCIR之化合物作為單個藥劑。在另一實施例中，抑制NKCIR之化合物與至少一種其他治療劑組合投與。

抑制NKCIR之化合物因抑制該NKCIR而可調節NK細胞之細胞毒性。較佳地，抑制NKCIR之化合物為能夠阻斷或中和NKCIR介導之NK抑制作用且從而增強NK細胞針對以其他方式阻斷之靶細胞之活性的抗NKCIR抗體或抗體片段。在一個實施例中，抗體或抗體片段為針對殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之抗體或其片段。在另一實施例中，抗體或抗體片段為嵌合、人類或人類化抗體或抗體片段。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM。較佳地，抗體或抗體片段

包含 IgG1 或 IgG4。在一個實施例中，抗體或抗體片段包含 Fc 域，該 Fc 域包含至少一個影響效應功能、半衰期、蛋白質水解、FcR 結合或糖基化中之一或多者的突變。

在一特定實施例中，抗體或抗體片段為結合 KIR2DL1 及 KIR2DL2/3 之抗 KIR 抗體或抗體片段。較佳地，抗 KIR 抗體或抗體片段與 1-7F9 競爭。更佳地，抗 KIR 抗體或抗體片段為 1-7F9 或其片段。亦預期抗 KIR 抗體片段為 1-7F9 中與 1-7F9 具有相同結合特性之片段。在一個態樣中，抗 KIR 抗體或抗體片段包含與 1-7F9 之 VL 域及 VH 域至少 90% 一致的 VL 域及 VH 域。在另一態樣中，抗 KIR 抗體或抗體片段包含 1-7F9 之 VL 域及 VH 域。在另一態樣中，抗 KIR 抗體或抗體片段之 VL 包含 1-7F9 之 VL CDR。在另一態樣中，抗 KIR 抗體或抗體片段之 VH 包含 1-7F9 之 VH CDR。

在一個實施例中，抗 KIR 抗體或抗體片段包含胺基酸序列與 1-7F9 具有至少 80% 序列一致性、與 1-7F9 具有至少 90% 序列一致性、與 1-7F9 具有至少 95% 序列一致性，或與 1-7F9 具有至少 98% 序列一致性的多肽。在另一實施例中，抗 KIR 抗體或抗體片段與 1-7F9 一樣特異性結合至完整 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 上之同一線性或構形抗原決定基，及 / 或與 1-7F9 競爭結合至完整 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 上之同一線性或構形抗原決定基。

在另一實施例中，抗體或抗體片段為針對選自由 CD94、NKG2(例如 NKG2A 及 NKG2E) 及 LIR(例如 LILRB1 至 B5) 組成之群之 NKCIR 的抗體或其片段。

在本發明之一個實施例中，抗 NKCIR 抗體以包含治療有效量之抗 NKCIR 抗體之醫藥學上可接受之組合物形式投與。在一個態樣中，投與一定量 NKCIR 抗體以使得 NK 細胞上之 NKCIR 實質上完全飽和至少約 1 週、至少約 2 週或至少約一個月之時期。

在一個態樣中，以一定量及一定頻率進行抗體給藥以使得 NK 細胞上之 NKCIR 實質上完全飽和至少約 1 週、至少約 2 週或至少約 1 個月之時期而在治療期內無顯著「去飽和」。在一個實施例中，一或多種 NKCIR 抗體之治療活性量為在投與抗體後該抗體使得 NK 細胞上之 NKCIR 實質上完全飽和至少約 1 週、約 2 週或約 1 個月之時期的量，其中以約每 2 週一次、約每月一次或約每 2 個月一次或更長時間一次之給藥頻率多次投與抗體且後繼給藥相隔約 2 週或約 1 個月。

在一個態樣中，以一定量及一定頻率進行抗體給藥以使得 NK 細胞上之 NKCIR 實質上完全飽和至少約 1 週、至少約 2 週或至少約 1 個月之時期且允許在治療期內出現顯著之「去飽和」。在一個實施例中，一或多種 NKCIR 抗體之治療活性量為在投與抗體後該抗體使得 NK 細胞上之 NKCIR 實質上完全飽和至少約 1 週、約 2 週或約 1 個月之時期的量，其中以約每 2 週一次、約每月一次或約每 2 個月一次之給藥頻率多次投與抗體且後繼給藥相隔約 2 週或約 1 個月。

在另一實施例中，以以下劑量範圍投與抗 NKCIR 抗體或抗體片段：約 0.1 mg/kg 至約 3.0 mg/kg、約 0.3 mg/kg 至約



3.0 mg/kg、約 0.1 mg/kg 至 約 1.0 mg/kg，或 約 1.0 mg/kg 至 約 3.0 mg/kg。較佳地，約 每 2 個月 一 次 投 與 抗 NKCIR 抗 體 或 抗 體 片 段。

在 另 一 態 樣 中，上 述 各 種 方 法 中 之 任 一 者 可 視 情 況 藉 由 以 一 或 多 種 其 他 抗 癌 劑 (例 如 化 學 治 療 劑) 施 用 化 學 治 療 而 進 一 步 改 良 。

在 另 一 實 施 例 中，提 供 用 於 人 類 治 療 之 醫 藥 組 合 物，其 含 有 本 發 明 之 抗 NKCIR 抗 體 或 抗 體 片 段 及 醫 藥 學 上 可 接 受 之 載 劑 或 賦 形 劑，其 在 投 與 至 普 通 人 類 個 體 (體 重 為 約 45 至 90 公 斤) 後 產 生 以 下 劑 量 範 圍：約 0.1 mg/kg 至 約 3.0 mg/kg、約 0.3 mg/kg 至 約 3.0 mg/kg、約 0.1 mg/kg 至 約 1.0 mg/kg，或 約 1.0 mg/kg 至 約 3.0 mg/kg。在 特 定 實 施 例 中，組 合 物 在 投 與 至 普 通 人 類 個 體 後 產 生 約 0.1 mg/kg 至 0.3 mg/kg，及 更 尤 其 0.2 mg/kg 或 約 0.3 mg/kg 之 劑 量 範 圍 。

本 發 明 亦 涵 蓋 治 療 患 有 疾 病 之 個 體 及 / 或 增 強 有 需 要 之 個 體 之 NK 細 胞 活 性 的 方 法。該 方 法 包 含 對 該 個 體 投 與 向 人 類 患 者 提 供 約 0.1 mg/kg 至 約 0.3 mg/kg 之 劑 量 之 量 的 抗 NKCIR 抗 體 或 抗 體 片 段 及 醫 藥 學 上 可 接 受 之 載 劑，其 中 至 多 每 月 一 次 投 與 抗 NKCIR 抗 體 或 抗 體 片 段。另 外，本 發 明 涵 蓋 向 人 類 患 者 提 供 約 0.1 mg/kg 至 約 0.3 mg/kg 之 劑 量 之 量 的 抗 NKCIR 抗 體 或 抗 體 片 段 及 醫 藥 學 上 可 接 受 之 載 劑 的 用 途，其 係 用 於 製 備 用 於 人 類 治 療 之 醫 藥 組 合 物。在 一 個 實 施 例 中，至 多 每 兩 個 月 一 次 投 與 抗 NKCIR 抗 體 或 抗 體 片 段。在 另 一 實 施 例 中，每 月 一 次 至 每 兩 個 月 一 次 投 與 抗

NKCIR抗體或抗體片段。在另一實施例中，向人類患者提供約0.1 mg/kg至約0.2 mg/kg之劑量的抗NKCIR抗體或抗體。

此等態樣更充分描述於本文提供之[實施方式]中，且本發明之其他態樣、特徵及優勢將自本文提供之[實施方式]顯而易見。

【實施方式】

本發明提供治療患有或先前已患有血液惡性疾病或惡性疾病前期之個體的方法。該等方法包含投與該個體治療活性量之抑制NK細胞抑制性受體(NKCIR)之化合物。在個體所患有之疾病程度最小或不可偵測時向該個體投與化合物。

本文所述之人類臨床試驗展示以阻斷涉及NK細胞之細胞毒性之NK細胞抑制受體的化合物(例如抗NKCIR抗體)進行治療可極大地延長罹患血液惡性疾病但在以化合物治療時有所緩解及/或疾病程度最小或不可偵測的患者之無病存活期。

抗體

除非另外說明或與上下文明顯相抵觸，否則術語抗體在本發明之上下文中係指免疫球蛋白(Ig)分子、Ig分子之片段或其任一者之衍生物，其能夠(a)在典型生理條件下特異性結合至至少一種靶抗原並維持有效時段及/或(b)調節與其靶NKCIR有關之生理反應，諸如調節KIR調節之NK細胞活性。有效時段就此而言意謂任何適於在標準免疫分析法

(諸如酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA))中偵測抗體-抗原複合物的時期。通常，有效時段為至少約30分鐘、至少約45分鐘、至少約1小時、至少約2小時、至少約4小時、至少約8小時、至少約12小時、約24小時或24小時以上、約48小時或48小時以上等之時期。

免疫球蛋白為一類結構相關蛋白質，其包含重鏈(例如 α 鏈、 Δ 鏈、 ϵ 鏈、 γ 鏈及 μ 鏈)及輕鏈(例如 κ 鏈及 λ 鏈)。在人類中，免疫球蛋白可根據Ig分子中所含之重鏈而分為五個主要類別(IgA、IgD、IgE、IgG及IgM)。

免疫球蛋白之結構經充分表徵。參見例如Fundamental Immunology(Paul, W. 編，第2版，Raven Press, N.Y. (1989))。IgG分子為最常見類型之免疫球蛋白，包含兩對多肽鏈，一對輕(L)(低分子量)鏈及一對重(H)鏈，所有四條鏈由二硫鍵相互連接。簡言之，各重鏈通常包含重鏈可變區(在本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區通常包含三個結構域，即CH1、CH2及CH3。各輕鏈通常包含輕鏈可變區(在本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區通常包含一個結構域，即CL。VH區及VL區可進一步再分成具高變性之區域(或高變區，其在結構確定之環的序列及/或形式方面具高變性)，其亦稱為互補決定區(CDR)，與稱為構架區(FR)之較保守區域交替。在天然產生之全長抗體中，各VH及VL通常由3個CDR及4個FR構成，其自胺基端至羧基端按以下次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(在高變環

區之狀況下，其在輕鏈可變域中亦可稱為FR L1、CDR L1等或環L1、L2、L3，且在重鏈域中稱為環H1、H2及H3(參見例如 Chothia及 Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。通常，藉由 Kabat 等人， Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 中所述之方法對此區中之胺基酸殘基進行編號(本文中諸如「如 Kabat 中之可變域殘基編號」及「根據 Kabat」之短語係指此用於重鏈可變域或輕鏈可變域之編號系統)。使用此編號系統，肽之實際線性胺基酸序列可含有對應於縮短可變域之 FR 或 CDR 或插入可變域之 FR 或 CDR 中的較少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可包括在 CDR H2 之殘基 52 後單個胺基酸插入(根據 Kabat 之殘基 52a)及在重鏈 FR 殘基 82 後插入之殘基(例如根據 Kabat 之殘基 82a、82b 及 82c 等)。可藉由在抗體之序列之同源性區域中與「標準」Kabat 編號序列比對來確定既定抗體之殘基的 Kabat 編號。

如上文所指示，抗 NKCIR 抗體可呈(或包含)保持特異性結合至 NKCIR 之能力的抗體「片段」形式。該等抗體片段特徵在於在適當程度上具有在本文別處所述之與全長抗體有關之上述特徵中之任一者或組合(例如，許多抗體片段缺少 Fc 域且因此不誘導或促進抗體相關補體功能)。抗體之抗原結合功能可由其多種適合片段發揮。抗體片段之實例包括(i)Fab 片段，其為基本上由 VL、VH、CL 及 CH I 域組成之單價片段；(ii)F(ab)₂ 及 F(ab')₂ 片段，其為包含由鉸



鏈區之二硫橋鍵連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii)基本上由VH及CH1域組成之Fd片段；(iv)基本上由抗體單臂之VL及VH域組成之Fv片段；(v)dAb片段(Ward等人，(1989) Nature 341:544-546)，其基本上由VH域組成；及(vi)分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域(即VL及VH)係由各別基因編碼，但可使用重組方法藉由能夠使其成為單一蛋白質鏈之合成連接子將其接合，其中VL與VH區配對形成單價分子(稱作單鏈抗體或單鏈Fv(scFv)；參見例如Bird等人，(1988) Science 242:423-426；及Huston等人，(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。除非另外說明或上下文明確指示，否則該等單鏈抗體亦涵蓋於諸如抗體片段及抗體樣肽/分子之術語中。其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體亦意欲由此等術語所涵蓋。雙功能抗體為二價雙特異性抗體，其中VH及VL域表現於單一多肽鏈上，但所使用之連接子通常過短而不允許兩個域在同一鏈上配對，從而迫使該等域與另一鏈之互補域配對且形成兩個抗原結合位點(參見例如Holliger, P.等人，(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R. J.等人，(1994) Structure 2:1121-1123；及Cao等人，(1998), Bioconjugate Chem. 9, 635-644)。儘管與全長抗體具有相似之結合特性，但該等抗體片段共同且各自獨立地為本發明之獨特特徵，展現與抗體不同之生物學及/或物理化學特性及效用。由本發明提供之此等及其他適用之抗體片段及抗體樣分子進一步論述於本文中。應一般瞭

解，除非另外說明或與上下文明顯相抵觸，否則任何適合之抗體片段可用作本文所述之本發明組合物及方法中之抗體的替代物，且反之亦然。

在一般意義上，術語抗體包括多株抗體及單株抗體(mAb)。術語「單株抗體」係指包含具有均一結構及特異性之同源性抗體群體的組合物。多株抗體通常源自經免疫原性激發之動物的血清，但其亦可藉由重組技術獲得。抗KIR抗體可視作單株抗體，與其產生方式無關。

所產生之抗體可具有任何同型且之後可使用此項技術中熟知之習知技術使抗體進行同型轉變。該等技術包括使用直接重組技術(參見例如美國專利4,816,397)、細胞-細胞融合技術(參見例如美國專利5,916,771)及其他此項技術中已知之適合技術。由此，例如，由本發明提供之多特異性多價抗體之效應功能可藉由同型轉變成例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE 或 IgM 抗體而相對於一或兩個親本抗體之同型有所「改變」以用於各種治療用途。

NK細胞活性調節受體(NKCAMR)

NK細胞活性由NK細胞活性調節受體(「NKCAMR」或簡稱為「AMR」)所調節，該等NK細胞活性調節受體可能對各種配體(諸如 MHC-I 分子、MHC-I 同源物、或靶細胞上表現之其他生物分子)具特異性。NK細胞在個體體內通常呈現多種活化受體及抑制性受體。NK細胞之活性係藉由經由此等活化受體及抑制性受體所轉導之信號的平衡來調節。隨後在下文中簡要論述各類型之NKCAMR。

當體細胞處於應激下(諸如處於癌症進展或感染中)時，諸如MICA及MICB之各種分子通常呈現於受應激之細胞表面上且所呈現之MHC-I分子通常自細胞表面「喪失」(數目減少及/或糖基化以使其不被免疫系統「視作」是「外來物」)。NKCAMR對潛在NK靶細胞中與細胞應激、疾病及病症有關之此等及其他變化敏感。

大部分NKCAMR似乎屬於兩類蛋白質中之一類：免疫球蛋白(Ig)樣受體超家族(IgSF)或C型凝集素樣受體(CTLR)超家族(參見例如Radaev及Sun, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2003 32:93-114)。然而，已知其他形式之NKCAMR。多種NKCAMR之結構已經闡明(同前)。為較好說明本發明，本文參考特定實例描述已充分瞭解之各類型NKCAMR。然而，除本文明確描述之彼等受體之外，亦已知若干其他NKCAMR(參見例如Farag等人，Expert Opin. Biol. Ther. 3(2):237-250)，且本文所述之本發明組合物及方法通常亦適用於此等及其他NKCAMR。

NK細胞活化受體(NKCAR)

許多NK細胞活化受體(NKCAR)屬於Ig超家族(IgSF)(該等受體在本文中亦可稱為Ig樣受體或「ILR」)。活化ILR NK受體(AILR)包括例如CD2、CD16、CD69、DNAX輔助分子-1(DNAM-1)、2B4、NK1.1；殺手免疫球蛋白(Ig)樣活化受體(KAR)；ILT/LIR；及自然細胞毒性受體(NCR)，諸如NKp44、NKp46及NKp30。若干其他NKCAR屬於CLTR超家族(例如NKRP-1、CD69；CD94/NKG2C及CD94/NKG2E雜

二聚體、NKG2D均二聚體，且在小鼠中，為Ly49之活化同功異型物(諸如Ly49A-D))。其他NKCAR(例如LFA-1及VLA-4)屬於整合素蛋白質超家族且其他活化受體可能具有其他可區別結構。許多NKCAR具有結合至MHC-I分子之細胞外域，及相對較短且缺乏抑制性NK受體所特有之抑制性(ITIM)信號傳導基元的細胞質域。此等受體之跨膜域通常包括有助於其與信號轉導相關分子(諸如CD3 ζ 、Fc ϵ RI γ 、DAP12及DAP10)締合之帶電荷胺基酸殘基(2B4例如似乎為此普遍規律的一個例外)，此等信號轉導相關分子含有稱作『免疫受體基於酪胺酸之活化基元』(ITAM)且傳播NK細胞活化信號的短胺基酸序列。受體2B4在其細胞質尾區含有4個所謂的免疫受體基於酪胺酸之轉換基元(ITSM)；ITSM基元亦可見於NKCAR CS1/CRACC及NTB-A中。2B4及SLAM之細胞質域含有兩個或兩個以上獨特的基於酪胺酸之基元，其類似於活化受體及抑制性受體中所存在之基元且可募集含有SH2域之蛋白質SHP-2及SAP(SLAM相關蛋白)。

應激誘導性分子(諸如人類之MIC-A、MIC-B及ULBP以及小鼠之Rae-1及H-60)可用作NKCAR(諸如NKG2D均二聚體)之配體。細胞碳水化合物、病原性抗原及抗體亦可為NKCAR配體。舉例而言，NKR-P1可結合至碳水化合物配體且引起尤其針對展現異常糖基化型態之腫瘤細胞的NK細胞活化。病毒血球凝集素可用作自然細胞毒性受體(NCR)(諸如ILR NKCAR NKp30、NKp44、NKp46及



NKp80)之配體。

NKCAR可直接轉導活化信號或可連同接附分子(adaptor molecule)或其他受體一起起作用(在有時單獨有效之受體之間的協同反應之情況下或在共受體-受體配對之情況下)。舉例而言，NKCAR NCR通常缺乏ITAM且因此經由其跨膜域中之帶電荷殘基結合至接附分子(例如，NKp30與CD3 ζ 鏈締合；NKp44與DAP12及/或KARAP締合；NKp46偶合至CD3 ζ 鏈及FcRI γ 鏈)，其隨後能夠募集蛋白質酪胺酸激酶(PTK)以傳播NK細胞活化信號。CD16為對NK細胞介導之ADCC及細胞激素產生而言重要之NKCAR，其與由CD3 ζ 及/或 γ 鏈形成之均二聚體或雜二聚體締合。NKG2D似乎與NCR及NKCAR在NK細胞活化中起互補及/或協同作用。活化針對特定標靶之NK細胞可能需要多個NKCAR或NCR協同活化，或僅單個受體起作用。包括2B4及NKp80之其他觸發表面分子似乎充當NK細胞活化之共受體。

人類KIR之活化同功異型物(例如KIR2DS及KIR3DS)及鼠類Ly-49蛋白之活化同功異型物(例如Ly-49D及Ly-49H)由某些NK細胞表現。此等分子與其抑制性對應物(論述於下文中)不同之處在於在其相對較短之細胞質域中缺乏抑制性基元(ITIM)及具有與信號轉導多肽(諸如二硫鍵連接之DAP12二聚體)結合之帶電荷跨膜區。

NKCIR NK細胞抑制性受體

ILR(IgSF)NK細胞抑制性受體(NKCIR)(I)包括多種不同人類KIR，其對HLA-A、HLA-B或HLA-C異型具特異性。

KIR可識別特定異型內之多種對偶基因，例如KIR2DL1識別HLA-Cw2、HLA-Cw4及HLA-Cw6異型。CTLR超家族抑制性受體包括CD94/NKG2蛋白質家族之成員，其包含由凝集素樣CD94與NKG2家族之各種成員(諸如NKG2A)形成之受體，且分別識別人類及小鼠之非經典第I類分子HLA-E及Qa-1；及識別小鼠之經典第I類MHC分子之鼠類Ly49分子。進一步相比而言，NKRPIA、Nkrp1f及Nkrp1d為抑制性受體，其配體與MHC無關但為於各種細胞類型(諸如樹突狀細胞、巨噬細胞及淋巴細胞)上表現之CTLR家族成員。

第I類MHC特異性NKCIR包括CTLR Ly-49受體(小鼠)；IgSF受體白血球免疫球蛋白樣受體(LIR)(人類)、KIR(例如p58及p70殺手細胞免疫球蛋白樣受體，人類)及CTLR CD94/NKG2受體(小鼠及人類)。所有MHC-I特異性NKCIR似乎利用共同抑制性機制，該機制顯然涉及在MHC-I結合及募集酪氨酸磷酸酶(例如SHP-1及SHP-2)期間其細胞質域中之ITIM磷酸化成磷酸化之ITIM，從而抑制涉及經由NKCAR活化NK之近端蛋白質酪氨酸激酶(PTK)。

由CTLR醣蛋白形成之抑制性CD94/NKG2雜二聚體包含帶有ITIM之NKG2分子(例如NKG2A)且結合至非經典MHC-I分子(例如人類之HLA-E及小鼠之Qa-1)。

白血球免疫球蛋白樣受體包括若干成員，其含有兩個或四個Ig結構域且在結構上與KIR多肽相關。參見例如Fanger等人，1999 J. Leukocyte Biol. 66:231-236。LIR包

括子族A及B且包括例如LIR-1至LIR-8(其中若干者亦稱作ILT多肽，包括ILT-1、ILT-2、ILT-3、ILT-4、ILT-5及ILT-6)。多肽LIR-1、LIR-2、LIR-3、LIR-5及LIR-8皆含有兩個或兩個以上ITIM抑制性信號傳導結構域。

抑制性Ly-49受體為鼠類第II型膜二硫鍵連接之均二聚體CTLR糖蛋白，其結合至各種MHC-I分子且通常向NK細胞傳遞主要抑制性(負)信號。Ly-49A例如結合至MHC-I分子H-2D^d之 $\alpha 1/\alpha 2$ 域，而Ly-49C結合H-2K^b。人類NK細胞似乎缺乏鼠類Ly-49受體之同源物。實際上，人類NK細胞表現KIR，其未見於小鼠NK細胞中。儘管人類KIR與小鼠Ly-49受體缺乏結構同源性，但其在功能上直系同源：兩種類型之受體結合至靶細胞上之第I類HLA，從而抑制NK介導之細胞毒性。

殺手細胞免疫球蛋白樣受體KIR

一種重要類型之NKCIR為KIR。一般而言，KIR為細胞表面醣蛋白，包含一至三個細胞外免疫球蛋白樣結構域，其由某些T細胞以及大部分人類NK細胞表現。多種KIR經充分表徵(參見例如Carrington及Norman, The KIR Gene Cluster, 2003年5月28日，可經由美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)網站在http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf處得到)。人類KIR包括KIR2DL及KIR3DL。KIR亦可稱作各種其他名稱，諸如CD158e1、CD158k、CD158z、p58 KIR CD158e1(p70)、CD244等(參見例如美國

專利申請案 20040038894 ; Radaev 等人 , Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32:93-114 (2003) ; Cerweknka 等人 , Nat. Rev. Immunol. 1:41-49 (2001) ; Farag 等人 , Expert Opin. Biol. Ther., 3(2):237-250 (2003) ; Biassoni 等人 , J. Cell. Mol. Med., 7(4):376-387 (2003) ; 及 Warren 等人 , British J. Haematology, 121:793-804 (2003) , 其各自以全文引用之方式併入本申請案中) 。多種 KIR 之結構已經闡明且揭示此等蛋白質之間有顯著結構相似性。參見例如 Radaev 等人 (同上) 。

KIR 可在結構上以及功能上進行分類。舉例而言 , 大部分 KIR 具有兩個 Ig 結構域 (58 kDa KIR2D KIR) , 而其他 KIR 具有三個 Ig 結構域 (70 kDa KIR3D KIR) , 其有時可分別稱為 p58 及 p70 分子。KIR 之細胞質尾區長度亦不同。通常 , 具有相對較長細胞質尾區 (L) 之 KIR 傳遞抑制信號 , 而具有短細胞質尾區 (S) 之 KIR 可活化 NK 或 T 細胞反應。對 KIR 之命名因此可基於細胞外域數目 (KIR2D 或 KIR3D) 及細胞質尾區長 (KIR2DL 或 KIR3DL) 或短 (KIR2DS 或 KIR3DS) 。關於 KIR 之其他命名資訊提供於以下 [實施方式] 中。「 KIR 家族 」 之些成員為 NKCAR , 或更尤其為 「 KAR 」 (例如 KIR2DS2 及 KIR2DS4) ; 其通常包含一或多個與具有免疫刺激基元 (ITAM) 之接附分子 (例如 DAP12) 締合之帶電荷跨膜殘基 (例如 Lys) 。抑制性 KIR 之細胞質內部分通常包含一或多個募集磷酸酶之 ITIM 。抑制性 KIR 結合至 HLA 分子之 α_1/α_2 域。抑制性 KIR 似乎並非通常需要與接附分子締合以

具活性。除非另外說明，否則諸如「KIR」及其類似形式之術語係指「KIR家族」之NKCIR成員且諸如「KAR」及其類似形式之術語係指「KIR家族」之NKCAR成員。

KIR可結合MHC-I分子(例如某些第I類HLA異型)，通常引起對抗且可能超過刺激活化信號之負信號傳遞至NK細胞，從而抑制NK細胞殺死相關潛在靶細胞(顯然經由ITIM磷酸化及酪胺酸磷酸酶(例如含有SH2域之蛋白質酪胺酸磷酸酶，諸如SHP-1及SHP-2)募集，引起PTK(例如Syk、TcR及/或ZAP70)去磷酸化及/或LAT/PLC複合物形成，抑制及連帶破壞ITAM級聯)。由於病毒常抑制第I類MHC在其所感染之細胞中表現，所以該等受病毒感染之細胞變得易由NK細胞殺死。由於癌細胞之第I類MHC表現亦常減少或消失，因此此等細胞亦可變得易由NK細胞殺死。感染之細胞亦可在糖基化方面改變結合於MHC中之蛋白質。若此狀況發生，則細胞表現之MHC-I:蛋白質複合物將改變。若NK相關KIR不能結合至此等「外來」複合物，則不能產生抑制信號，且將進行溶解。

所有確定之抑制性KIR似乎與HLA/MHC抗原之不同子集相互作用，視KIR亞型而定。在人類中，具有兩個Ig結構域之KIR(KIR2D)識別HLA-C異型：KIR2DL2(原先稱作p58.2)及密切相關基因產物KIR2DL3皆識別第1組HLA-C異型(Cw1、Cw3、Cw7及Cw8)所共有之抗原決定基，而KIR2DL1(p58.1)識別相應第2組HLA-C異型(Cw2、Cw4、Cw5及Cw6)所共用之抗原決定基。KIR2DL1之特異性似乎

由第2組HLA-C對偶基因之位置80上Lys殘基之存在所決定。KIR2DL2及KIR2DL3識別似乎由位置80上Asn殘基之存在所決定。相當大部分HLA-C對偶基因在位置80上具有Asn或Lys殘基。一種具有三個Ig結構域之KIR(KIR3DL1(p70))識別HLA-Bw4對偶基因所共用之抗原決定基。最終，具有三個Ig結構域之分子的均二聚體(KIR3DL2(p140))識別HLA-A3及HLA-A11。

任一類型(活化或抑制性)之個別MHC-I特異性NK細胞受體通常不與所有第I類MHC分子相互作用，而特異性結合至某些異型(由單個基因座之不同變異體編碼之蛋白質)。此外，個別NK細胞可表現彼此獨立地起作用之多種不同之抑制性及/或活化受體。舉例而言，在人類中，單個個體體內NK細胞間在存在或不存在既定KIR方面有所不同。在人類中亦存在相對高程度之KIR多形現象，其中某些KIR分子存在於一些個體體內，但並非存在於所有個體體內。儘管KIR及其他識別MHC之抑制性受體可由NK細胞共同表現，但在任何既定個體之NK譜系中，通常存在表現單個KIR之細胞；因此，此後一類型之NK細胞之相應NK細胞活性僅由表現特異性MHC-I對偶基因群組之細胞抑制。實際上，新近對群體內KIR基因型多樣性程度之評估表明<0.24%之無關個體預期具有相同基因型。最常見白種人單純型「A」單純型(約47%至59%之出現率)僅含有一個活化KIR基因(KIR2DS4)及六個抑制性KIR基因座(KIR3DL3、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR2DL4、KIR3DL1及



KIR3DL2)。剩餘「B」單純型極為不同且含有2至5個活化KIR基因座(包括KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3及KIR2DS5)。

應注意，KIR可稱作若干別名，如本文在表1中所反映，該表1包括自HUGO基因命名委員會(Hugo Gene Nomenclature Committee)網站(<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html>)及Andre等人，Nature Immunol. 2(8):661 (2001)獲得之資訊。

表1-KIR命名			
KIR	全名	別名	寄存ID
KIR2DL1	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，長細胞質尾區，1	cl-42、nkat1、47.11、p58.1、CD158a	L41267
KIR2DL2	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，長細胞質尾區，2	cl-43、nkat6、CD158b1、p58.2	L76669
KIR2DL3	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，長細胞質尾區，3	cl-6、nkat2、nkat2a、nkat2b、p58.3、CD158b2	L41268
KIR2DL4	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，長細胞質尾區，4	103AS、15.212、CD158d、p70	X97229
KIR2DL5A	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，長細胞質尾區，5A	KIR2DL5.1、CD158f	AF217485
KIR2DL5B	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，長細胞質尾區，5B	KIR2DL5.2、KIR2DL5.3、KIR2DL5.4	AF217486
KIR2DS1	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，短細胞質尾區，1	EB6ActI、EB6ActII、CD158h、p50.1	X89892

KIR	全名	別名	寄存ID
KIR2DS2	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，短細胞質尾區，2	cl-49、nkat5、183ActI、CD158j、p50.2	L76667
KIR2DS3	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，短細胞質尾區，3	nkat7	L76670
KIR2DS4	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，短細胞質尾區，4	cl-39、KKA3、nkat8、CD158i、p50.3	L76671
KIR2DS5	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，短細胞質尾區，5	nkat9、CD158g	L76672
KIR2DP1	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，兩個結構域，假基因1	KIRZ、KIRY、KIR15、KIR2DL6	AF204908
KIR3DL1	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，三個結構域，長細胞質尾區，1	cl-2、NKB1、cl-11、nkat3、NKB1B、AMB11、KIR、CD158e1	L41269
KIR3DL2	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，三個結構域，長細胞質尾區，2	cl-5、nkat4、nkat4a、nkat4b、CD158k、p140	L41270
KIR3DL3	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，三個結構域，長細胞質尾區，3	KIRC1、KIR3DL7、KIR44、CD158z	AF352324
KIR3DS1	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，三個結構域，短細胞質尾區，1	nkat10、CD158e2	L76661
KIR3DP1	殺手細胞免疫球蛋白樣受體，三個結構域，假基因1	KIRX、KIR48、KIR2DS6、KIR3DS2P、CD158c	AF204919、AF204915、AF204917

中和 NKCIR 相關 NK 細胞抑制作用

抗 NKCIR 抗體或者或此外可基於其阻斷或中和 NK 抑制作用且從而增強 NK 細胞針對以其他方式阻斷之靶細胞之

活性的能力來表徵。如上所示，在本發明上下文中可使用結合至至少一種NKCIR足夠長時間以中和NKCIR介導之對NK細胞之NK細胞毒性之抑制作用的抗NKCIR抗體。該等抗NKCIR抗體可以原生形式(例如未結合至細胞毒性劑)直接用作治療劑。本發明之更尤其有利之特徵為與兩種或兩種以上NKCIR交叉反應且中和與該等相關NKCIR中之一些或所有(通常較佳所有)NKCIR有關之抑制性活性的抗NKCIR抗體。

中和性抗NKCIR抗體可部分或完全中和NKCIR介導之對NK細胞之細胞毒性之抑制作用。中和係指對以其他方式存在之抑制信號的任何實質阻斷。可藉由任何適合方法量測中和作用。在一個態樣中，對抑制作用之中和反映在中和性抗KIR抗體使NK與NK靶細胞之特定混合物中之NK細胞介導之特異性溶解相較於通常在實質上相同之情形但不存在抗NKCIR抗體之情況下出現的特異性溶解之量增加至少約20%、較佳至少約30%、至少約40%、至少約50%、至少約60%、至少約75%或75%以上(例如約25%至100%)。當藉由例如與由NK靶細胞與未阻斷相關NKCIR之NK細胞之混合物(100%)及NK細胞與NK靶細胞之混合物(其中NK靶細胞呈現NKCIR之配體)(0%)獲得之鉻釋放毒性測試分析法結果比較來研究抗NKCIR抗體或其他抗體時可測定此態樣中之增加百分比。在抗KIR抗體之狀況下，可與由NK靶細胞與未阻斷相關KIR之NK細胞之混合物(100%)及NK細胞與NK靶細胞之混合物(其中NK靶細胞呈現NK細胞上之

抑制性 KIR 的同源第 I 類 MHC 分子)(0%) 獲得之鉻釋放毒性測試分析法結果進行比較。在一有利態樣中，本發明提供抗 NKCIR 抗體，其誘導在不存在該抗 NKCIR 抗體的情況下不會有效溶解之細胞溶解。或者，中和 NKCIR 抑制性活性可由例如鉻分析法結果來指示，該鉻分析法使用表現一種或若干種抑制性 NKCIR(例如 KIR、NKG2、NKG2A 及 LIR(例如 LILRB1、LILRB5)) 之 NK 細胞純系或轉染物及僅表現一種由 NK 細胞上之一種 NKCIR 所識別之配體(例如 HLA 多肽或對偶基因、HLA-E 等)的靶細胞，其中在抗體存在下獲得之細胞毒性度為在針對 NKCIR 之配體的已知阻斷性抗體存在下所觀測到之細胞毒性的至少約 20%，諸如至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70% 或 70% 以上(例如約 25% 至 100%)。舉例而言，當測試抗 KIR 抗體時，在實質上相同情形下投與抗第 I 類 MHC 分子抗體，諸如當前可自例如 Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA 得到及描述於例如 Shields 等人，Tissue Antigens. 1998 年 5 月；51(5):567-70 中之 W6/32 抗第 I 類 MHC 抗體。

評估 NK 細胞之細胞溶解活性之鉻釋放分析法及其他方法在此項技術中已知。適用於該等分析法之條件亦為熟知的。藉由以下進行典型鉻釋放分析法：用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 標記靶細胞(例如 Cw3 及 / 或 Cw4 陽性細胞株，微量滴定盤中約例如每孔 5000 個細胞)(以使 ^{51}Cr 被活靶細胞吸收且由保留)，洗滌以移除過量放射性，之後在抗 NKCIR 抗體存在或不存在下以適合之效應物：標靶比率(例如約 4:1)暴露於 NK 細

胞約4小時之時期，及量測後續⁵¹Cr含量，從而反映靶細胞死亡及溶解。該分析法之實例描述於例如Moretta等人，1993, J Exp Med 178, 597-604中。在相似分析法中，可用³H-胸苷標記增殖之靶細胞，³H-胸苷可併入複製之DNA中。在NK細胞發揮細胞溶解作用後，靶細胞之DNA快速斷裂且保留在濾液中，而未斷裂之大DNA可收集於過濾器上，因此可量測此等片段之釋放量或³H-胸苷於細胞DNA中之保留量。關於該等分析法之其他實例及相關論述可見於例如PCT申請案第WO2006/072625號中。

在另一態樣中，本發明提供抗NKCIR抗體，其特徵在於能夠與交叉反應性及/或中和性抗NKCIR抗體競爭結合至同源NKCIR及/或能夠與該等已知抗體結合至同一抗原決定區/抗原決定基。短語「與...競爭」在提及特定單株抗體(例如1-7F9等)時意謂在使用重組NKCIR分子或表面表現之NKCIR分子的結合分析法中抗NKCIR抗體與參考抗體或其他分子競爭。舉例而言，若抗KIR抗體在結合分析法中可偵測地抑制1-7F9結合至通常由1-7F9結合之KIR分子，則該抗KIR抗體可稱為與1-7F9「競爭」。與1-7F9「競爭」之抗KIR抗體可與1-7F9競爭結合至KIR2DL1人類受體、KIR2DL2/3人類受體，或KIR2DL1及KIR2DL2/3人類受體兩者。

儘管常相關，但在與參考結合蛋白競爭方面相較於蛋白質與參考蛋白結合至同一或實質上相似抗原決定基之能力描述蛋白質在一些狀況下表示顯著不同之生物學及物理化

學特性。結合蛋白之間的競爭表示測試抗NKCIR抗體結合至與抗NKCIR抗體所結合之抗原決定基至少部分重疊或位於與該抗原決定基足夠近的位置上以使該抗KIR抗體因位阻而與已知抗NKCIR抗體競爭的抗原決定基。抗NKCIR抗體可在不結合至相同或相似抗原決定基之情況下因抗體尺寸較大而與參考抗NKCIR抗體競爭。該種競爭性抗NKCIR抗體即使結合不同抗原決定子亦可適用於阻斷與和參考抗NKCIR抗體相同的抗原決定區有關之相互作用。

在另一例示性態樣中，本發明提供一種抗NKCIR抗體，其與抗NCKIR抗體(諸如1-7F9、DF200及/或NKVSF1(針對KIR)，或抗體Z199(針對NKG2A，可自Beckman Coulter, CA獲得)等)結合至實質上相同之抗原決定區。

競爭係指在結合於結合搭配物之另一分子存在下特定分子結合特定結合搭配物之傾向的任何顯著降低。通常，競爭意謂在競爭性分子(例如抗KIR抗體)存在下例如抗KIR抗體與至少一種KIR之間的結合減少至少約15%，諸如結合減少至少約20%(例如結合減少約25%或25%以上、約30%或30%以上、約15%至35%等)。在某些情形下，諸如在屬於競爭性抗體之抗原決定基緊密地位於抗原中的狀況下，競爭可由以下來指示：受體(例如KIR)結合約40%以上相對抑制、至少約50%抑制、至少約55%抑制、至少約60%抑制、至少約75%抑制或更高程度之抑制，例如約45%至95%之抑制程度。

評估競爭通常涉及使用第一量之第一分子(例如抗KIR抗

體)；第二量之第二分子(例如已知抗KIR抗體)；及第三量之第三分子(例如KIR)評估相對抑制性結合，其中第一量、第二量及第三量皆足以使得比較得以進行以提供關於相關分子相對於提供之其他分子之選擇性及/或特異性的資訊。通常，對於ELISA競爭分析法，使用約5 μg至50 μg(例如約10 μg至50 μg、約20 μg至50 μg、約5 μg至20 μg、約10 μg至20 μg等)之抗KIR抗體、已知抗KIR抗體及至少一種KIR評估是否存在競爭。條件亦應適於使競爭性分子結合至其假定/已知標靶。生理條件或接近生理條件(例如約20°C至40°C之溫度、約7至8之pH值等)可通常適用於抗KIR抗體:KIR。

可藉由使用免疫分析法來測定兩個或兩個以上分子之間的競爭(或相對結合抑制)，在該等免疫分析法中，將對照NKCIR結合分子(例如1-7F9)與測試抗NKCIR抗體混合(或預先吸附)且施加於含有相關KIR(諸如KIR2DL1及KIR2DL2/3兩者)之樣品中，該等KIR各自已知由DF200結合。基於ELISA、放射免疫分析法、西方墨點法及其類似分析法之方案適用於該等競爭研究中。通常在適於分子結合之條件(例如，生理條件，尤其在抗體結合構形/非線性抗原決定基之狀況下)下進行競爭ELISA。競爭亦可藉由例如流動式細胞量測測試、SPR分析及其他技術來評估，該等技術見於例如Harlow等人，Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988)；Colligan等人編，Current Protocols

in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)；Ausubel等人編，Short Protocols in Molecular Biology, (第5版)，John Wiley & Sons (2002)；及 Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983) 中。

可由多種已知技術鑑別抗原決定區或抗原決定基。舉例而言，可藉由「足跡(foot printing)」分析法，諸如經由化學修飾標靶NKCIR蛋白質中暴露之胺/羧基快速鑑別抗原決定區。該足跡技術之一個特定實例為使用藉由質譜(HXMS)偵測之氫-氘交換，其中受體與配體蛋白質醯胺質子進行氫/氘交換，結合且進行反向交換(back exchange)，其中參與蛋白結合之主鏈醯胺基受保護而免於反向交換且因此保持氘化。此時可藉由胃蛋白酶蛋白質溶解、快速微孔高效液相層析分離及/或電噴霧電離質譜鑑別相關區域。參見例如 Ehring H, Analytical Biochemistry, 第267(2)卷，第252-259頁(1999)及/或 Engen, J.R. 及 Smith, D.L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A。

適合抗原決定基鑑別技術之另一實例為核磁共振(NMR)抗原決定基定位，其中通常比較游離抗原及與抗原結合肽(諸如抗體)複合之抗原的二維NMR譜中信號之位置。通常用¹⁵N選擇性同位素標記抗原，以使在NMR譜中僅可見到對應於抗原之信號而不可見來自抗原結合肽之信號。源自涉及與抗原結合肽相互作用之胺基酸的抗原信號在複合物之譜中通常相較於在游離抗原之譜中移動位置，且涉及結



合之胺基酸可以彼方式鑑別。參見例如 Ernst Schering Res Found Workshop. 2004;(44):149-67；Huang等人，Journal of Molecular Biology, 第281(1)卷，第61-67頁(1998)；及 Saito及 Patterson, Methods. 1996年6月；9(3):516-24。

亦可使用質譜法進行抗原決定基定位/表徵。參見例如 Downard, J Mass Spectrom. 2000年4月；35(4):493-503；以及 Kiselar及 Downard, Anal Chem. 1999年5月1日；71(9):1792-801。

在抗原決定基定位及鑑別之情況下亦可使用蛋白酶消化技術。可藉由蛋白酶消化，例如藉由在37°C及pH 7-8下以約1:50之比率使用胰蛋白酶對NKCIR進行隔夜消化，繼而進行質譜(MS)分析以用於肽鑑別來確定抗原決定子相關區域/序列。隨後可藉由比較進行胰蛋白酶消化之樣品與連同抗體一起培育且接著由例如胰蛋白酶進行消化(從而揭露結合子之足跡)之樣品來鑑別由抗NKCIR結合子保護而免於胰蛋白酶裂解之肽。其他酶(如胰凝乳酶、胃蛋白酶等)或者或此外可用於相似抗原決定基表徵方法中。此外，酶促消化可提供在未表面暴露且因此在抗原性方面很可能不相關之抗NKCIR多肽的情況下分析潛在抗原決定子序列是否處於NKCIR之區域內的快速方法。關於對相似技術之論述，參見例如 Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991; 27(1):15-9。

各種噬菌體呈現技術亦可用於鑑別抗原決定基。參見例如 Wang及 Yu, Curr Drug Targets. 2004年1月；5(1):1-15；

Burton, Immunotechnology. 1995年8月；1(2):87-94；Cortese等人，Immunotechnology. 1995年8月；1(2):87-94；及Irving等人，Curr Opin Chem Biol. 2001年6月；5(3):314-24。共同抗原決定基亦可經由改良之噬菌體呈現相關技術來鑑別（參見Mumey等人，J. Comput. Biol. 10:555-567；及Mumey, *Proceedings of the Sixth Annual International Conference on Computational Molecular Biology (RECOMB-02)*, 第233-240頁(ACM Press, New York))(關於論述，亦參見Bailey等人，Protein Science (2003), 12:2453-2475；Dromey等人，J Immunol. 2004年4月1日；172(7):4084-90；Parker等人，Mol Biotechnol. 2002年1月；20(1):49-62；及Czompoly等人，Biochem Biophys Res Commun. 2003年8月8日；307(4):791-6)。

藉由兩種KIR結合分子(其中一者經結合生物素(例如已知抗KIR抗體)或以其他方式經類似標記)競爭性結合至KIR來進行抗原決定基定位為另一種鑑別相關抗原決定區之方法。

其他可能有助於定位抗原決定基之方法包括結晶學技術、X射線繞射技術(諸如由Poljak及他人在二十世紀70年代至80年代研發之X射線繞射/序列研究技術)，及應用多針肽合成技術(Multipin Peptide Synthesis Technology)。

基於電腦之方法(諸如序列分析以及三維結構分析及對接)亦可用於鑑別抗原決定子。舉例而言，亦可藉由使用NKCIR或其部分之結構在對接個別mAb之Fab片段之結構



的情況下進行分子建模來確定抗原決定基。必要時，可藉由使用程式(諸如分子操作環境(Molecular Operating Environment, MOE)，其可自Chemical Computing Group(Montreal, Quebec, Canada-www.chemcomp.com)獲得)以經結構表徵之NKCIR進行同源性建模來得到NKCIR之模型。此等及其他定位方法論述於Epitope Mapping A Practical Approach (Westwood及Hay編) 2001 Oxford University Press中(亦參見Cason, J Virol Methods. 1994年9月；49(2):209-19)。

抗KIR抗體之特徵

有利之抗KIR抗體可基於功能特徵，尤其針對其交叉反應或交叉結合一種以上KIR(諸如一種以上類型之抑制性KIR)之能力及/或有效中和NK抑制信號之能力進行分類。本發明涵蓋使用抗KIR抗體或抗KIR抗體之組合的治療。例示性抗KIR抗體包括(但不限於)抗KIR2DL1抗體及抗KIR2DL2抗體，或抗KIR2DL1抗體及抗KIR2DL3抗體，或抗KIR2DL1抗體及抗KIR2DL2抗體及抗KIR2DL3抗體，或結合至少兩種不同人類抑制性KIR受體基因產物且能夠在表現兩種不同人類抑制性KIR受體中之至少一者之NK細胞中中和KIR介導之對NK細胞毒性之抑制作用的抗KIR抗體，或抗KIR2D抗體及抗KIR3D抗體。

有效結合至一種以上類型之KIR的抗KIR抗體為本發明之尤其有利之特徵。在一特定例示性態樣中，本發明提供結合至NK細胞表面上之至少兩種抑制性KIR受體的抗KIR抗體。在一甚至更特定說明性態樣中，本發明提供結合人

類 KIR2DL 受體之共同抗原決定區的抗 KIR 抗體。在另一甚至更特定態樣中，本發明提供結合至 KIR2DL1、KIR2DL2 及 KIR2DL3 受體之抗 KIR 抗體。

術語「KIR2DL2/3」可用於指 KIR2DL2 及 KIR2DL3 受體中之任一者或兩者。此兩種受體具有極高同源性，為同一基因之對偶基因形式，且被此項技術視作在許多方面可互換。因此，KIR2DL2/3 在某些方面可視作單個抑制性 KIR 分子。雖然與 KIR2DL2/3 交叉反應之抗 KIR 抗體處於本發明範圍內，但 KIR 結合分佈僅包括 KIR2DL2 及 KIR2DL3 之抗 KIR 抗體不視作具「交叉反應性」。

由於 KIR2DL1 或 KID2DL2/3 中之至少一者存在於至少約 90% 之人類群體中，所以 KIR2DL1-KIR2DL2/3 交叉反應性抗 KIR 抗體可促進或增強 NK 對大部分 HLA-C 異型相關細胞(分別為第 2 組 HLA-C 異型及第 1 組 HLA-C 異型)的活性。在治療及/或診斷大部分人類個體中可使用包含具有該交叉反應性之單個 KIR 抗體的組合物，從而不需要對患者進行遺傳識別且減少投與至患者以確保有效結果所需之不同抗體之量。

交叉反應性抗 KIR 抗體可具有任何適合之組成且可藉由多種適合技術獲得。舉例而言，交叉反應性抗 KIR 抗體可包含結合至不同 KIR 之多種 KIR 配體及/或抗 KIR 抗體序列，其可藉由結合、多聚化或(在肽配體之狀況下)藉由包含於融合蛋白中而締合於一起。在另一態樣中，提供抗 KIR 抗體，其包含來自交叉反應性抗 KIR 抗體之抗 KIR 抗體



序列。

可獲得或產生KIR結合序列之交叉反應性抗KIR抗體為已知的。該抗體之實例描述於例如Watzl等人，Tissue Antigens, 56, 第240頁(2000)中。另一實例為抗體NKVSF1(亦稱為pan2D mAb；識別CD158a(KIR2DL1)、CD158b(KIR2DL2)及p50.3(KIR2DS4)之共同抗原決定基)，其具有展示於例如PCT專利申請案WO2006/003179(Innate Pharma; Novo Nordisk; University of Genoa)之圖15中之可變區及CDR序列。與KIR家族之各種成員(包括KIR2DL1及KIR2DL2/3)反應的單株抗體DF200為該交叉反應性抗體之另一實例。產生DF200之融合瘤已以標識號「DF200」、註冊號CNCM I-3224(在2004年6月10日註冊)寄存於CNCM菌種中心(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France)。可產生若干其他單株抗體且證明為交叉反應性抗KIR抗體。其他實例為WO2006/003179中所述之抗體1-7F9及1-4F1。

交叉反應性抗KIR抗體可對其所結合之兩種或兩種以上KIR具有任何適合之親和力及/或親合力。親和力係指抗KIR抗體或其他抗原結合蛋白結合至抗原決定基或抗原決定子之強度。通常，親和力係以解離常數 K_D 來量測，該解離常數 K_D 定義為 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ ，其中 $[Ab-Ag]$ 為抗體-抗原複合物之莫耳濃度， $[Ab]$ 為未結合之抗體的莫耳濃度且 $[Ag]$ 為未結合抗原之莫耳濃度。親和常數 K_a 係由 $1/K_D$ 定

義。適用於藉由競爭抑制、平衡透析及其類似方法確定結合肽特異性及親和力的方法可見於例如 Harlow 等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988)；Colligan等人編，*Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)；及 Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983) 中。

通常，本發明提供之抗 KIR 抗體對至少一種 KIR 具有約 10^4 M^{-1} 至約 10^{10} M^{-1} (例如約 10^7 M^{-1} 至約 10^9 M^{-1})範圍內的親和力。本文中之術語免疫反應通常係指抗 KIR 抗體以低於約 10^{-4} M 之解離常數 K_D 結合至 KIR。舉例而言，在一特定態樣中，本發明提供抗 KIR 抗體，其對於 KIR2DL1 及 KIR2DL2/3 之平均解離常數 (K_D) 為約 $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 或 $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以上，如由例如表面電漿子共振 (SPR) 篩選 (諸如藉由以 BIACore™ SPR 分析裝置進行分析) 所測定。在一更特定例示性態樣中，本發明提供抗 KIR 抗體，其對於 KIR2DL2/3 之 K_D 為約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ (例如約 $0.1\text{-}4 \times 10^{-9} \text{ M}$) 或 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以上且對於 KIR2DL1 之 K_D 為約 $11 \times 10^{-9} \text{ M}$ (例如約 $7\text{-}15 \times 10^{-9} \text{ M}$) 或 $11 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以上。

可藉由本文別處所述之任何方法或其在此項技術中之已知等效方法來測定親和力。可用於測定親和力之一種方法的實例係提供於 Munson 及 Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980) 之斯卡查德分析 (Scatchard analysis) 中。結合親和力亦可藉由平衡法 (例如 ELISA 或放射免疫分析 (RIA)) 或動力

學分析(例如 BIACoreTM分析)來測定。

抗KIR抗體或者或此外特徵在於以以下解離常數展現KIR結合：約100 nM以下、約50 nM以下、約10 nM以下、約5 nM或5 nM以下、約1 nM或1 nM以下、約0.5 nM或0.5 nM以下、約0.1 nM或0.1 nM以下、約0.01 nM或0.01 nM以下，或甚至約0.001 nM或0.001 nM以下。

親合力係指結合蛋白與抗原之間總相互作用的總強度(例如抗KIR抗體與KIR之間相互作用之總強度)。親和力為抗體或其他結合肽上之單個抗原結合位點與單個抗原決定基或抗原決定子之間總的非共價相互作用的強度。親合力通常取決於三個主要因素：結合蛋白對其所結合之抗原決定基或抗原決定子之固有親和力、抗體或結合蛋白及抗原之價數(例如價數為3、4或4以上之抗KIR抗體相較於二價抗體對抗原通常展現較高程度之親合力，且二價抗體相較於單價抗體對抗原具有較高親合力，尤其在抗原中存在重複之抗原決定基的情況下)及/或相互作用組分之幾何排列。親合力通常由與用於評估親和力之技術相同類型之技術來量測。

在另一態樣中，本發明提供與來自兩種或兩種以上物種之KIR交叉反應的抗KIR抗體。舉例而言，在一個態樣中，本發明提供與人類及食蟹獮猴之KIR交叉反應的抗KIR抗體。在一特定態樣中，本發明提供與至少兩種人類KIR交叉反應且亦結合至食蟹獮猴之NK細胞的抗KIR抗體。該抗KIR抗體可包含來自或源自展現該交叉反應性概

況之抗體NKVSF1的序列。必要時，可在食蟹獮猴中對該等抗KIR抗體進行毒性測試及其他適用之研究。

可與多種KIR交叉反應之抗體可用於本發明之組合組合物及方法中。該等抗體之例示性交叉反應性概況包括抗體與KIR 2DL1+2DL2/3交叉反應、與3DL1+3DL2交叉反應、與2DL1(及2DL2/3)+2DS4交叉反應，以及與2DL1(及2DL2/3)交叉反應但不與2DS4交叉反應。

由此，例如，本發明方法或組合物可包含如例如WO2005003168中所述結合KIR2DL1、KIR2DL2及KIR2DL3且抑制或阻斷KIR介導之對NK細胞之細胞毒性的抑制作用之抗KIR抗體。

適用於本發明組合方法及組合物中之例示性抗KIR抗體包括如下抗KIR抗體，其包含對應於抗KIR抗體DF200之VL區或基本上由該VL區組成(為實質上相似的且保持相似之結合分佈及親和力)的VL區，或與DF200之VL序列高度相似(例如至少約90%一致或95%一致)之VL序列/域。DF200之VL序列展示於WO2006/3179中。該等抗KIR抗體亦可或者定義為包含DF200之輕鏈可變CDR之集合(亦展示於WO2006/3179中)。該抗體通常亦包含DF200之VH域或高度相似之序列(例如，與DF200 VH域具有高度一致性或者基本上由該序列組成之序列)或DF200之至少重鏈可變CDR(展示於WO2006/3179中)。

如本文所用之術語「序列一致性百分比」或「序列一致性」係指兩個序列之間的一致性百分比，其在考慮間隙數

目及各間隙長度下隨該等序列所共有之一致位置的數目而變，亦即%同源性=一致位置之數目/總位置數目×100，其中需要引入該等間隙以最佳比對兩個序列。可使用如下文非限制性實例中所述之數學演算法來比較序列且測定兩個序列之間的一致性百分比。

可使用 E. Myers 及 W. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1998))之演算法(其已併入 ALIGN 程式(2.0版)中)，使用 PAM120 權數殘基表、12之間隙長度罰分及4之間隙罰分來測定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。另外，可使用 Needleman 及 Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))演算法(已併入 GCG 套裝軟體中之 GAP 程式中)(可在 www.gcg.com 上得到)，使用 Blossum 62矩陣或 PAM250 矩陣及 16、14、12、10、8、6 或 4 之間隙權數以及 1、2、3、4、5 或 6 之長度權數來測定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。

在某些情況下，本發明之蛋白質序列可進一步用作「查詢序列」以針對公開資料庫進行搜索，以例如鑑別相關序列。可使用 Altschol 等人，(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 之 XBLAST 程式(2.0版)進行該等搜索。可以 XBLAST 程式(得分=50、字長=3)進行 BLAST 蛋白質搜索以獲得與本發明抗體同源之胺基酸序列。為出於比較目的獲得間隙比對，可如 Altschul 等人，(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 中所述使用間隙 BLAST。當使用 BLAST 及間隙 BLAST 程式時，可使用各別程式(例如 XBLAST 及

NBLAST)之預設參數。參見 www.ncbi.nlm.nih.gov。

在另一例示性態樣中，本發明之組合組合物或方法包括如下抗KIR抗體，其包含對應於抗體1-7F9之VH及VL序列(展示於WO2006/3179中)或與抗體1-7F9之VH及VL序列高度相似(例如基本上由其組成)或至少包含1-7F9之VL及VH CDR的VH及VL序列。

與交叉反應性及/或中和性抗KIR抗體競爭

在另一態樣中，本發明方法或組合物特徵在於包含與此等抗體中之一者或併入本文中之參考文獻中所述之其他抗KIR抗體中之一者(例如1-7F9)競爭的抗KIR抗體。

與例示性抗KIR抗體(諸如DF200、1-7F9及/或NKVSF1)競爭之抗體可使用已知篩選分析法來鑑別。多種該等分析法按常規實踐且在此項技術中為熟知的(參見例如美國專利第5,660,827號，其以引用方式特定併入本文中)。基於例如ELISA、放射免疫分析法、西方墨點法及使用BIACORE分析之方案適用於該等競爭研究中。

可例如預先混合對照抗體(例如DF200、NKVSF1或1-7F9)與不同量之測試抗體(例如以約1:1、1:2、1:10或約1:100之比率)一段時期，之後施加於KIR抗原樣品中。或者，可在暴露於KIR抗原樣品期間簡單地單獨添加且混合對照物及不同量之測試抗體。只要可區分結合抗體與游離抗體(例如藉由使用分離或洗滌技術以消除未結合之抗體)以及對照抗體與測試抗體(例如藉由使用物種特異性或同型特異性二次抗體或藉由以可偵測標記特異性標記對照抗



體)，即能夠確定測試抗體是否降低對照抗體與不同 KIR2DL 抗原之結合，指示測試抗體與對照物識別實質上相同之抗原決定基。(經標記)對照抗體在完全無關抗體(其不結合 KIR)存在下之結合可用作對照高值。對照低值可藉由將經標記之對照抗體與相同但未標記之對照抗體一起培育而獲得，其中將出現競爭且減少經標記抗體之結合。在測試分析法中，經標記抗體反應性在測試抗體存在下顯著降低則指示測試抗體識別實質上相同之抗原決定基，亦即其與經標記之對照抗體競爭。舉例而言，任何在對照抗體：測試抗體之任何比率介於約 1:1 或 1:10 與約 1:100 之間下使對照抗體與 KIR2DL1 及 KIR2DL3 抗原中之一者或兩者的結合減少至少約 50%、諸如至少約 60%、或更佳至少約 70%(例如約 65% 至 100%)的測試抗體即視為與對照物競爭之抗體。

亦可藉由例如流動式細胞量測術評估競爭。在該測試中，可首先將帶有既定 KIR 之細胞與對照抗體一起培育，且接著與經螢光染料或生物素標記之測試抗體一起培育。若在與飽和量之對照抗體一起預培育後所獲得之結合為在未與對照抗體一起預培育下由測試抗體所獲得之結合(如藉助於螢光所量測)的約 80%、較佳約 50%、約 40% 或 40% 以下(例如約 30%)，則稱抗體與對照抗體競爭。或者，若由經標記對照抗體(藉由螢光染料或生物素標記)對與飽和量之測試抗體一起預培育之細胞所獲得的結合為在未與測試抗體一起預培育的情況下所獲得之結合的約 80%、較佳

約 50%、約 40% 或 40% 以下(例如約 30%)，則稱抗體與對照抗體競爭。

亦可有利地使用簡易競爭分析法，其中預先吸附測試抗體且以飽和濃度施加於上面固定有 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 或兩者的表面上。簡易競爭分析法中之表面較佳為 BIACORE 晶片(或其他適用於表面電漿子共振分析之介質)。量測對照抗體與塗有 KIR 之表面的結合。將此單獨對照抗體與含有 KIR 之表面的結合與對照抗體在測試抗體存在下之結合相比較。在測試抗體存在下對照抗體與含有 KIR2DL1 及 KIR2DL2/3 之表面的結合顯著減少指示測試抗體與對照抗體識別實質上相同之抗原決定基，因此測試抗體與對照抗體「競爭」。任何使對照抗體與 KIR2DL1 及 KIR2DL2/3 抗原兩者之結合減少至少約 20% 或 20% 以上、至少約 40%、至少約 50%、至少約 70% 或 70% 以上的測試抗體即可視為與對照抗體競爭之抗體。較佳地，該測試抗體將使對照抗體與至少 KIR2DL1、KIR2DL2 及 KIR2DL3 抗原中之每一者的結合減少至少約 50%(例如至少約 60%、至少約 70% 或 70% 以上)。應瞭解，可顛倒對照抗體與測試抗體之次序；亦即，在競爭分析法中可首先使對照抗體結合至表面且接著之後使測試抗體與表面接觸。較佳地，首先使對 KIR2DL1 及 KIR2DL2/3 抗原具有較高親和力之抗體結合至含有 KIR2DL1 及 KIR2DL2/3 之表面，因為對於第二抗體所觀測到之結合減少(假定該等抗體互相競爭)預期將有較大量值。該等分析法之其他實例提供於本文實例及例如



Saunal及Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41中，該文獻之揭示內容以引用方式併入本文中。

在另一態樣中，本發明方法或組合物特徵在於僅包括不與一種以上KIR交叉反應的抗體。舉例而言，僅對KIR2DL1具特異性之單株抗體已經展示可阻斷KIR2DL1與HLA-Cw4異型以及與Cw4屬於同一組之相似HLA-C異型之間的相互作用(Moretta等人，J Exp Med. 1993;178(2):597-604；其揭示內容以引用方式併入本文中)。在另一實例中，針對KIR2DL2/3之單株抗體亦已經描述可阻斷KIR2DL2/3與HLACw3(或其類似物)異型之間的相互作用(Moretta等人，1993，同上)。視情況，抗體可選自由以下組成之群：GL183(KIR2DL2/3/S2特異性，可自Immunotech, France及Beckton Dickinson, USA獲得)；EB6(KIR2DL1/s1特異性，可自Immunotech, France及Beckton Dickinson, USA獲得)；AZ138(KIR3DL1特異性，可自Moretta等人，Univ. Genova, Italy獲得)；Q66(KIR3DL2特異性，可自Immunotech, France獲得)；及DX9、Z27(KIR3DL1特異性，可自Immunotech, France及Beckton Dickinson, USA獲得)。

抗原決定基

在其他態樣中，本發明提供針對各種KIR上存在之特定抗原區及/或抗原決定基的抗KIR抗體。在一個例示性態樣中，本發明提供在由選自以下之一或多個胺基酸殘基所界定之區域內特異性結合KIR2DL1的抗KIR抗體：胺基酸殘

基 105、106、107、108、109、110、111、127、129、130、131、132、133、134、135、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、181及192。在另一實施例中，本發明提供在由以下一或多個胺基酸殘基所界定之區域中特異性結合至KIR2DL1及KIR 2DL2/3的抗KIR抗體：胺基酸殘基105、106、107、108、109、110、111、127、129、130、131、132、133、134、135、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、181及192。

在另一態樣中，本發明提供抗KIR抗體，其結合至KIR2DL1，但以相對顯著降低之結合親和力(為對KIR2DL1所展現之親和力的約20%或20%以下、約30%或30%以下、約40%或40%以下、約50%或50%以下、約60%或60%以下、約70%或70%以下等)結合至R131為Ala之KIR2DL1突變體。在另一態樣中，本發明提供抗KIR抗體，其結合至KIR2DL1，但以相對降低之結合親和力(為對KIR2DL1所展現之親和力的約20%或20%以下、約30%或30%以下、約40%或40%以下、約50%或50%以下、約60%或60%以下、約70%或70%以下等)結合至R157為Ala之KIR2DL1突變體。在另一態樣中，本發明提供抗KIR抗體，其結合至KIR2DL1，且以相對降低之結合親和力(為對KIR2DL1所展現之親和力的約20%或20%以下、約30%或30%以下、約40%或40%以下、約50%或50%以下、約60%或60%以下、約70%或70%以下等)結合R158為Ala之

KIR2DL1突變體。

在另一態樣中，本發明提供結合至KIR2DL1殘基131、157及158之抗KIR抗體。

在另一態樣中，本發明提供結合至KIR2DS3(R131W)但不結合至野生型KIR2DS3之抗KIR抗體。在另一態樣中，本發明提供結合至KIR2DL1及KIR2DL2/3以及KIR2DS4之抗KIR抗體。在另一態樣中，本發明提供結合至KIR2DL1及KIR2DL2/3兩者，但不結合至KIR2DS4之抗KIR抗體。

為說明抗KIR抗體序列在抗KIR抗體之組成及建構中之用途，此處將描述例示性抗KIR抗體序列及抗體序列變異體。例示性KIR抗體DF200及1-7F9之可變區及CDR之胺基酸及核酸序列亦揭示於PCT申請案第WO2006/003179號中，其揭示內容以引用方式併入本文中。

在一個例示性態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-L1序列：序列Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Tyr Val Ser(SEQ ID NO:43)。在另一態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-L1：序列Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr(SEQ ID NO:44)。

在另一說明性態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其或者或此外包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-L2序列：序列Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr(SEQ ID NO:45)。在另一態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其

或者或此外包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-L2：序列Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser(SEQ ID NO:46)。

在另一說明性方面中，本發明提供一種抗KIR抗體，其或者或此外包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-L3：序列Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Phe Tyr Thr(SEQ ID NO:47)。在另一態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其或者或此外包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-L3：序列His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr(SEQ ID NO:48)。

作為另一例示性特徵，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-H1：序列Gly Phe Ser Phe Thr Phe Tyr Gly Val His(SEQ ID NO:49)。

在另一例示性態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-H2：序列Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser(SEQ ID NO:50)。

在另一例示性態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-H3：序列Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr(SEQ ID NO:51)。

在一不同態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-H1：序



列 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His(SEQ ID NO:52)。

在另一態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-H2：序列 Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly(SEQ ID NO:53)。

本發明之另一態樣具體化為一種抗KIR抗體，其包含由以下序列組成或基本上由以下序列組成的CDR-H3：序列 Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr(SEQ ID NO:54)。

此等CDR序列之基本及新穎特性為能夠與其他必要之CDR及FR序列組合結合至一或多種KIR上呈現之抗原決定基。如上所示，該等序列中之某些殘基可能幾乎不促成KIR抗原決定基結合。此外，該等CDR序列或者或此外可能容許一處或幾處插入而不實質上影響其抗原決定基結合特徵(特異性及/或親和力)。然而，在本發明之另一態樣中，可使該等序列顯著變化以產生適用之變異體。該等變化進一步論述於下文中。

此等例示性CDR序列可彼此組合、與下文所述之變異型CDR序列或其他抗KIR CDR(通常來自KIR結合性抗KIR抗體)組合。在一個例示性態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含選自以下之大部分或所有CDR序列：SEQ ID NO:43、45、47、49、50及51。

在另一說明性態樣中，本發明提供一種抗體，其包含基

本上由以下序列組成之輕鏈可變區(VL)序列：序列 Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Asn Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg(SEQ ID NO:55)。該序列之基本及新穎特性在於其促成KIR結合。此序列中有可能缺失、添加或取代一些胺基酸而不實質影響該等特性。

在另一例示性態樣中，本發明提供一種抗體，其包含基本上由以下序列組成之VL序列：序列 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg(SEQ

ID NO:56)。

若序列呈現於適當情況下，則 SEQ ID NO:55及 SEQ ID NO:56兩者之N端部分在適合宿主細胞中可裂解(例如，SEQ ID NO:55之約前23個胺基酸在充當VL序列(在其為相關肽之全部內含物或表示肽之暴露之N端部分的情況下)之信號序列之後可裂解)。因此，本發明亦提供抗KIR抗體，其包含基本上由SEQ ID NO:55及SEQ ID NO:56之N端截短型式(例如，其中其N端部分之約20個胺基酸已經移除)組成的VL序列。

在另一態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其或者或此外包含基本上由以下序列組成之重鏈可變區(VH)序列：序列 Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:57)。此序列之前20個胺基酸殘基可充當由此序列組成或基本上由此序列組成之肽或位於適當情況下之包含此序列之蛋白質鏈的信號序列。因此，本發明亦提

供一種抗KIR抗體，其包含基本上由SEQ ID NO:57缺少其約前1至20個殘基之片段組成的VH序列。

在另一態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其或者或此外包含基本上由以下序列組成之重鏈可變區(VH)序列：序列Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:58)。此序列之前20個胺基酸殘基可充當由此序列組成或基本上由此序列組成之肽或位於適當情況下之包含此序列之蛋白質鏈的信號序列。因此，本發明亦提供一種抗KIR抗體，其包含基本上由SEQ ID NO:58缺少其約前1至20個殘基之片段組成的VH序列。

在一個態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含基本上由SEQ ID NO:55或其N端截短部分組成的VL序列及基本上由SEQ ID NO:57或其N端截短部分組成的VH序列。

如已提及，抗原結合性抗體序列(諸如抗KIR抗體序列)之適合序列變異體可併入本發明之抗體中。在大部分類型

之抗體序列中進行變異可為適合的。由此，例如，抗KIR抗體可包含變異型恆定序列及/或變異型構架序列。

在一個態樣中，本發明提供一種抗KIR抗體，其包含一或多個變異型CDR序列(亦即，與類似野生型CDR序列不同之處在於一或多處相對於野生型相關序列影響序列之生物學及/或物理化學特性之胺基酸插入、缺失、添加及/或取代的CDR序列)。參見例如PCT申請案第WO2006/072625號中揭示之技術。CDR、VH及VL序列變異體可分別與一或多個「親本」CDR、VH及VL序列(諸如抗KIR mAb DF200及/或抗KIR mAb NKVSF1之CDR、VH及VL序列)展現任何適合程度之一致性。通常，與親本序列結合至基本上相同抗原決定區之變異序列將與親本序列保持至少約40%胺基酸序列一致性，諸如與親本序列保持約50%或50%以上、約60%或60%以上、約70%或70%以上、約75%或75%以上、約80%或80%以上、約85%或85%以上、約90%或90%以上或至少約95%(例如約45%至99%、約55%至99%或約65%至99%)一致性。然而，在一些狀況下，尤其對於靶向基本上相同之抗原決定基的CDR序列，具有較低程度之一致性的變異體可為適合的。

結合至不同抗原決定區或不同抗原決定區集合(或「分佈」)之CDR、VH及VL序列變異體亦可藉由本文別處所述之任何技術(合理設計、突變誘發、定向進化等)而產生。在該等情況下，與親本序列之胺基酸序列一致性程度預期顯著較低。舉例而言，在CDR-L1、CDR-H1、CDR-H2或

CDR H3變異體與親本序列具有不同抗原決定基結合分佈的情況下，促進NKCAMR(諸如KIR)結合之變異體與親本CDR序列可能僅展現約20%至30%胺基酸序列一致性。

PCT申請案第WO2006/072625號進一步提供抗KIR抗體序列之變異體，其包括CDR及可變區序列之特定結構式，該PCT申請案之揭示內容以引用方式併入本文中。

通常，變異體主要因保守性取代而與「親本」序列有所不同；變異體中例如至少約35%、約50%或50%以上、約60%或60%以上、約70%或70%以上、約75%或75%以上、約80%或80%以上、約85%或85%以上、約90%或90%以上、約95%或95%以上(例如約65%至99%)之取代為保守性胺基酸殘基置換。在本發明之上下文中，保守性取代可由PCT專利申請案第WO2006/072625號(Novo Nordisk AS及Innate Pharma SA)之表4、表5及表6中之一或多者中所反映之胺基酸類別內的取代所限定。以引用方式併入本文中之PCT申請案第WO2006/072625號亦描述其他保守性取代分組；藉由選擇保守性較低之取代使功能實質改變；適用於設計及選擇肽變異體之原理；在親水/親水性特性方面保守；使變異型肽之結構維持實質上類似於親本肽之結構，包括在保守性取代、親水特性、重量守恆、二級結構比較或相似性得分(如藉由使用BLAST程式所測定)方面評估肽之相似性的方法；變異體與親本之間的其他變異點/分異點為可接受的；CDR之有利序列變化；引起糖基化改變之序列變異；高變區插入及產生變異型抗體及更一般產

生 CDR 變異體。

在本發明之胺基酸序列的情況下一致性可藉由任何適合技術，通常藉由尼德曼-溫思科比對分析(Needleman-Wunsch alignment analysis)來測定(參見 Needleman 及 Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453)，諸如經由以 ALIGN 2.0 使用 BLOSUM50 評分矩陣(起始間隙罰分為 -12 且擴展罰分為 -2)進行分析而提供(關於對併入 ALIGN 程式中之整體比對技術之論述，參見 Myers 及 Miller, CABIOS (1989) 4:11-17)。ALIGN 2.0 程式之複本可例如經由 San Diego Supercomputer(SDSC) 生物學工作台(Biology Workbench)得到。由於尼德曼-溫思科比對提供兩個序列之間的總體或整體一致性量測結果，故應瞭解可以類似於完全序列之方式使用可為較大肽序列之部分或子序列的目標序列，或者，可使用如由例如史密斯-沃特曼比對(Smith-Waterman alignment)(*J. Mol. Biol.* (1981) 147:195-197)所測定之局部比對值來評估子序列之間的關係，該等局部比對值可經由可用程式獲得(可適用於分析一致性之其他局部比對方法包括應用試誤式局部比對演算法之程式，諸如 FastA 及 BLAST 程式)。用於評估一致性之其他相關方法描述於例如國際專利申請案 WO 03/048185 中。設法對尼德曼-溫思科演算法進行改良之高氏演算法(Gotoh algorithm)或者可用於整體序列比對。參見例如 Gotoh, *J. Mol. Biol.* 162:705-708 (1982)。

抗體產生

單株抗體尤其可使用由 Kohler 等人，Nature, 256:495 (1975)首先描述之融合瘤方法或藉由其他熟知之隨後研發之方法（參見例如 Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))來製備。可藉由化學融合、電融合或任何其他適合技術，用任何適合類型之骨髓瘤、異源骨髓瘤、淋巴母細胞樣細胞(phoblastoid cell)、漿細胞瘤或類似永生化細胞及任何適合類型之抗體表現細胞形成融合瘤及其他融合細胞。

轉型之永生化B細胞亦可用於高效地產生抗體。轉型之B細胞可藉由標準技術，諸如用艾伯斯坦-巴爾病毒 (Epstein Barr Virus)或轉型基因轉型而產生。（參見例如「Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity,」 Zurawaki, V. R. 等人，Monoclonal Antibodies, Kennett R. H. 等人編，Plenum Press, N.Y. 1980, 第19-33頁）。由此，穩定且持續及/或永生化的表現抗NKCIR抗體之細胞及細胞株為本發明之另一特徵。產生抗NKCIR抗體之方法的步驟可包括例如以下步驟：產生可產生抗AMR抗體及/或抗STM抗體之永生化B細胞，使其與適當搭配物融合以產生抗NKCIR抗體，或對其進行定序且使用該等序列產生重組抗NKCIR抗體。

可用作用於重組蛋白質表現之宿主的細胞株在此項技術中為熟知的且包括多種可自美國菌種中心(American Type

Culture Collection, ATCC)獲得的永生化細胞株。此等細胞株尤其包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NSO細胞、SP2細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、猴腎細胞(COS)、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)、A549細胞及多種其他細胞株。其他可使用之細胞株為昆蟲細胞株，諸如Sf9細胞。當將編碼抗體基因之核酸(或含有核酸之載體)引入哺乳動物宿主細胞中時，可藉由培養宿主細胞足以允許抗體在宿主細胞中表現或更佳使抗體分泌至培養宿主細胞之培養基中的一段時期以產生抗體。可使用標準蛋白質純化方法自培養基中回收抗體。抗體在直接表現而無分泌信號時亦可自宿主細胞溶胞物中回收。

可藉由應用多種此項技術中已知之適合技術(包括例如免疫親和管柱純化；硫酸鹽沈澱；層析聚焦；製備型SDS-PAGE及其類似技術)純化來自細胞培養物、細胞溶胞物及轉殖基因動物或由其獲得之生物材料(例如，來自產生抗體之轉殖基因動物之腹水)的抗體。

抗NKCIR抗體亦可在細菌細胞及真核單細胞微生物(諸如酵母)中產生。細菌細胞產生之抗體缺乏正常糖基化且因此就ADCC功能及可能另外與在哺乳動物細胞及/或動物中產生之基本上相同抗體有關之免疫反應的其他態樣而言可能有缺陷。

可使用適用於純化、篩選及選擇抗體之方法，包括WO 2006/072625中所述之方法。可藉由任何適合技術或技術組合篩選及選擇抗NKCIR抗體。舉例而言，可使用多種免

疫分析形式來選擇與特定蛋白質、變異體或片段選擇性結合的抗體。舉例而言，常規使用固相ELISA免疫分析來選擇對蛋白質、蛋白質變異體或其片段具選擇性免疫反應性的抗體。參見Harlow及Lane(同上)。單株抗體之結合親和力可例如藉由Munson等人，Anal. Biochem., 107:220 (1980)之斯卡查德分析來測定。

通常針對諸如藉由抑制NKCIR介導之信號，促進NK細胞經由NKCAR介導之信號活化來調節NK細胞活性的能力來篩選抗NKCIR抗體。已研發多種適用於該等情況之NK細胞分析法，包括例如流動式細胞量測術篩選法。參見例如McGinnes等人，J Immunol Methods 80 1984 70-85。與培養NK細胞、評估NK細胞及其類似方面有關之方法在此項技術中為已知的。參見例如Campbell及Colonna, Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series 第121卷) (2000)。

在抗NKCIR抗體之情況下，NK細胞中和活性可藉由抗NKCIR抗體復原由NKCIR陽性NK細胞引起之靶細胞溶解的能力來表明。亦可藉由各種基於細胞之細胞毒性分析法來評估抗NKCIR抗體相關NK細胞調節(例如KIR抑制)。重導向殺傷實驗(Redirected killing)為一種用於確定NK細胞受體誘導細胞毒性之能力的實驗系統。評估塗佈有對候選受體具特異性之抗體的NK細胞殺死表現抗體所結合之Fc受體之靶細胞的能力。在另一變體中，可在細胞激素釋放分析法中評估與抗KIR抗體有關之NK細胞活性調節作用。

亦可使用與各種抗NKCIR抗體有關之其他生物活性來評估抗NKCIR抗體。舉例而言，可評估抗NKCIR抗體誘導、促進及/或增強由介導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之 IgG_{2a} 、 IgG_3 及一些 IgG_1 子類抗體所誘導之ADCC的能力。可使用鉻釋放分析法評估誘導ADCC的能力。

通常以至少實質上純之形式使用及提供抗NKCIR抗體。實質上純分子為在發現其之組合物中相對於其所屬之分子類別為主要物質的分子(例如，實質上純抗體為發現其之組合物中之主要蛋白質物質)。實質上純物質佔組合物中之此類型分子的至少約50%且通常構成組合物中至少約70重量%、至少約80重量%、至少約85重量%、至少約90重量%、至少約95重量%或95重量%以上百分比之物質。通常，包含抗NKCIR抗體之組合物在組合物中之所有存在之肽物質的情況下或至少相對於建議使用之情況下的實質上活性肽物質展現至少約98%、98%或99%抗NKCIR抗體均質性。舉例而言，肽穩定劑/緩衝劑(諸如白蛋白)可在不妨礙抗NKCIR抗體之活性的情況下有意包括於最終醫藥調配物中，且因此可自該等純度計算中排除。在實質上純組合物之情況下亦可接受不干擾基本活性之雜質的存在。可藉由適於既定化合物之方法(例如層析法；瓊脂糖及/或聚丙烯醯胺凝膠電泳；HPLC分析等)量測純度。

分離之分子係指不與顯著含量(例如約1%以上、約2%以上、約3%以上或約5%以上)之任何外來及不合需要之生物分子(諸如產生抗NKCIR抗體之細胞、細胞培養物、化學

培養基或動物內所含之非抗 NKCIR 抗體生物分子) 締合的分子。分離之分子亦指已因人類干預(自動、手動或兩者)通過該純度階段顯著長時間(例如至少約 10 分鐘、至少約 20 分鐘、至少約 1 小時或更長時間)的任何分子。在本發明提供之許多各種組合物中，諸如在包含一或多種醫藥學上可接受之載劑之組合物中，抗 NKCIR 抗體可以組合物中之全部分子物質之數目計相對較小之量存在(例如，在組合物包含大量醫藥學上可接受之載劑、穩定劑及/或防腐劑的狀況下)。在一些狀況下，諸如 BSA 之其他肽可包括於該含先前純化之抗 NKCIR 抗體之組合物中。然而，假如組合物之該等其他組分可為抗 NKCIR 抗體之預期應用所接受，則仍可將該組合物描述為包含分離之抗 NKCIR 抗體。換言之，術語「分離」不意欲排除與其他化合物或物質之人工或合成混合物，諸如可形成醫藥學上可接受之製劑的一部分。

醫藥學上可接受之載劑

抗 NKCIR 抗體可與一或多種適於一或多種預期投藥途徑之載劑(稀釋劑、賦形劑及其類似物)及/或佐劑組合以提供醫藥學上可接受之組合物。

抗 NKCIR 抗體可例如與以下混合：乳糖、蔗糖、粉末(例如澱粉粉末)、烷酸之纖維素酯、硬脂酸、滑石、硬脂酸鎂、氧化鎂、磷酸及硫酸之鈉鹽及鈣鹽、阿拉伯膠、明膠、海藻酸鈉、聚乙烯吡咯啶及/或聚乙烯醇，且視情況進一步製錠或囊封以用於習知投藥。或者，可將抗 NKCIR



抗體溶解於生理食鹽水、水、聚乙二醇、丙二醇、羧甲基纖維素膠體溶液、乙醇、玉米油、花生油、棉籽油、芝麻油、黃蓍膠及/或各種緩衝劑中。其他載劑、佐劑及投藥方式在醫藥技術中為熟知的。載劑或稀釋劑可包括時間延遲物質，諸如單獨單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯或連同蠟，或其他功能上相似之物質。

醫藥學上可接受之載劑一般包括生理學上與抗NKCIR抗體相容之任何及所有適合之溶劑、分散介質、塗佈劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其類似物。醫藥學上可接受之載劑之實例包括水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物，以及其任何組合。在多種狀況下，在該組合物中可能需要包括例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉之等張劑。醫藥學上可接受之物質(諸如濕潤劑)或少量之助劑物質(諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑)可合乎需要地延長抗KIR抗體、相關組合物或組合之存放期或增強其有效性。載劑及醫藥組合物之其他組分的適合性係根據對抗體之所需生物學特性無顯著負面影響來確定。

本發明之抗NKCIR抗體組合物、相關組合物及組合可呈多種適合形式。該等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、乳液、微乳液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體、樹狀體及其他奈米粒子(參見例如 Baek 等人，Methods Enzymol. 2003; 362:240-9；Nigavekar 等人，Pharm Res.

2004年3月；21(3):476-83)、微粒及栓劑。調配物及鹽進一步描述於PCT申請案第WO2006/072625號中。

通常，呈可注射或可輸注溶液形式之組合物，諸如類似於用於以其他抗體使人類被動免疫之組合物的組合物可用於傳遞本發明之抗NKCIR抗體。傳遞抗NKCIR抗體組合物之典型模式為非經腸投藥(例如靜脈內、皮下、腹膜內及/或肌肉內投藥)。在一個態樣中，藉由靜脈內輸注或注射向人類患者投與抗NKCIR抗體。

用於醫藥用途之組合物亦可包括各種稀釋劑、填充劑、鹽、緩衝劑、清潔劑(例如非離子型清潔劑，諸如Tween-80)、穩定劑(例如糖或無蛋白質胺基酸)、防腐劑、組織固定劑、增溶劑及/或其他適於包括於用於醫藥用途之組合物中之物質。適合組分之實例亦描述於例如Berge等人，J. Pharm. Sci., 66(61), 1-19 (1977)；Wang及Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech: 42, S4-S6 (1988)；美國專利6,165,779及6,225, 289；以及本文引用之其他文獻中。該醫藥組合物亦可包括防腐劑、抗氧化劑或其他為熟習此項技術者所知之添加劑。其他醫藥學上可接受之載劑在此項技術中已知(參見例如WO2006/072625中之參考文獻)。

治療血液惡性疾病

本發明提供治療患有或已患有血液惡性疾病或血液惡性疾病前期之個體的治療方法。該治療涉及抗NKCIR抗體、抗NKCIR抗體組合物及/或相關組合物，其經投與至患有程度最小或不可偵測之疾病的個體。本發明亦提供投與抗

NKCIR抗體以用於對血液惡性疾病進行該治療之較佳治療方案，該等血液惡性疾病包括白血病(例如AML、CML、MDS)及骨髓瘤(例如MM、SMM)及血液惡性疾病前期，諸如MDS、SMM及MGUS。

本文中之術語「治療」係指傳遞有效量之該調配物以達成預防任何症狀或疾病病況產生之目的或達成預防或延遲進展、減輕、改善或消除已產生之該等症狀或疾病病況的目的。術語「治療」由此意欲包括治療如下個體之程度最小或不可偵測之疾病，該個體(i)在第一治療之後有部分反應或完全反應，(ii)有所緩解，(iii)罹患可偵測之疾病(例如AML、MM、MDS)，或(iv)患有惡性疾病前期。由此，所涵蓋之治療包括治療患有SMM或MGUS但尚未患有MM之個體。另外，治療包括治療患有MDS但未患有AML之個體。術語「治療」包括誘導療法及鞏固療法。

如本文所用之術語「不可偵測之疾病」係指疾病之生物學及/或醫學標記已低於細胞學可偵測含量的個體之疾病病況。舉例而言，當患者之全身白血病負荷低於細胞學可偵測含量，亦即約 10^9 個細胞時，患有白血病之患者即稱為患有「不可偵測之疾病」。進一步舉例而言，當實質不存在多發性骨髓瘤之骨髓或血液表現及/或無血清及尿M蛋白組分之跡象時，患有骨髓瘤之患者即稱為患有「不可偵測之疾病」。可使用標準程序評估疾病之生物學及/或醫學標記。舉例而言，可使用電泳及/或免疫固定來評估血清及尿M蛋白含量。

如本文所用之術語「緩解」係指慢性或惡性疾病之臨床及主觀特徵部分或完全消失。

如本文所用之術語「血液惡性疾病前期(hematological pre-malignancy)」及/或「血液惡性疾病前期(hematological pre-malignancies)」係指前癌細胞。此等前癌細胞尚非惡性，但傾向於變成惡性細胞。前癌細胞看上去與正常細胞不同，但其尚未侵襲周圍組織。例示性惡性疾病前期包括(但不限於)MDS、SMM及MGUS。

本文中之術語「血液惡性疾病」包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴惡性疾病以及脾及淋巴結之癌症。例示性淋巴瘤包括B細胞淋巴瘤及T細胞淋巴瘤。B細胞淋巴瘤之非限制性實例包括低級/NHL濾泡細胞淋巴瘤(FCC)、套細胞淋巴瘤(MCL)、彌漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、小淋巴球性(SL)NHL、中級/濾泡性NHL、中級彌漫性NHL、高級免疫母細胞性NHL、高級淋巴母細胞性NHL、高級小無核裂細胞NHL、巨瘤病(bulky disease)NHL、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、淋巴漿細胞樣淋巴瘤(LPL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、彌漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma, BL)、AIDS相關淋巴瘤、單核細胞性B細胞淋巴瘤、血管免疫母細胞性淋巴腺病變；小淋巴球性、濾泡性、彌漫性大細胞、彌漫性小核裂細胞、大細胞免疫母細胞性淋巴母細胞瘤；小非核裂、伯基特氏及非伯基特氏、濾泡性、主要大細胞淋巴瘤；濾泡性、主要小



核裂細胞淋巴瘤；及濾泡性、混合小核裂細胞及大細胞淋巴瘤。T細胞淋巴瘤之非限制性實例包括結外T細胞淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、多形性大細胞淋巴瘤及血管免疫母細胞性T細胞淋巴瘤。血液惡性疾病亦包括白血病，諸如（但不限於）繼發性白血病、慢性淋巴球性白血病（CLL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、B細胞前淋巴球性白血病（B-PLL）、急性淋巴母細胞白血病（ALL）及骨髓增生不良（MDS）。血液惡性疾病進一步包括骨髓瘤，諸如（但不限於）多發性骨髓瘤（MM）及潛伏性多發性骨髓瘤（SMM）。其他血液及/或B細胞或T細胞相關癌症由術語血液惡性疾病所涵蓋。舉例而言，血液惡性疾病亦包括其他造血細胞，包括樹突狀細胞、血小板、紅血球、自然殺手細胞及多形核性白血球（例如嗜酸細胞、嗜伊紅血球、嗜中性白血球及單核細胞）之癌症。

熟習此項技術者應明確的是，此等惡性疾病前期及惡性疾病常因分類系統改變而具有不同名稱，且患有以不同名稱分類之淋巴瘤的患者亦可受益於本發明之組合治療方案。

在一個例示性態樣中，本發明提供降低具有可偵測含量之癌細胞的哺乳動物宿主（諸如人類患者）之血液惡性疾病進展的方法，其包含投與足以可偵測地降低宿主之血液惡性疾病進展之量的抗NKCIR抗體、抗NKCIR抗體組合物或相關組合物（例如編碼抗NKCIR抗體之核酸）。

可藉由針對特定類型之疾病的標準準則來定義疾病或癌

症進展。視情況藉由評估癌啟動細胞(initiated cell)之選擇性純系擴增來確定進展。偵測癌症及癌症進展之方法可藉由任何適合技術達成，該適合技術之若干實例在此項技術中已知。適合技術之實例包括PCR及RT-PCR(例如對癌細胞相關基因或「標記」進行)、活組織檢查、成像技術、核型分析及其他染色體分析、免疫分析法/免疫細胞化學偵測技術、組織學及/或組織病理學分析法、細胞動力學研究及細胞週期分析、流動式細胞量測術及身體檢查技術(例如針對身體症狀)。偵測癌症及癌症進展之例示性方法包括偵測細胞遺傳學異常，例如贅生性遺傳標記，其係藉由分離異常細胞之群體，自異常細胞中分離核酸，及使分離之核酸與一或多種靶向基因重排之寡核苷酸接觸來達成。該接觸偵測細胞遺傳學異常之存在，諸如免疫球蛋白(Ig)及/或T細胞受體基因重排。

向個體傳遞抗NKCIR抗體(藉由直接投藥或使其由核酸表現，諸如由包含編碼抗NKCIR抗體之核酸序列之痘病毒基因轉移載體表現)及實踐本發明之其他方法可用於降低、治療、預防或以其他方式改善癌症進展之任何適合態樣。本發明之方法尤其適用於降低及/或改善腫瘤生長(例如骨髓中漿細胞之百分比、循環中腫瘤細胞之數目)及與其相關之任何參數或症狀(例如M蛋白含量)。獨立地及共同地抑制、預防或以其他方式改善癌症進展之該等態樣的方法為本發明之有利特徵。

降低癌症進展可包括例如以下方面之任何可偵測降低：

(1)轉型成贅生性細胞之正常細胞的比率(或其任何態樣)，
(2)前贅生性(pre-neoplastic)細胞(例如SMM或MGUS)或贅生性細胞之增殖率，(3)展現前贅生性及/或贅生性表型之細胞數目，(4)包含前贅生性及/或贅生性細胞之細胞培養基(例如細胞培養物、組織或器官(例如哺乳動物宿主中之器官))之實體面積，(5)正常細胞及/或前贅生性細胞將轉型成贅生性細胞之機率，(6)癌細胞將進展至癌症進展之下一態樣之機率(例如轉移可能性降低)，或(7)其任何組合。該等變化可使用任何上述技術或此項技術中已知之其適合對應物來偵測，通常在投與治療方案之前的適合時間應用該等技術以評估治療方案之有效性。

在另一態樣中，本發明提供在人類患者中降低癌症進展風險、降低已進入癌啟動期之細胞群體進一步癌症進展之風險及/或提供治療方案以降低癌症進展的方法，其包含以足以達成部分或完全反應之量及方案投與該患者一或多種第一治療(例如誘導療法，諸如化學治療劑)，及投與該患者一定量抗NKCIR抗體或相關組合物(或應用組合投藥方法)。在患者正保持對第一治療之反應同時，例如當患者有所緩解或疾病程度最小時投與抗NKCIR抗體。

抗NKCIR化合物可以單治療劑形式或與其他治療劑組合投與。如本文所用之術語「單治療劑」係指將包含抗NKCIR化合物而不含任何其他醫藥活性劑及/或無額外醫藥活性劑之藥物用於治療個體之特定疾病病狀。或者，在本發明之某些實施例中，抗NKCIR抗體或抗體片段可與其

他治療劑組合投與。舉例而言，可使用多種治療劑來治療癌症。本發明之抗體組合物及方法可與任何其他一般用於治療特定疾病，尤其治療腫瘤、癌症疾病或患者展現之其他疾病或病症的方法組合。只要特定治療方法已知無害於患者病狀本身且不顯著抵消本發明醫藥組合物中之抗體之活性，即涵蓋其與本發明之組合。

對於癌症治療，本發明醫藥組合物可與經典方法，諸如手術、放射療法、化學療法及其類似療法組合使用。本發明因此提供組合療法，其中本發明之醫藥組合物在手術同時、之前或之後使用；或在投與習知化學治療劑、放射治療劑或抗血管生成劑或靶向免疫毒素或凝血配體(coaguligand)同時、之前或之後投與至患者。其他抗癌劑可在投與本發明之抗KIR抗體組合物之前、同時或之後給與。在一些情形下，甚至可能需要顯著延長治療時期，其中在各別投與抗癌劑或抗癌治療與投與本發明抗體組合物之間存在幾天(例如2、3、4、5、6或7天)、幾週(例如2、3、4、5、6、7或8週)或甚至幾個月(例如1、2、3、4、5、6、7或8個月)時間間隔。在抗癌治療意欲實質上破壞腫瘤(諸如手術或化學療法)且投與本發明抗體組合物意欲預防微轉移或腫瘤再生長的情況下，此可能有利。亦設想將利用本發明之基於抗KIR抗體之組合物或抗癌劑之一次以上投藥。此等藥劑可隔日或隔週可互換地投與；或進行以本發明之抗KIR抗體組合物的治療循環，繼而進行抗癌劑療法之循環。無論如何，為使用組合療法達成腫瘤衰退，僅

需要以有效發揮抗癌作用之組合量傳遞兩種藥劑，而與投藥時間無關。

為實踐組合抗癌療法，僅以在患者體內有效產生有利組合抗癌作用之方式投與患者本發明之抗體組合物以及另一抗癌劑。當將一或多種藥劑與本發明之含有抗體之組合物組合用於治療方案中時，組合結果不需要為在單獨進行各治療時所觀測到之作用的累加。儘管一般需要至少疊加效應，但超過單一療法中之一者的任何增強之抗癌作用將為有益的。同樣，不特定需要組合治療展現協同效應，儘管此為可能且有利的。

組合投藥包括共同投與各別調配物或單個醫藥調配物，以及以任一次序連續投與抗NKCIR抗體或抗體片段及第一治療。較佳地，所有所投與之活性劑同時發揮其生物活性。

視患者及癌症階段而定，第一治療可涉及一或多種以下藥劑及/或療法：手術、放射療法、免疫調節劑、化學治療劑、激素療法及抗血管生成劑。亦需要組合投與抗NKCIR抗體或抗體片段與投與另一抗體，例如針對與特定癌症有關之另一腫瘤抗原的抗體。舉例而言，抗NKCIR抗體或抗體片段可與美羅華組合投與。

就手術而言，任何手術干預可與本發明組合實施。

對於放射療法，涵蓋局部誘導癌細胞內DNA損傷之任何機制，諸如 γ 照射、X射線、UV照射、微波及甚至電子發射及其類似物。亦涵蓋將放射性同位素導向性傳遞至癌細

胞，且此可連同靶向抗體或其他靶向方式一起使用。

在其他態樣中，免疫調節劑或方案可與本發明抗體組合物組合投與或作為本發明抗體組合物之一部分投與。免疫調節劑之較佳實例包括細胞激素。各種細胞激素可用於該等組合方法中。適用於本發明所涵蓋之組合中之細胞激素的實例包括 IL- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、TGF- β 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF- α 、TNF- β 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 。根據標準方案，在符合臨床適應症，諸如患者之病狀及細胞激素之相對毒性下投與用於組合治療或本發明組合物中之細胞激素。可與本發明之抗體組合物組合投與或作為本發明抗體組合物之一部分投與之其他免疫調節化合物包括特異性結合至淋巴細胞上之其他抑制性受體的抗體，包括(不限於)抗體，諸如抗CTLA4抗體或抗CD94JNK2A抗體(參見例如美國公開專利申請案20030095965)。此項技術中已知之此等分子之變異體及衍生物或者或此外可用於該等方法中，且適當時併入本發明之組合物中。

在某些實施例中，本發明之包含抗KIR抗體之治療組合物可與化學治療劑或激素治療劑組合投與或可進一步包含化學治療劑或激素治療劑。多種激素治療劑及化學治療劑可用於本文揭示之組合治療方法中。

例示性化學治療劑包括(但不限於)多聚乙醯

(acetogenin)(例如布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))、阿微素(adriamycin)、烷基化劑、烷基礦酸鹽、氮丙啶(例如苯左多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、麥圖多巴(meturedopa)及優多巴(uredopa))、雙膦酸鹽(例如氯屈膦酸鹽(clodronate)、依替膦酸鹽(etidronate)、NE-58095、唑來膦酸(zoledronic acid)/唑來膦酸鹽、阿侖膦酸鹽(alendronate)、帕米膦酸鹽(pamidronate)、替魯膦酸鹽(tiludronate)及利塞膦酸鹽(risedronate))；更生微素(dactinomycin)、 δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol))、伸乙基亞胺及甲基三聚氯胺(例如六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基三聚氯胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氯胺)、 β -拉帕酮(β -lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(例如拓朴替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、乙醯喜樹鹼(acetylcamptothecin)、莨菪亭(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利斯達汀(callystatin)；CC-1065(例如阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；足葉草毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；自念珠藻環肽(cryptophycin)(例如自念珠藻環肽1及自念珠藻環肽8)；海免毒素(dolastatin)；倍癌微素(duocarmycin)(例如KW-2189及CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼

(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)(例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、荼氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、二氯甲二乙胺氧化物鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥(uracil mustard))；亞硝基脲(例如卡莫司汀(carmustine)、吡菊亞硝脲(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷尼司汀(ranimustine))；抗生素，諸如烯二炔類抗生素(例如刺孢黴素(calicheamicin))；達米辛(dynemicin)；艾斯帕米辛(esperamicin)；新制癌菌素發色團(neocarzinostatin chromophore)及色蛋白烯二炔抗生素(例如阿克拉黴素(aclacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、奧斯拉黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycins)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabicin)、洋紅黴素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、克羅米辛(chromomycinis)、更生黴素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氨基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)、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)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodoxurubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)及佐柔比星(zorubicin))；抗代謝物(例如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU))；葉酸類似物(例如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate))；嘌呤類似物(例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprime)、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如環胞苷(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)及氟尿苷(floxuridine))；雄激素(例如二甲睪酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)及睪內酯(testolactone))；抗腎上腺劑(例如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane))；葉酸補充劑(例如夫羅林酸(frolinic acid))；醋菊內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；伊利盧拉(eniluracil)；安吖啶

(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；埃夫密辛(elformithine)；乙酸依利醋銨(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；乙環氧啶(etoglucid)；硝酸鎔；羥脲；香菇多糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)(例如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin))；丙脒腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubiin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；多醣K；丙亞胺(razoxane)；利索新(rhizoxin)；西佐喃(sizofuan)；螺旋錯(spirogermanium)；細格孢氮雜酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquine)；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)(例如T-2毒素、弗納庫林A(verracin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；胺基甲酸酯；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)；雙溴丙基哌嗪(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖昔(arabinoside,「Ara-C」)；噻替派(thiotepa)；紫杉烷(taxoid)(例如紫杉醇(taxol)、紫杉特爾(taxotere)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)及多烯紫杉醇(doxetaxel))；克羅南布(chloranbucil)；吉西他濱

(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺蝶呤；鉑類似物(例如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin))；長春鹼(vinblastine)；鉑；依託泊昔(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；奧賽力鉑(oxaliplatin)；甲醯四氫葉酸(leucovovin)；長春瑞濱(vinorelbine)；諾凡特龍(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基蝶呤(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素(retinoid)(例如視黃酸(retinoic acid))；卡培他濱(capecitabine)；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

如一般技術者所瞭解，與NKCIR抑制劑(例如抗KIR抗體)組合使用之化學治療劑之適當劑量約為涉及投與單獨化學治療劑或連同其他化學治療劑之臨床療法中已使用之劑量。劑量可能出現變化，視所治療之病狀而定。投與治療之醫師將能夠確定用於個別個體之適當劑量。

抗激素劑用於調節、降低、阻斷或抑制可能促進癌症生長之激素的作用。如上所述，本發明之NKCIR抑制劑(例如抗KIR抗體)可與抗激素劑組合使用。例示性抗激素劑包括(但不限於)LHRH促效劑(例如亮丙瑞林(leuprorelin)、戈舍瑞林(goserelin)、曲普瑞林(triptorelin)及布舍瑞林(buserelin))；抗雌激素及選擇性雌激素調節劑(SERM)(例如他莫西芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬

(droloxifene)、4-羥基他莫西芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及托瑞米芬(toremifene))；雌激素受體下調劑(ERD)；抗雄激素(例如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、環丙氟地孕酮(cyproterone)及比卡魯胺(bicalutamide))；芳香酶抑制劑(例如安美達錠(anastrozole)、依西美坦(exemestane)、來曲唑(letrozole)、4(5)-咪唑、胺魯米特、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、弗米斯坦(formestanone)、伏羅唑(vorozole)及法屈唑(fadrozole))；及孕激素(例如甲孕酮(medroxy)、氯地孕酮(chlormadinone)及甲地孕酮(megestrol))。

本發明之NKCIR抑制劑(例如抗KIR抗體)可與任一或多種抗血管生成療法組合使用或可進一步包含抗血管生成劑。抗血管生成劑之非限制性實例包括中和性抗體、反義RNA、siRNA、RNAi、RNA適體及核糖核酸酶，尤其包括抑制涉及異常細胞增殖之信號傳導路徑中之基因表現的抗體，該等基因諸如PKC- α 、Raf、H-Ras、EGF-R、VEGF或VEGF-R。

具治療有效性之此等上述化學治療藥物之給藥方案及劑量將視所治療之特定癌症、疾病程度及其他為具有此項技術中之技能的醫師所熟悉之因素且可由醫師確定。

在另一態樣中，本發明提供促進哺乳動物宿主(諸如人類患者)之癌症緩解的方法，其包含投與該宿主包含抗NKCIR抗體(諸如抗KIR抗體)之組合物以促進宿主之癌症

緩解。

在另一態樣中，本發明提供在哺乳動物宿主中降低產生癌症病狀之風險、縮短癌症病狀發病之時間、降低在早期階段診斷之癌症嚴重程度及/或減少癌症產生時之侵害面積的方法，其包含投與宿主預防有效量之本發明抗NKCIR抗體或相關組合物以達成所需生理作用。較佳地，宿主患有MDS、SMM或MGUS，且癌症病狀為MM，其中抗NKCIR抗體降低產生MM之風險及/或縮短MM發病之時間。

NK細胞計數及活化標記在SMM患者體內顯著增加。通常，患有SMM之個體在以化合物(例如結合NKCIR之抗體)治療之前未經第一治療所治療；然而，本發明亦設想先前經非NKCIR劑治療之SMM患者。

在不受理論限制下，咸信本發明方法在用於疾病程度最小之個體時相較於用於腫瘤負荷較高之患者而言最有效，因為該等方法不尤其適用於恢復有疾病之體征及症狀之個體的NK細胞功能。因此，在一些涉及除前期惡性病狀以外之病變(諸如SMM或MGUS)的實施例中，優先用第一治療治療患者，以使個體之疾病程度最小或不可偵測。舉例而言，以誘導療法且視情況以鞏固療法進行治療可使疾病緩解或產生完全反應，增強本發明方法之功效。

在另一態樣中，本發明提供增加診斷患有癌症之人類患者存活超過相關時期之可能性的方法。在另一態樣中，本發明提供改善癌症患者之生活品質的方法，其包含投與該

誘導療法

AML療法之第一目標為誘導完全緩解(CR)。成人AML緩解定義為正常周邊血細胞計數及正常細胞骨髓(骨髓中母細胞小於5%)且無疾病之體征或症狀。另外，不存在中樞神經系統白血病或其他骨髓外浸潤之體征或症狀。

誘導療法旨在使全身白血病負荷降低至約 10^9 個細胞之細胞學可偵測含量以下。達成完全緩解之先決條件為在誘導化學療法之後達到骨髓再生不全，通常持續1或2週。然而，在完全緩解時，患者仍有顯著然而勉強可偵測之殘留白血病負荷(最小程度殘留疾病)，需要某種形式之緩解後療法。

對於持續20年以上的標準誘導化學療法包括蒽環黴素(anthracycline)及阿糖胞苷。最常見方案組合投與道諾黴素3天與連續輸注阿糖胞苷7天(3+7方案)。在大部分使用此方案之前瞻性研究中，65%至75%之60歲以下之患者達成CR且約50%之60歲以上之患者達成CR。年長患者達到CR之可能性降低的原因在於抗性疾病風險提高以及因全血球減少症之併發症而死亡之風險提高。其他與誘導療法後CR率較低有關之因素包括存在不良細胞遺傳學、先前血液病症及在診斷時體能狀態(performance status)不良。

鑑於年長患者對標準療法之反應率相對較低，試圖進行劑量強化誘導療法方案。然而，迄今為止，無誘導方案在緩解或死亡率方面經證明優於3+7方案。



緩解後療法

緩解後療法旨在進一步降低殘留白血病細胞數目，該殘留白血病細胞數目在初始CR時可能高達 10^8 至 10^9 個細胞。此可藉由任一引起顯著骨髓抑制之細胞毒性化學療法，或藉由經由同種異體移植置換患者幹細胞來達成。

對於佔AML群體中最大比例的年長患者，具有治癒性目的之化學療法不構成具有有利風險-效益概況之治療選擇方案，然而通常向年長患者提供鞏固化學療法。用於年長AML患者之強化鞏固或維持化學療法方案已在臨床試驗中經測試，但未證明是有益的。此主要歸因於化學療法相關毒性以及年齡相關之患者共同罹病。因此，體能狀態顯著降低或有與誘導化學療法相關之顯著器官毒性之患者不為強化緩解後療法之候選者。

用抗NKG2D化合物治療AML

可有利地投與抗NKG2D化合物作為緩解後療法。舉例而言，可用抗NKG2D抗體，根據本文所揭示之劑量及給藥方案治療對先前療法(例如在誘導療法及視情況鞏固療法之後)達成CR之患者。在實施例中，患者具有不良預後(例如處於有高進展風險之組中)，例如患者有與不良預後有關之FLT3或NPM1突變。抗NKG2D治療可呈單治療劑治療形式或與用於治療疾病之其他藥劑組合。然而，較佳地，抗NKG2D抗體將在不伴隨使用對NK細胞活性具有負面作用之化學治療劑的情況下投與。

潛伏性多發性骨髓瘤(SMM)

自 2003 年以來潛伏性多發性骨髓瘤係藉由使用國際共同準則 (International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report from the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003; 121: 749-57) 來定義：

- 血清單株蛋白質為 3 g/dL 或高於 3 g/dL，
- 及 / 或骨髓中有 10% 或 10% 以上漿細胞，
- 但無相關器官或組織障礙(無終末器官損傷，包括骨骼病變)以及相關症狀之跡象。

Mayo 臨床小組改進此等準則以闡明應排除僅具血清游離鏈之患者且漿細胞需為純系的 (Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia 2009; 23: 3-9)。

當前 SMM 治療

當前無 SMM 療法可用。當前對此醫學病狀之管理限於密切追蹤以能夠診斷出向應治療之活動性 MM 的早期進展。在第一年期間應每 3 個月一次追蹤患者以確定進展模式。對 M 蛋白穩定且根據凱爾氏預後準則 (Kyle's prognostic criteria)(Bladé J 等人，J Clin Oncol 2010 28: 690-97) 進展風險低之未進展患者考慮採用較低追蹤頻率。

SMM 發病率隨年齡增加，患者在診斷時之中值年齡處於 65 歲至 70 歲範圍內。SMM 佔所有新診斷之 MM 病例之約



15%。鑑於MM在美國之估算發病率，在20,000例新病例/年中，每年在美國將診斷出至多3,000例SMM新病例。然而，大部分SMM當前未診斷出，幾乎所有MM之前可能皆存在SMM，如下文所論述。

彙集證據表明NK細胞涉及MM免疫監視，包括展示活化NK細胞對源自MM之惡性細胞具細胞毒性的離體資料。在疾病早期階段，骨髓瘤細胞廣泛表現上述活化NK配體(MICA及MICB、ULBP)且下調抑制性第1類HLA配體(Carbone E等人，Blood 2005; 105: 251-58)。並且，低腫瘤負荷向侵襲性MM之進展伴隨NK細胞定量減少及官能衰竭。在患有MGUS以及潛伏性或早期MM之患者體內NK細胞計數及活化標記顯著增加。相反，晚期MM患者體內NK細胞計數減少且NK細胞對刺激具低反應性(Carbone等人，2005；Sawanobori M等人，Acta Haematol 1997; 98: 150-54)。

兩項新近研究表明所有MM之前均存在無症狀性意義未知之單株 γ 球蛋白病(MGUS)，MGUS特徵在於血清M蛋白<3 g/dl且骨髓漿細胞<10%。然而，僅一半MGUS患者進展且在此狀況下，M蛋白逐漸增加，可能在明顯MM之前導致SMM。此等漿細胞增殖之病理生理學以及涉及MGUS向SMM進展及SMM向有症狀MM進展之機制已被完全瞭解。然而，若干步病原性過程之2個主要步驟已經充分表徵：

- 純系漿細胞最初有限轉型，引起後天遺傳事件。

MGUS、SMM之漿細胞具有類似於骨髓瘤細胞之遺傳及表型概況，將其與其正常對應物明顯區分開。

。 MGUS向SMM以及SMM向MM之逐漸進展似乎不僅與贅生性漿細胞中發生之遺傳事件有關，且亦與骨髓微環境變化之累積有關。

凱爾等人小組追蹤之276名SMM患者之群組的自然史經充分描述，得出結論：

。 在第5年時向有症狀且不可治癒惡性疾病進展之累積機率為73%。大部分患者產生MM，而僅2%患者進展成原發性澱粉樣變性(AL)。

。 SMM之總進展風險極大地受自診斷以來之時間影響。其在前5年中為每年約10%，但在後續5年中僅為每年3%，之後降低至每年1%。中值進展時間(TTP)處於2年至3年範圍內。

。 進展之風險顯著地受單株蛋白質之含量、骨髓漿細胞之比例或兩者影響。如下文所示，藉由使用此等2個變數形成之3個預後組之間在中值進展時間方面存在相當大差異。在高風險組中，87%在第15年時進展成明顯惡性疾病，且中值進展時間短至2年。相反，在低風險組中，僅39%之人員進展，中值時間為19年。



進展時間	患者數(n%)	中值年數	在第15年時進展(%)
第1組 血清M峰值 ≥ 3 g/dl BMPC $\geq 10\%$	106(38%)	2	87
第2組 血清M峰值 <3 g/dl BMPC $\geq 10\%$	143(52%)	8	70
第3組 血清M峰值 ≥ 3 g/dl BMPC $<10\%$	27(10%)	19	39
總群體 P<0.001, n多變量分析	276(100%)	5	73

表2展示進展成活動性多發性骨髓瘤之機率(來自 Kyle RA等人，N Engl J Med 2007; 356: 2582-90)。

其他進展因素已在其他研究中鑑別且在下表中有所提及。新近資料尤其強調2個免疫學預測物之重要性，該等免疫學預測物可改善對SMM之預測。

。處於低於0.126或高於8之斷點處的異常游離輕鏈比率(FLC)似乎為獨立之風險因素。如藉由對同一Mayo群組進行研究所示，相較於僅考慮血清M蛋白含量及骨髓漿細胞百分比之初始分類，併入FLC使得分類得以改良，其中患者分佈更平衡。

。骨髓漿細胞BMPC之異常表型以及亦展示於年長者研究中之所謂之免疫不全麻痺(immunoparesis)，其定義為未涉及之Ig同型中之一或兩者降低。基於此等2個參數，提出評分系統，其中在分別不存在、存在一或兩個因素時，SMM向MM之累積進展率為4%、46%及72%。然而，藉由流動式細胞量測術對BMPC表型進行表徵仍為煩瑣的，且可能難以在團體間再現。

最終，患有所謂進展之SMM(亦即血清M蛋白值逐漸增加)之患者進展成有症狀MM之時間短於M蛋白穩定之患者(中值1.3年相較於3.9年)。

表3展示進展之主要因素。以抗NKCIR抗體治療可：

表3：進展之主要因素 SMM進展之預測物	
	在IMWG共同準則之前
● M蛋白含量	
● BMPC百分比	
● 輕鏈蛋白尿(>50毫克/24小時)	
● IgA同型	
● MRI脊柱異常	
● 骨髓漿細胞(BMPC)之標記指數	
使用IMWG共同準則	
● M蛋白含量	
● BMPC百分比	
● 異常游離輕鏈比率	
● 表型異常BMPC之百分比	
● 免疫不全麻痺	
● 進展模式	

用抗NKCIR化合物治療SMM

抗NKCIR化合物可有利地投與至患有例如如由標準國際骨髓瘤工作組(standard International Myeloma Working Group)定義所定義之SMM或MGUS的患者。在實施例中，患者具有不良預後(例如，處於具有高進展風險組中)，例如患者具有與不良預後有關之突變或處於根據表2中之分組的第一組中。視情況，可治療具有向MM進展之一或多個經定義之風險因素的患者，例如可基於向活動性多發性骨

髓瘤進展之機率鑑別或選擇屬於第1組、第2組或第3組之患者(參見例如Kyle RA等人，N Engl J Med 2007; 356: 2582-90之準則)且用抗NKCIR化合物治療。可用抗NKCIR抗體，根據本文揭示之劑量及給藥方案治療患者。抗NKCIR治療可呈單治療劑治療形式或與用於治療疾病之其他藥劑組合。然而，較佳地，抗NKCIR抗體在不伴隨使用對NK細胞活性具有負面作用之化學治療劑的情況下投與。

多發性骨髓瘤(MM)

多發性骨髓瘤為第二最常見血液癌症(在2007年美國出現19,900例新病例，且在西歐出現類似數目之病例)。MM由漿細胞惡性增殖產生，其在大部分但並非所有病例中產生純系免疫球蛋白(所謂之M蛋白)。MM特徵在於骨骼破壞、低鈣血症、骨髓及腎衰竭。在國際上使用準確共同準則來定義MM(Kyle及Rajkumar, 2009)。

當前MM治療

歷史治療由以下組成：細胞減滅術療法(所謂之由高劑量皮質類固醇「誘導」)，及習知抗有絲分裂化學療法，包括烷基化劑或有效性較低(但骨髓毒性較低)之阿微素與長春新鹼之組合。

在「強化」步驟之誘導(亦稱為高劑量化學療法)之後最有效治療通常繼之以投與高劑量之美法侖烷基化劑(200 mg/m^2)。其骨髓毒性需要藉由移植自體性造血細胞進行血液救護，會縮短再生不全期。通常在誘導期結束時藉由投

與 GCSF 及 / 或 環磷醯胺使造血細胞自骨髓向周邊血液移動。然而，出於安全性原因，強化治療僅可為小於 65 歲且無嚴重共同罹病之患者所接受。

該等強化治療使得在歷史誘導治療下至多 10% 至 20% 之患者達成 VGPR 及 PR 成為可能。在無強化治療下，且由此對於大於 65 歲之患者，很少達成完全反應 (CR) 及極佳部分反應 (VGPR)。五項大型隨機化研究能夠表明基於強化之方案相較於化學療法在反應、無進展存活期及 3 年總存活率狀況方面的優效性 (評述於 Attal 等人，2007 中)。

在過去數年內出現兩類新型免疫調節藥，即「Imid」，例如瑟利德米 (thalidomide) 及來那度胺 (lenalidomid)；及蛋白酶體抑制劑，例如波普單抗 (bortezomib)，且其主要用作含皮質類固醇或細胞毒性化學療法之組合療法的一部分。兩種藥物類別組合至少 2 種作用：細胞減滅術與調節漿細胞微環境。將此等新藥與類固醇及習知化學療法 (包括高劑量化學療法) 組合使得顯著改善反應率及尤其改善 VGPR 率或 CR 率成為可能。然而，不可偵測最程度殘留之疾病在分子層面上之緩解在可記錄時似乎極少，在 10% 以下之患有此等病狀之患者達成，達成 CR 之患者在數年後必然復發。

至少 50% 病例在第一次復發時對治療有反應，但第二次或後繼復發最終將變得難以由任何可用治療治癒。由此，除少數以同種異體造血細胞成功移植之年輕患者之外，該疾病仍不可治癒。然而，程序之毒性顯著限制其適應症。



當前治療仍限於有症狀患者。任何治療對無症狀患者之進展或存活的效益尚未證明。治療之適應症共同定義為：

對於大於65歲或有嚴重共同罹病之患者，歷史治療由雙重誘導療法組成：美法侖+潑尼松(prednisone)(MP)。若干研究展示MP與3種新藥劑(瑟利德米、波普單抗或來那度胺)中之任一者的組合優於標準MP。當前測試甚至可產生較佳結果之其他組合，包括來那度胺+地塞米松(dexamethasone, Dex)，以及來那度胺+波普單抗+Dex。對於小於65歲且無嚴重共同罹病之患者，如先前藉由誘導開始治療，使腫瘤負荷能夠降低，之後收集幹細胞且在使自體性造血細胞回增下進行強化治療。在自體性HCT之後即開始探索藉由重複細胞減滅術化學療法組合Imid及蛋白酶抑制劑進行鞏固治療。

評估疾病反應

目前在所有試驗中應使用IMWG(國際MM工作組)之國際統一反應準則，如由該領域中之領導專家小組在2006年於Leukemia中所發表。

可藉由各種方法評估反應，包括分子層面上之緩解(例如定義為<1個惡性細胞/10,000個BM細胞)，通常涉及藉由以對偶基因特異性寡核苷酸對骨髓樣品進行即時PCR來偵測及定量CR患者之最小程度殘留疾病。亦使用多參數流動式細胞量測術。其他方法包括可定量血清中之游離輕鏈，及免疫學評估骨髓。

對誘導、鞏固(包括強化)療法之完全及部分反應可根據

標準準則(例如IMWG準則)來評估。CR、PR或VGPR患者可用本發明之抗NKCIR抗體治療。

用抗NKCIR化合物治療MM

在使用化學療法進行治療及/或以免疫調節劑(例如Imid或蛋白體抑制劑)治療之後可在對該誘導及/或視情況鞏固療法有部分或完全反應且因此疾病程度最小之患者有利地投與抗NKCIR化合物作為誘導(及/或鞏固及/或強化)後療法。可用抗NKCIR抗體，根據本文所揭示之劑量及給藥方案治療在療法之後(例如在誘導療法及視情況鞏固療法之後)達成反應或緩解之患者。抗NKCIR治療可呈單治療劑治療形式或與用於治療疾病之其他藥劑組合。然而，較佳地，抗NKCIR抗體在不伴隨使用對NK細胞活性具有負面作用之化學治療劑的情況下投與。

抗NKCIR抗體之給藥及給藥方案

在一個態樣中，本發明提供之治療方法包含投與個體包含治療有效量之抗NKCIR抗體之組合物。治療有效量可為例如約0.0003 mg(抗體)/kg(患者體重)至約3 mg/kg之劑量(例如約0.003 mg/kg至約3 mg/kg，諸如約0.015 mg/kg至約3 mg/kg，例如約0.075 mg/kg至約3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3 mg/kg及約1 mg/kg至約3 mg/kg中之任一者，或約0.0003 mg/kg、約0.003 mg/kg、約0.015 mg/kg、約0.075 mg/kg、約0.3 mg/kg、約1 mg/kg及約3 mg/kg中之任一者)。抗KIR抗體之劑量及調配物係描述於PCT申請案第WO2008/084106號中，該申請案之揭示內容以引用方式併



入本文中。在一個實施例中，該方法包含例如以每天3次至每2個月一次之範圍內的給藥頻率重複投藥至少一次。亦可投與劑量例如至少3次、至少6次或至少10次。在一個實施例中，靜脈內投與抗體。在另一實施例中，抗體結合至NK細胞表面上之抑制性KIR可增強NK細胞之細胞毒性活性。在另一實施例中，抗體為交叉反應性抗KIR抗體。舉例而言，抗體可為如PCT申請案第WO2008/084106號中所述的調配物中之抗體1-7F9。

在一個較佳實施例中，劑量經選擇以在人類患者體內提供實質上完全飽和作用。如本文所用之術語「實質上完全飽和」係指所靶向之NKCIR至少90%佔有率(occupancy)，且較佳係指至少95%受體佔有率。該方法視情況包括評估患者之NK細胞增強及/或抗腫瘤活性(其可藉由使用任何適合技術進行，其中若干技術在此項技術中已知，包括例如NKCIR佔有度、CD107a標記等，如本文所述)。通常藉由經適合時期(諸如約1小時)靜脈內投藥來投與調配物。

舉例而言，可以一定劑量及一定給藥頻率投與抗NKCIR抗體以在血漿內達成NK細胞上至少約90%、較佳至少約95% NKCIR佔有率至少約一個月、兩個月、三個月或六個月，從而使飽和持續一段延長時期(例如至少3個月、6個月)。在各別實施例中，劑量處於約0.1 mg/kg至約3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3 mg/kg、約0.1 mg/kg至約1 mg/kg及約1 mg/kg至約3 mg/kg之範圍內，進一步較佳其中該抗體為抗KIR抗體，進一步較佳其中抗體為1-7F9。給藥頻率可處於

每天一次至每2個月一次、約每週一次至約每2個月一次之範圍內；或可為約每月一次。或者，給藥頻率可選自每天約三次、約兩次及約一次；每週約五次、約四次、約三次及約二次；及約每兩週、每四週及每六週一次。

在一個較佳實施例中，約每週2次至約每月一次或約每月一次至約每2個月一次投與使得受體實質上完全飽和(例如至少約90%或95%受體佔有率)之劑量的抗NKCIR抗體。劑量可例如投與至少3次、至少6次或6次以上。舉例而言，該方法可包含以一定劑量及一定給藥頻率投與抗NKCIR抗體以達成NK細胞上至少約90%或95% NKCIR佔有率至少約2週、1個月、6個月、9個月或12個月。

在一個較佳實施例中，方案引起持續實質上完全受體飽和。投與使得受體實質上完全飽和至少約1週、2週或1個月之時期之劑量的抗NKCIR抗體。當劑量使得受體實質上完全飽和(例如至少約90%或95%受體佔有率)約一週時，可例如每週一次至每兩週一次投與該劑量；當劑量使得受體實質上完全飽和約兩週時，可例如每兩週一次至每月一次投與該劑量。當劑量使得受體實質上完全飽和約兩週至約一個月時，可例如約每月一次投與該劑量。在各方案中，劑量可例如投與至少3次、至少6次或6次以上。舉例而言，該方法可包含以一定劑量及一定給藥頻率投與抗NKCIR抗體以達成NK細胞上至少約95% KIR佔有率至少約6個月、9個月或12個月。

在另一較佳實施例中，方案引起間歇性實質上完全受體



飽和。投與使得受體實質上完全飽和(例如至少約 90% 或 95% 受體佔有率)至少約 1 週、2 週或 1 個月之時期之劑量的抗 NKCIR 抗體。當劑量使得受體實質上完全飽和約一週至兩週時，可例如約每月一次或每至少兩個月時期一次(例如每兩個月一次)投與該劑量。當劑量使得受體實質上完全飽和約兩週至約一個月時，可例如約每至少兩個月時期一次(例如每兩個月一次)投與該劑量。在各別實施例中，劑量處於約 0.1 mg/kg 至約 0.3 mg/kg 范圍內，約每月一次投與；在一個實施例中，劑量處於約 0.1 mg/kg 至約 3 mg/kg 之範圍內，較佳處於 1 mg/kg 至約 3 mg/kg 之範圍內，約每約兩個月一次(或每兩個月以上時期一次，即少於每兩個月時期一次)投與，進一步較佳其中該抗體為抗 KIR 抗體，進一步較佳其中該抗體為 1-7F9。可重複治療，以使治療方案引起間歇性實質上完全受體飽和至少 6 個月、9 個月或 12 個月之時期。

通常經靜脈內投與抗體，但其他適合投藥方式為已知的且亦描述於例如 WO2008/084106 中。

雖然抗 KIR 抗體 1-7F9 或其 S241P 變異體為較佳用於調節 NK 細胞活性及/或治療疾病之抗體，但其他抗 NKCIR 及抗 KIR 抗體亦可用於本發明方法中。然而，該等抗體應與抗 KIR 抗體 1-7F9 具有相似之 K_D 值，在患者體內具有相似清除率，且具有相似之分佈體積，其中「相似」意謂在相應抗 KIR 抗體 1-7F9 參數之約 50% 以內，較佳約 30% 以內。抗 KIR 抗體 1-7F9 在直至 0.015 mg/kg 之劑量下具有約 4 ng/ml

之高親和力 K_D 且具有約 20 ng/ml 之低親和力 K_D ；其清除率為約 0.5 ml/h/kg，且分佈體積為約 115 ml/kg(參見 WO2008/084106)。適用於一或多種本發明方法中之例示性抗 NKCIR 抗體可具有以下特性：(a)降低或阻斷 NK 細胞上之抑制性 NKCIR 之信號傳導；(b)高親和力 K_D 為約 2 ng/ml 至約 6 ng/ml；(c)低親和力 K_D 為約 10 ng/ml 至約 30 ng/ml；(d)清除率為約 0.25 ml/h/kg 至約 0.75 ml/h/kg；(e)分佈體積為約 50 ml/kg 至約 175 ml/kg。抗 NKCIR 抗體之受體佔有率可使用如本發明中所述適於由抗體結合之特定 NKCIR 的分析法來測定(參見例如實例 2)。抗 NKCIR 抗體之藥物動力學特性可使用如本發明中所述適於特定抗 NKCIR 抗體的分析法來測定(參見例如實例 1)。

實例

實例 1-在患者體內之藥物動力學

藉由 ELISA 測定抗 KIR 抗體 1-7F9 之血漿濃度，如下文所簡要描述。

用 KIR2DL3 塗佈溶液(100微升/孔)塗佈培養盤且在約 +4°C 下培育隔夜。接著使用自動培養盤洗滌器用洗滌緩衝液(400微升/孔)洗滌培養盤 3 次。添加阻斷緩衝液(200微升/孔)且在室溫下於培養盤震盪器上培育培養盤約 2 小時。此後，用洗滌緩衝液(400微升/孔)再洗滌培養盤 3 次。

將標準物、品質對照物及樣品添加至培養盤中(100微升/孔)，之後在室溫下於培養盤震盪器上培育約 2 小時。再洗滌培養盤 3 次(如上)，之後添加小鼠抗人類 IgG4:過氧化酶

工作溶液(100微升/孔)。接著在室溫下於培養盤震盪器上再培育培養盤約2小時，之後再次將其洗滌。

將TMB添加至培養盤中(100微升/孔)，接著在室溫下於培養盤震盪器上將其培育約30分鐘。藉由添加停止溶液(50微升/孔)終止酶促反應。在450 nm下(基準濾波器650 nm)讀取吸光度。此研究之定量下限為5.000 ng/mL且此研究之定量上限為110.0 ng/mL。

實例2-KIR佔有率分析法

藉由四色螢光分析對人類全血樣品評估受體佔有率。簡言之，評估經EDTA抗凝之周邊血液中之T及NK淋巴細胞上游離及結合KIR2D受體含量。游離位點分析法將藉由以結合PE之1-7F9(其結合至KIR2D分子)染色來評估未結合之KIR2D。結合位點分析法將藉由以結合PE之小鼠抗人類IgG4單株抗體(其識別結合至KIR2D受體之1-7F9)染色來評估由1-7F9佔有之KIR2D受體。游離及結合分析法將允許評估1-7F9-PE或抗hIgG4-PE之陽性染色百分比以及螢光強度[MESF]。在以下兩個分析法中使用以下結合抗體組合：

游離位點分析法：CD3/1-7F9/CD45/CD56

結合分析法：CD3/hIgG4/CD45/CD56

在Becton Dickinson FACScalibur上使用Becton Dickinson Cellquest軟體分析樣品。T細胞係定義為CD45+CD3+淋巴細胞且NK細胞係定義為CD45+CD3-CD56+細胞。

實例3-臨床AML研究

對年長 AML 患者(>60 歲)進行單一劑量遞增試驗，該等患者在誘導及鞏固定化學療法之後最初完全緩解，但不適於骨髓移植。應用標準 3+3 設計，且總共研究 7 個劑量：0.0003 mg/kg 至 3 mg/kg 之劑量範圍。在給藥之後，針對安全性、PK 及 KIR 佔有率監測患者直至 KIR 佔有率不再可偵測為止。

亦進行擴展試驗。完成劑量遞增試驗且仍完全緩解之 AML 患者可參與擴展試驗，其中以每月針對患者進行給藥至多 6 次。以與患者在先前試驗中所接受之劑量相同之劑量對患者進行給藥。

患者、材料及方法

在兩個試驗中，首先完全緩解(CR)且不適於移植之年長 AML 患者(>60 歲)適於該等研究。AML 係根據 WHO 準則。(Bunning RD, Matutes E, Harris NL 等人: Acute myeloid leukaemia: Introduction. Jaffe ES, Harris NL, Stein H 等人編: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001. World Health Organization Classification of Tumors, 3, 第 77-80 頁)。緩解為根據 NCI 準則所定義之形態完全緩解(CR)(Cheson 等人, JCO, 第 21 卷, 第 24 期, 第 4642-4649 頁(2003))，或僅在 1 或 2 個誘導化學療法循環及至少 1 個且最多 6 個鞏固定化學療法循環後血小板計數不完全恢復之 CRi。

在劑量遞增試驗中篩選時，自最後一次施與化學療法起之時間為至少 30 天且至多 120 天。其他合格準則包括(但不



限於NK細胞上KIR2DL1及KIR2DL2/3之表現、ECOG(Oken, M.M.等人, Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982)體能狀態0分至2分及來自先前治療之全部毒性皆已恢復。

對於擴展試驗，在可接受之安全性概況下完成劑量遞增試驗為另一合格準則。

其他準則包括絕對嗜中性白血球計數 $>1\times10^9$ 個/公升；血小板 $>80\times10^9$ 個/公升；骨骼中母細胞小於5%；無奧爾桿狀體(Auer rod)；無疾病症狀；所有先前抗白血病療法之急性毒性皆已恢復；患者NK細胞上表現KIR(能夠結合抗KIR抗體1-7F9)；如由研究者所判定無嚴重相關器官功能障礙；及臨床實驗室值如下：(a)血清肌酸酐 $\leq2\text{ mg/dL}$ ，(b)總膽紅素 $\leq1.5\times$ 正常值上限，及(c)AST $\leq3\times$ 正常值上限。

研究設計

劑量遞增試驗為多中心、開放標籤、單劑量遞增安全性及可耐受性試驗。計劃研究七個劑量：0.0003 mg/kg、0.003 mg/kg、0.015 mg/kg、0.075 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg及3 mg/kg。一般(3+3)設計係選用於此試驗。各患者分配一個劑量，且監測安全性、藥物動力學及藥效學直至患者NK細胞上之KIR佔有率不可偵測為止。持續不斷地分析安全性、PK及KIR佔有率，且在給藥後前4週期間自各劑量組獲得之資料一般形成劑量遞增決策之基礎。

擴展試驗係設計為重複給藥、多中心、開放標籤、安全

性及可耐受性試驗。給與個別患者之劑量與患者在單劑量試驗中所接受之劑量相同。患者可以4週時間間隔接受6次投藥，亦即6個給藥循環，最長持續6個月時間。各給藥循環由給藥訪視及安全性監測訪視組成。在最後一次給藥後，針對安全性監測患者直至患者NK細胞上之KIR佔有率不可偵測為止。此安全性追蹤期之持續時間可能視所接受之劑量而定，且預期最長為最後一次給藥後24週。

使用美國國家癌症學會不良事件常見術語準則(US National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events，CTCAE)第3.0版評估抗KIR抗體1-7F9投藥之安全性(亦即任何觀測到之毒性)。亦評估藥物動力學終點、KIR佔有率、NK及T細胞活化之標記、WT-1腫瘤標記、無進展存活期及總存活期。

AML研究之結果

在劑量遞增試驗中在接受0.0003 mg/kg、0.003 mg/kg、0.015 mg/kg、0.075 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg及3 mg/kg之各劑量之患者中評估受體飽和。總而言之，劑量0.0003 mg/kg使得KIR部分飽和(50%佔有率)約2小時時期；劑量0.003 mg/kg使得KIR完全飽和(90%佔有率)不到24小時時期；劑量0.015 mg/kg使得KIR完全飽和不到7天時期；劑量0.075 mg/kg使得KIR完全飽和將近7天時期；劑量0.3 mg/kg使得KIR完全飽和7天以上且不到14天時期；劑量1 mg/kg使得KIR完全飽和不到3週時期(介於約2週與3週之間)；劑量3 mg/kg使得KIR完全飽和4週以上時期。

評估以 0.0003 mg/kg、0.003 mg/kg、0.015 mg/kg、0.075 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg 及 3 mg/kg 之劑量治療之患者自開始治療起之無病存活期 (DFS)。結果展示於表 4 中。接受 1 mg/kg 及 3 mg/kg 之劑量之患者的 DFS 相較於接受較低劑量之患者顯著較長。另外，當復發時間係自開始 IPH21 療法之時間起計算時存在較強之劑量關係指示，其中在較低劑量下 11 週之中值 (3 週至 112 週範圍) 相較於在較高劑量下 43 週之中值 (36 週至 71 週範圍)。受體飽和 (包括持續飽和較長時期) 因此似乎不誘導 NK 細胞教育 (education) 顯著低反應性或缺乏且似乎比以不使受體飽和之劑量重複刺激更有效。另外，接受 1 mg/kg 及 3 mg/kg 之患者的 DFS (73 週及對於仍無病之患者而言持續不斷) 似乎比對於不接受治療之患者所預期之 DFS 長得多。因此，以抗 KIR 抗體調節 NK 細胞在投與至有所緩解之患者時具有顯著有益作用。在重複給藥循環過程期間 (此處 6 次投與 1 mg/kg 及 3 mg/kg 劑量以引起約一個月飽和，每月一次投與) 進行抗體給藥以達成完全受體飽和至少 2 週且尤其達成持續完全受體飽和時，該作用尤其高。

表 4

		DFS=復發-CR (週)	PFS=復發- IPH21(週)	延遲CR- IPH21(週)
所有患者(21)	中值	51	35	20
	平均值	67	47	21
組=0.3(15)	中值	42	10	19
	平均值	55	36	20
組 1-3 mg (6)	中值	92	55	26
	平均值	97	73	24

實例 4-對潛伏性多發性骨髓瘤之臨床研究

對SMM患者進行使用引起持續或間歇飽和之兩個不同劑量之抗KIR抗體1-7F9的雙組試驗。用以下治療第一組A：0.2 mg/kg，該劑量在各次注射後經至少約7天引起完全(>90%)但短暫飽和，且組B接受2 mg/kg，該劑量在兩次連續注射之間引起完全且持續飽和。以每月計對患者進行給藥至多6次，且檢查安全性及功效之準則，包括指示疾病向MM進展之準則。

患者、材料及方法

適於該研究之患者患有根據源自國際骨髓瘤工作組定義(Br J Haematol 2003; 121: 749)之定義的具有任何風險程度之SMM：血清M蛋白 ≥ 3 g/dl，AND/OR骨髓漿細胞 $\geq 10\%$ 而無終末器官損傷之跡象(CRAB)：

- (C)不存在高鈣血症：Ca < 10.5 mg/dl
- (R)不存在腎衰竭：肌酸酐 < 2 mg/dl(177 μ mol/l)或計算之肌酸酐清除率(根據MDRD) > 50 毫升/分鐘
- (A)不存在貧血：Hb > 11 g/dl
- (B)標準骨骼檢查不存在溶解性骨骼病變(若臨床指示，則可用於MRI)。

患者亦須患有可量測疾病(該疾病定義為血清M蛋白 ≥ 1 g/dl之疾病)且無疲勞、復發性感染或任何對MM之臨床懷疑的跡象。

研究設計

評估兩個劑量，其中藉由隨機分組來分配患者：

- 在組A中：0.2 mg/kg，該劑量在各次注射後經至少7天引起完全(>90%)但短暫之飽和。

- 在組B中：2 mg/kg，該劑量在兩次連續注射之間引起完全且持續之飽和。

在兩個組中，經1小時藉由靜脈途徑每4週一次投與抗KIR抗體1-7F9 6次。在整個研究期間對所有患者使用同一劑量。將每4週一次投與抗KIR抗體1-7F9，歷時6個循環。疾病在6個循環後對研究治療達成至少最小程度反應之患者將再以6個循環之治療期加以治療。在研究中將追蹤患者直至第12個月或第18個月(亦即在完成治療後6個月)(或若治療完成後第6個月KIR飽和仍>30%，則時間更長)。

評估準則

根據經修改以包括源自EBMT準則(Bladé等人；Br J Haematol 1998; 102: 115)之最小程度反應的IMWG統一反應準則(Durie BGM等人；Leukemia 2006; 20: 1467)對反應進行分類。最小程度反應之定義係源自EBMT準則(Bladé等人；Br J Haematol 1998; 102: 115)且需要以下兩者：(a)血清蛋白含量降低25%至49%，及(b)24小時尿蛋白M排泄減少50%至89%而仍超過200毫克/24小時。

對血清及尿電泳呈陰性之所有患者進行免疫固定及骨髓檢查；在基線時對疾病達成CR準則之所有患者量測血清游離輕鏈，且對疾病達成CR準則之所有患者進行骨髓免疫表型分型。使用劑量測定法經血清及尿蛋白質電泳定量M蛋白。當缺失尿樣品時，僅關於血清含量評估反應。

另外，在研究時期內記錄DOR(反應持續時間)、PFS(無進展存活期)及進展時間(TPP)。

實例5-在對第一線療法有反應後多發性骨髓瘤之臨床研究進行具有葛涵氏單階段II期設計(Gehan's one-stage phase II design)之開放標籤、隨機化兩個獨立組、多中心研究以評估在血清中M蛋白含量方面對人類單株抗KIR抗體1-7F9之兩個不同劑量方案的反應。患者將以0.2 mg/kg或2 mg/kg之劑量(根據其隨機分組)接受4次1-7F9注射，以四週時間間隔經一小時輸注投與。

患者、材料及方法

最初需要全身性療法且接受第一線治療(習知劑量之化學療法或高劑量化學療法)及自體性造血細胞移植，之後接受或未接受鞏固治療的MM患者適於該研究。

患者可有殘留疾病或對先前治療有反應。殘留疾病為如下疾病：其中(a)可定量血清M蛋白 $\geq 3 \text{ g/l}$ ，除 β 球蛋白面積之尖峰(可能 $\geq 10 \text{ g/l}$)之外，在該狀況下血清M蛋白視作可定量；或(b)血清M蛋白 $< 3 \text{ g/l}$ ，可量測之所涉及游離輕鏈 $\geq 100 \text{ mg/l}$ 且異常游離輕鏈比率(< 0.26 或 > 1.65)。

對於有部分反應(PR及VGPR)且處於平台期之患者，部分反應應符合IMWG統一反應準則：自第一線化學療法治療之前的血清M蛋白值降低 $\geq 50\%$ 以及24小時尿M蛋白減少 $\geq 90\%$ 或 $< 200 \text{ 毫克/24 小時}$ 。極佳部分反應根據IMWG統一反應準則係定義為血清M蛋白降低90%或90%以上以及尿M蛋白含量 $< 100 \text{ 毫克/24 小時}$ 。血清M蛋白 $\geq 3 \text{ g/l}$ 之患者的平



台期：在至少2個月期間血清中之M蛋白含量穩定，以及對於血清M蛋白 $<3\text{ g/l}$ 之患者：血清中之游離輕鏈含量穩定。

此外，患者之ECOG(美國東岸癌症臨床研究合作組織，Eastern Cooperative Oncology Group)體能狀態為0、1或2。

研究設計

藉由靜脈內途徑經1小時，根據隨機化組，以 0.2 mg/kg 或 2 mg/kg 之劑量每4週一次施以抗體1-7F9之輸注，持續4個循環。在4個月時有反應(血清M蛋白下降)之患者將允許接受額外的每4個月一次投藥之治療期。在整個研究期間對同一組中之所有患者使用同一劑量。

第一劑量 0.2 mg/kg 預期引起完全受體飽和至多約1週。

第二劑量 2 mg/kg 略高於使受體飽和至少1個月時期之劑量。

評估準則

基於使用劑量測定法於血清及24小時尿電泳中定量之M蛋白含量以及使用濁度測定法以結合位點Freelite分析法所定量之游離輕鏈含量來評估功效。評估存活終點，包括TTP(進展時間)、PFS(無進展存活期)、DOR(反應持續時間)及OS(總存活期)。

結果

在以 0.2 mg/kg 或 2 mg/kg 治療(4次給藥)之各組中之前7名患者中，在 2 mg/kg 治療組(持續受體飽和)中觀測到一例對

治療之反應，如由M蛋白下降所評估(在2次連續訪視時確定M蛋白降低25%)。

本文引用之所有參考文獻(包括公開案、專利申請案及專利)以全文引用之方式併入本文中，且其引用程度如同各參考文獻在本文中個別且特定地指示以引用方式併入本文中且闡述其全文一般(達法律允許之最大程度)，而與特定文獻在本文別處任何各別地併入無關。

除非本文另外指示或上下文明顯相矛盾，否則在描述本發明之上下文中使用術語「一」及「該」以及類似指示詞係視作涵蓋單數及複數。

除非另外說明，否則本文所提供之所有精確值表示相應近似值(例如，關於特定因素或量測值所提供之所有例示性精確值可視為亦提供適當時經「約」修飾之相應近似量測值)。

除非另外說明或上下文明顯相矛盾，否則本文關於某一或某些要素使用諸如「包含」、「具有」、「包括」或「含有」之術語對本發明之任何態樣或實施例的描述意欲對「由彼或彼等特定要素組成」、「基本上由彼或彼等特定要素組成」或「實質上包含」彼或彼等特定要素的本發明之相似態樣或實施例提供支持(例如，除非另外說明或上下文明顯相矛盾，否則本文描述組合物包含特定要素應理解為亦描述組合物由彼要素組成)。

除非另外主張，否則使用本文所提供之任何及所有實例或例示性語言(例如「諸如」)僅意欲較佳闡明本發明而不



對本發明範疇構成限制。本說明書中之語言不應視作指示任何未主張之要素對於實踐本發明而言必不可少。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示用於大部分 AML 患者之治療策略，其分成兩個一般階段：誘導療法及緩解後療法。

圖 2(WO2006/003179 之 圖 12) 提供抗體 DF200 與抗體 Pan2D(NKVSF1)之輕鏈可變區及輕鏈 CDR 之胺基酸序列的比較性比對。(A)DF200 之抗 KIR 輕鏈可變區(VL)(SEQ ID NO:1)與 Pan-2D 之抗 KIR 輕鏈可變區(VL)(SEQ ID NO:2)之比對。胺基酸序列上之數字指示未成熟(未分泌)免疫球蛋白起始轉譯 Met(+1)之各別位置。(B)CDR-L1 序列之比對。之前殘基：通常為 Cys。之後殘基：Trp。通常為 Trp-Tyr-Leu。長度：10-17 aa。(C)CDR-L2 序列之比對。之前殘基：一般為 Ile-Tyr。長度：7 aa。開始：在 CDR-L1 末端之後約 16 aa。開始：自分泌之蛋白質之開端起約 24 aa。(D)CDR-L3 序列之比對。之前殘基：Cys。之後殘基：Phe-Gly-XXX-Gly。長度：7-11 aa。開始：在 CDR-L2 末端之後約 33 aa。

圖 3(WO2006/003179 之 圖 13) 提供抗體 DF200 之重鏈可變區及重鏈 CDR。(A)DF-200 VH 區，未成熟蛋白質。分泌之成熟 VH 在位置 20(殘基 Q)處開始。VH 區結束於殘基 S 且之後延續恆定區(未示)。(B)CDR-H1。之前殘基：Cys-XXX-XXX-XXX。之後殘基：Trp。一般為 Trp-Val 或 Trp-Ile。長度：10-14 aa。開始：自分泌之蛋白質開端起約 22-26 aa。

(C)CDR-H2。之前殘基：Leu-Glu-Trp-He-Gly，但可能存在其他變異。之後殘基：Lys或Arg/Leu或He或Val或Phe或Thr或Ala/Thr或Ser或Ile或Ala。長度：16-20 aa。開始：在CDR-H1末端之後約15 aa。(D)CDR-H3。之前殘基：Cys-XXX-XXX(通常為Cys-Ala-Arg)。之後殘基：Trp-Gly-XXXvGly。長度：3-25 aa。開始：在CDR-H2末端之後約33 aa。

圖4(WO2006/003179之圖14)描繪人類抗體1-7F9之VH及VL序列之核苷酸及胺基酸序列。(A)HuKIR 1-7F9成熟可變區輕鏈之轉譯。(B)編碼HuKIR 1-7F9成熟可變區輕鏈之核苷酸序列。(C)HuKIR 1-7F9成熟可變區重鏈之轉譯。(D)編碼HuKIR 1-7F9成熟重鏈之核苷酸序列。

圖5(WO2006/003179之圖15)展示單株抗體1-7F9、DF200(VH序列：SEQ ID NO:19；VL序列：SEQ ID NO:21)及Pan2D(NKVSF1；VH序列：SEQ ID NO:20；VL序列：SEQ ID NO:22)之VH及VL序列之胺基酸序列。CDR加有方框。

圖6(WO2006/003179之圖20)展示KIR2DL1上由1-7F9結合之抗原決定基，如KIR2DL1序列中所指示。與1-7F9相距4.0 Å距離範圍內之胺基酸以灰黑色背景突出顯示。由黑色背景突出顯示之胺基酸涉及氫鍵結至1-7F9。圖2至圖6中所列之SEQ ID NO對應於本申請案在申請專利範圍之前的幾頁中所含之在WO2006/003179中所申請之序列表中的SEQ ID NO。

序 列 表

<110> 法商天賜製藥公司

<120> NK細胞調節治療及治療血液惡性疾病的方

<130> 44292.118602

<140> 100142827

<141> 2011-11-22

<150> 61/415973

<151> 2010-11-22

<160> 58

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 128

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

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

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu The Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
35 40 45Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly

65	70	75	80
Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu			
85	90	95	
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His			
100	105	110	
Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu			
115	120	125	
Ile Lys Arg			
130			

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 3
Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4
Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 5
Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 6
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 7
Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 8

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
 1 5

<210> 9

<211> 140

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 9

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

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

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe
 35 40 45

Tht Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 10

Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His
 1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 12

Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Myet Asp Tyr
 1 5 10



<210> 13		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 引子		
<400> 13		
ggaattccag gaggaattta aaatgcata gggagtccac ag		42
<210> 14		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 引子		
<400> 14		
cgggatccca ggtgtctggg gttacc		26
<210> 15		
<211> 109		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 15		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr		
100 105		
<210> 16		
<211> 327		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 16		
gaaatttgt tgacacagtc tccagtcacc ctgtttgt ctccaggaga aagagccacc		60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtagcca acagaaacct		120
ggccaggctc ccaggctct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc		180
aggttcgtgc gcagtgggtc tgggacagac ttcaacttca ccatcagcag cctagagcct		240
gaagattttt cagtttatta ttgtcagcag ctagcaact ggatgtacac ttttgccag		300
gggaccaagc tggagatcaa acgaact		327
<210> 17		

<211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 18

caggtccagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg ctctggagg caccctcagt ttctatgcta tcagctgggt gcgcacagggc	120
cctggacaag ggcttgaggat gatggggaggg tccatcccta tcttttgtgc agcaaactac	180
gcacagaagt tccaggcgag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagccctac	240
atggaaactga gcagccctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaatccct	300
agtgggagct actatacga ctacgatatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc	360
gtctccctca	369

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 19

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 20

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala 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

Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Ala Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 21

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 22

<211> 109

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Met Ser Ala Ser Leu Gly

1	5	10	15												
Glu	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
				20				25				30			
Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp
				35				40				45			
Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
				50				55				60			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu
				65				70				75			80
Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	His	Arg	Ser	Pro
				85				90				95			
Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg			
				100				105							
<210> 23															
<211> 224															
<212> PRT															
<213> 智人															
<220>															
<221> MISC_FEATURE															
<222> (16) . . (16)															
<223> Xaa 為 Pro 或 Leu															
<220>															
<221> MISC_FEATURE															
<222> (114) . . (114)															
<223> Xaa 為 Pro 或 Arg															
<220>															
<221> MISC-FEATURE															
<222> (114) . . (114)															
<223> Xaa 為 Pro 或 Leu															
<400> 23															
His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Xaa															
1 5 10 15															
Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val															
20 25 30															
Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Glu Met Phe Asn ASP Thr															
35 40 45															
Leu Arg Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe															
50 55 60															
Ser Ile Ser Arg Met Thr Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr															
65 70 75 80															
Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Val Ser Ala Pro Ser Asp Pro															
85 90 95															
Leu Asp Ile Val Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala															
100 105 110															
Gln Xaa Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys															
115 120 125															
Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu															
130 135 140															
Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe															
145 150 155 160															
Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg															



165

170

175

Cys Phe Gly Ser Phe His Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Lys Ser Ser
 180 185 190

Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly ASN Pro Ser ASN Ser Trp Pro
 195 200 205

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly ASN Pro Arg His Leu His
 210 215 220

<210> 24

<211> 224

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
 20 25 30

Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Lys Asp Thr
 35 40 45

Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
 50 55 60

Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
 65 70 75 80

Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
 85 90 95

Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
 100 105 110

Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys
 115 120 125

Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
 130 135 140

Ala His Glu Cys Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
 145 150 155 160

Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Tyr Tyr Arg
 165 170 175

Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser
 180 185 190

Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Ile Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
 195 200 205

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly ASN Pro Arg His Leu His
 210 215 220

<210> 25

<211> 224

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

His Gly Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
 20 25 30

Arg Phe Gln His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Lys Asp Thr
 35 40 45
 Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
 50 55 60
 Ser Ile Gly Pro Met Met Gin Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gin Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
 85 90 95
 Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
 100 105 110
 Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys
 115 120 125
 Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
 130 135 140
 Ala His Glu Arg Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
 145 150 155 160
 Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
 165 170 175
 Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser
 180 185 190
 Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
 195 200 205
 Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Glu Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
 210 215 220

<210> 26
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工
 <400> 26
 ctaatacgac tcactatagg gcaaggcgtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引子
 <400> 27
 ctaatacgac tcactatagg g 21

<210> 28
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引子
 <400> 28
 gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc 28

<210> 29
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>			
<223>	引子		
<400> 29	ctaatacgac tcactatagg gcaaggcgtg gatatcaacgc agagt	29	
<210> 30			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 人工			
<220>			
<223>	引子		
<400> 30	ctaatacgac tcactatagg g	21	
<210> 31			
<211> 23			
<212> DNA			
<213> 人工			
<220>			
<223>	引子		
<400> 31	gtgccagggg gaagaccgat ggg	23	
<210> 32			
<211> 16			
<212> DNA			
<213> 人工			
<220>			
<223>	引子		
<400> 32	gtaaaacgac ggccag	16	
<210> 33			
<211> 17			
<212> DNA			
<213> 人工			
<220>			
<223>	引子		
<400> 33	caggaaacag ctatgac	17	
<210> 34			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 34			
Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp			
1 5 10 15			
Thr Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Thr Trp Leu			
20 25 30			
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
35 40 45			
Lys Ala Ser Thr Leu Lys Thr Gly val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
50 55 60			

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Phe Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln His Tyr Ala Gly Tyr Ser Ala Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 35
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35

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

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36

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



Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Phe Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

<210> 38
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 38
 Gln Gly Gly Val His Arg Lys Pro Ser Phe Leu Ala Leu Pro Gly His
 1 5 10 15
 Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
 20 25 30
 Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Asn Asn Thr
 35 40 45
 Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
 50 55 60
 Ser Ile Gly Pro Met Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
 85 90 95
 Leu Asp Met Val
 100

<210> 39
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) . . (109)
 <223> Xaa 3 為 Q 或 R。Xaa 4 為 L 或 M。Xaa 9 為 S 或 F。Xaa 24 為 R 或 W。
 Xaa 32 為 A 或 Y。Xaa 41 為 G 或 A。Xaa 47 為 L 或 F。Xaa 50 為 D 或 Y。
 Xaa 55 為 E 或 Q。Xaa 71 為 F 或 Y。Xaa 74 為 A 或 T。

<400> 39

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

<210> 40

<211> 327

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> MISC_feature

<222> (1) . . (153)

<223> n8 為 a 或 g。n10 為 t 或 a。n26 為 c 或 t。n70 為 c 或 t。n75 為 a 或 c。
 n94 為 g 或 t。n95 為 c 或 a。n114 為 g 或 a。n122 為 g 或 c。n123 為 g 或 a。
 n129 為 t 或 c。n139 為 c 或 t。n141 為 g 或 c。n148 為 g 或 t。n153 為 c 或 a。

<220>

<221> MISC_feature

<222> (154)..(327)

<223> n162 為 g 或 a。n163 為 g 或 c。n207 為 a 或 g。n212 為 t 或 a。n220 為 g 或 a。

<400> 40

ggccatccngn	tgacccagtc	tccatnctcc	ctgtctgcat	ctgttaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcn	gggcnagtca	gggcattagc	agtnntttag	cctggtatca	gcanaaaacca	120
gnnaaagcnc	ctaaagctcnt	natctatnat	gcntccagtt	tnnaaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacngat	tnactctcn	ccatcagcag	cctgcagcc	240
gaagattttg	caacttattta	ctgtcaacag	tattatagta	ccccgctcac	tttcggcgg	300
gggaccaagg	tggagatcaa	acgaaact				327

<210> 41

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Asn	Ser	Tyr
					20				25			30			

Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

<210> 42
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 42
cagggtccagtc tggtgccagtc tggggctgag gttttaagaagc ctgggtccctc ggtgaaggtc 60
tccttcgaagg cttctggagg cacccctcaac agtattctta tttaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttggatgt gatggggaggg atcatcccta tattttggtagt agcaaactac 180
gcacagaagt tccaggcgcag agtcacgatt tccgcggacg aatccacgcg cacagtctac 240
atggagctga acatgtctgag atctgaggat acggccgtgtt attactgtgc gagaggatat 300
tacatgatattt tcaaggacta ctattacggat atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcctt ca 372

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗體序列
<400> 43

Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗體序列

<400> 44

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗體序列

<400> 45

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 46

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 47

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Phe Tyr Thr
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 48

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 49

Gly Phe Ser Phe Thr Phe Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 50

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
1 5 10 15

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 51

Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 52

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

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 53

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

Gly

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 54

Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 55

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗體序列

<400> 55

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
20 25 30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Asn Ser Glu Asn
35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr
 100 105 110
 Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 56
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 抗體序列

<400> 56

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

<210> 57
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 抗體序列

<400> 57

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

50	55	60	
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala			
65	70	75	80
Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln			
85	90	95	
Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr			
100	105	110	
Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp			
115	120	125	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
130	135	140	
 <210> 58			
<211> 140			
<212> PRT			
<213> 人工			
 <220>			
<223> 抗體序列			
 <400> 58			
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly			
1	5	10	15
Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg			
20	25	30	
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
35	40	45	
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn			
65	70	75	80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Asn			
85	90	95	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp			
115	120	125	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
130	135	140	

I664191

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：A61K; A61P

一、發明名稱：(中文/英文)

NK細胞調節治療及治療血液惡性疾病之方法

NK CELL MODULATING TREATMENTS AND METHODS FOR
TREATMENT OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

二、中文發明摘要：

本發明提供包含可中和NK細胞抑制性受體之化合物的組合物及使用該等組合物治療血液惡性疾病之方法。

三、英文發明摘要：

Compositions comprising compounds that neutralize NK cell inhibitory receptors and methods of using such compositions in the treatment of hematological malignancies are provided.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

八、圖式：

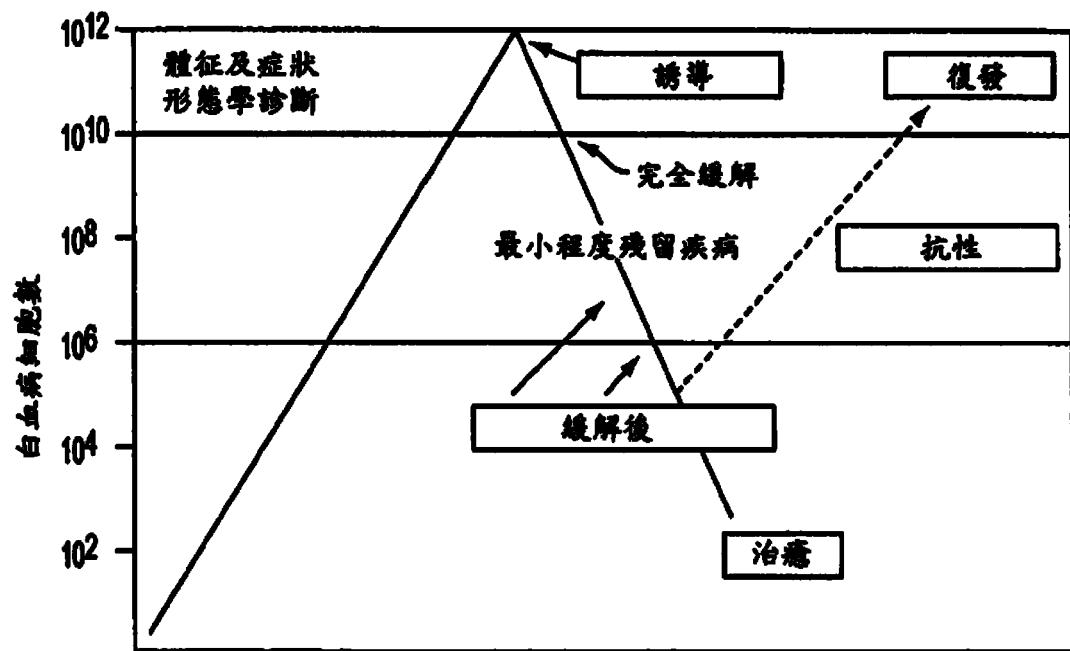


圖 1

DF200 VH

A

MAVLGLLPCLVTPSCVLS

**QVQLEQSGPGLVQPSQSLSIITCTVGFSFTPYGVHWVRQSPGKGLEWLGVVIWSGGNTDY
NAAFISRLSINKDMSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYCARNPRPGNYPYGMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO:9)**

B

GFSFTPYGVH (SEQ ID NO:10)

C

VIWSGGNTDYNAAFIS (SEQ ID NO:11)

D

NPRPGNYPYGMDY (SEQ ID NO:12)

圖 3

1 HEGVHRKPSL LAHPGRLVKS EETVILQCWS DVMFEHPLH REGMANPTLE
51 LTGEHHDGVS KANPSISRMT QLAGTYRCQ GSVTHSPEQV SAPSDPLDIV
101 IIGLYEKPSL SAQLGPTVLA GENVTLSRSSYDMYHLS REGEAHERRL
151 PAGPKVNGETF QADPPLGPAT HGGTYRCFGS PHDSPYEWSK SSDPLLVSVT
201 GNPSNSWPSP TEPSSKTGNP RHLH

圖 6

患者有效改善其生活品質之量的本發明組合物。在另一態樣中，本文所述之本發明方法可應用以顯著減少脊椎動物宿主體內之癌細胞數目，因此例如降低腫瘤細胞總數。在相關意義上，本發明提供殺死脊椎動物(諸如人類癌症患者)之前贅生性細胞及/或贅生性細胞的方法。視情況，癌症為選自由 AML、CML、MM、SMM 及 MGUS 組成之群的血液惡性疾病。

在另一態樣中，本發明提供抑制 NKCIR 之化合物的用途，其係用於製備用於治療患有或先前已患有血液惡性疾病前期或血液惡性疾病之個體的醫藥組合物。在此用途之一個實施例中，個體之疾病程度最小或不可偵測。在另一實施例中，個體患有血液惡性疾病前期。在另一實施例中，個體患有 SMM(潛伏性骨髓瘤)、MGUS(意義未明之單株 γ 球蛋白病)或 MDS(骨髓增生不良症候群)。

本發明亦提供用於治療患有或先前已患有血液惡性疾病前期或血液惡性疾病之個體的抑制 NKCIR 之化合物。

急性骨髓白血病(AML)

急性骨髓白血病(AML)在美國及歐洲為成人中最常見白血病類型之一。在 2006 年，美國估計診斷出約 11,930 例新增 AML 病例，佔所有癌症之 1% 以下及所有白血病之 34%。在 40 歲以下 AML 之發病率較低，但隨年齡逐漸增加，自 40 歲群體中每 100,000 人約 1 例增加至 75 歲及 75 歲以上群體中每 100,000 人 15 例以上。表現 AML 之中值患者年齡為 65 歲至 70 歲。較年輕 AML 患者之成功治療比年長 AML 患者之成

功治療常見得多。對於55歲至65歲或超過65歲之年長患者，自治療(誘導化學療法)至死亡之中值時間為5至10個月。儘管完全緩解率為約50%，但緩解通常短暫，且很少持續12個月以上。在誘導化學療法之後保持緩解3年的機率為10%以下。

年齡相關之結果差異與共同罹病及預後因素有關。許多年長患者不能耐受以細胞毒性劑之標準治療及其併發症。患有年齡相關慢性心臟、肺部、肝臟或腎臟病症之患者有較大之化學療法急性毒性風險。

異常核型特徵在AML中為常見的。核型在定義急性白血病之病理生理學、自然史及對療法之反應中之重要性為關鍵概念。最常與年輕AML患者治療失敗有關之細胞遺傳學異常(例如染色體5或7異常或複雜核型)顯著更常見於老年人中，存在於32%至57%之患者中。相反，「有利」細胞遺傳學異常(諸如 $t(8;21)$ 、 $t(15;17)$ 或 $inv(16)$)更常見於較年輕患者中且在某種程度上為造成其較佳無病存活期的原因。常用於AML中之某些疾病進展生物標記包括FLT3突變及/或NPM1突變，其為兩個最重要的正常核型AML之預後生物標記。FLT3在AML中一般為單個最重要之預後因素。約25%至35%之AML患者有FLT3突變。有FLT3突變之患者的結果及對標準化學療法之反應較差。

當前*AML*治療

用於大部分AML患者之治療策略分成兩個一般階段：誘導療法及緩解後療法，展示於圖1中。

七、申請專利範圍：

1. 一種結合並抑制自然殺手細胞抑制性受體(NKCIR)之抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製造藥劑，以供先前已接受過血液惡性疾病前期或血液惡性疾病治療之個體於其疾病程度不可偵測時治療選自潛伏性骨髓瘤(SMM)、急性骨髓白血病(AML)、多發性骨髓瘤(MM)之血液惡性疾病前期或血液惡性疾病，其中該個體具有選自FLT3或NpM1中之突變、位於免疫球蛋白(Ig)基因及/或T細胞受體基因之重排、染色體5或7異常、及/或複雜核型之與存活之不良預後有關之基因突變，且其中該抗NKCIR抗體或其抗原結合片段為與KIR2DL1及KIR2DL2/3結合之抗KIR(殺手免疫球蛋白樣受體)抗體或抗原結合片段，並具有阻斷或中和KIR2DL1及KIR2DL2/3介導之NK細胞抑制作用之能力，且從而增強NK細胞介導之細胞毒性。
2. 如請求項1之用途，其中
 - (i) 該個體先前已進行以下治療：化學治療劑、免疫調節藥物、放射療法、手術、抗激素劑、抗血管生成劑，或任何上述者之組合；
 - (ii) 該個體經歷部分反應或完全反應、處於緩解期、無症狀、異常細胞數目低及/或疾病程度不可偵測，其中
 - (a) 該個體全身白血病負荷低於約 10^9 個細胞及/或骨髓中母細胞小於5%及/或無白血病體徵或症狀；
 - (b) 該個體之血清蛋白M含量降低25%以上；

- (c) 該個體之血清蛋白M含量降低50%以上；
 - (d) 該個體骨髓中有10%或10%以上漿細胞，但其不符合MM之準則；
 - (e) 該個體之血清M蛋白大於或等於3 g/dL；
 - (f) 該個體骨髓中有10%或10%以上漿細胞而無終末器官損傷跡象；
 - (g) 該個體之血清M蛋白大於或等於3 g/dL，且骨髓中有10%或10%以上漿細胞；
 - (h) 該個體無終末器官損傷跡象；及/或
 - (i) 該個體骨髓中有10%以下之漿細胞；及/或
- (iii) 該抗KIR抗體或其抗原結合片段係
- (a)作為單治療劑；或
 - (b)與至少一種其他治療劑組合投與。
3. 如請求項1或2之用途，其中該抗KIR抗體或其抗原結合片段：
- (i) 為嵌合抗體、人類抗體或人類化抗體或其抗體片段；
 - (ii) 為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM同型抗體或其片段；
 - (iii) 為IgG1或IgG4同型抗體或其片段；
 - (iv) 包含Fc域，該Fc域包含至少一個影響效應功能、蛋白質水解、FcR結合、糖基化及半衰期中之一或多者的突變；
 - (v) 係投與一定量以使得NK細胞上之KIR2DL1及/或

KIR2DL2/3 實質上完全飽和至少約 1 週、至少約 2 週或至少約一個月之時期；

(vi) 以約每 2 週一次、約每月一次或約每 2 個月一次或更長時間一次之給藥頻率多次投與，且該抗體或抗體片段之後繼給藥相隔約 2 週或約 1 個月；

(vii) 以約 0.1 mg/kg 至約 3.0 mg/kg、約 0.3 mg/kg 至約 3.0 mg/kg、約 0.1 mg/kg 至約 1.0 mg/kg，或約 1.0 mg/kg 至約 3.0 mg/kg 之劑量範圍每 2 個月一次投與；

(viii) 以約 0.2 mg/kg、約 0.3 mg/kg、約 1.0 mg/kg 或約 3.0 mg/kg 之劑量投與；

(ix) 對 KIR2DL1 之解離常數 (K_D) 為至多 0.45 nM；

(x) 對 KIR2DL3 之 K_D 為至多 0.025 nM；

(xi) 結合至包含以下胺基酸殘基之 KIR2DL1 抗原決定基：L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 及 Y88；

(xii) 阻斷 HLA-Cw4 分子結合至具有 SEQ ID NO:23 所述之胺基酸序列之 KIR2DL1 之細胞外部分之殘基 M44、F45 及 D72；及 / 或

(xiii) 紣單株抗體或其片段。

4. 如請求項 3 之用途，其中該抗 KIR 抗體或其抗原結合片段

(i) 與包含具有 SEQ ID NO:15 所述之胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:17 所述之胺基酸序列之重鏈可變區之抗體競爭結合至 KIR2DL1、KIR2DL2 及 KIR2DL3 中之至少一者；

(ii) 包含具有 SEQ ID NO:15 所述之胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:17 所述之胺基酸序列之重鏈可變區；

(iii) 包含具有與 SEQ ID NO:15 所述之胺基酸序列至少 90% 序列一致性之輕鏈可變區，及 / 或具有與 SEQ ID NO:17 所述之胺基酸序列至少 90% 序列一致性之重鏈可變區；

(iv) 與包含具有 SEQ ID NO:15 所述之胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:17 所述之胺基酸序列之重鏈可變區之抗體競爭結合至 KIR2DL1、KIR2DL2 及 KIR2DL3 中之每一者；或

(v) 包含具有對應於 SEQ ID NO:17 之殘基 31-35 之胺基酸序列之重鏈 CDR1；具有對應於 SEQ ID NO:17 之殘基 50-65 之胺基酸序列之重鏈 CDR2；具有對應於 SEQ ID NO:17 之殘基 99-112 之胺基酸序列之重鏈 CDR3；具有對應於 SEQ ID NO:15 之殘基 24-34 之胺基酸序列之輕鏈 CDR1；具有對應於 SEQ ID NO:15 之殘基 50-56 之胺基酸序列之輕鏈 CDR2；及具有對應於 SEQ ID NO:15 之殘基 89-97 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3。

5. 如請求項 3 之用途，其中該抗體為抗 KIR 抗體或其抗原結合片段，其

(i) 與包含具有 SEQ ID NO:55 所述之胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:57 所述之胺基酸序列之重鏈可變區之抗體競爭結合至 KIR2DL1、KIR2DL2 及

KIR2DL3 中之至少一者；

- (ii) 包含具有 SEQ ID NO:55 所述之胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:57 所述之胺基酸序列之重鏈可變區；
- (iii) 包含具有與 SEQ ID NO:55 所述之胺基酸序列至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 序列一致性之輕鏈可變區；
- (iv) 包含具有與 SEQ ID NO:57 所述之胺基酸序列至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 序列一致性之重鏈可變區；
- (v) 包含具有 SEQ ID NO:56 所述之胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:58 所述之胺基酸序列之重鏈可變區
- (vi) 包含具有與 SEQ ID NO:56 所述之胺基酸序列至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 序列一致性之輕鏈可變區；
- (vii) 包含具有與 SEQ ID NO:58 所述之胺基酸序列至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 序列一致性之重鏈可變區；
- (viii) 包含具有 SEQ ID NO:57 中所含之胺基酸序列之重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 多肽；
- (ix) 包含具有 SEQ ID NO:55 中所含之胺基酸序列之輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 多肽；
- (x) 包含具有 SEQ ID NO:58 中所含之胺基酸序列之重鏈

CDR1、CDR2及CDR3多肽；

(xi) 包含具有SEQ ID NO:56中所含之胺基酸序列之輕鏈
CDR1、CDR2及CDR3多肽；

(xii) 包含具有SEQ ID NO:49所述之胺基酸序列之重鏈
CDR1；具有SEQ ID NO:50所述之胺基酸序列之重鏈
CDR2；及具有SEQ ID NO:51所述之胺基酸序列之重鏈
CDR3；

(xiii) 包含具有SEQ ID NO:43所述之胺基酸序列之輕鏈
CDR1；具有SEQ ID NO:45所述之胺基酸序列之輕鏈
CDR2；及具有SEQ ID NO:47所述之胺基酸序列之輕鏈
CDR3；及/或

(xiv) 包含具有SEQ ID NO:57所述之胺基酸序列之重鏈
可變區。

6. 如請求項1之用途，其中偵測該個體是否具有該與存活
之不良預後有關之基因突變包含：

(i) 由該個體分離細胞樣本；

(ii) 鑑別異常細胞群體；

(iii) 分選異常細胞群體；

(iv) 自分離之異常細胞分離核酸；及

(v) 使所分離之核酸與一或多種靶向與存活之不良預後
有關之基因突變的核酸接觸。

7. 如請求項6之用途，其中該血液惡性疾病為AML，且該
與存活之不良預後有關之基因突變為FLT3或NpM1中之
突變。