

公告本
 附件：第 094140326 號說明書訂正本
發明專利說明書 (季)

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：094140326

※申請日期：94 年 11 月 16 日

 ※IPC 分類：A61K38/17, C07K14/55, 14/435
 A61P35/00

一、發明名稱：

(中) 產生能避免介白素 2 與其受體結合之自體抗體的免疫治療調製劑及彼於治療癌症上之用途

(英) Immunotherapeutic formulations to generate autoantibodies capable to avoid the binding of interleukin-2 to its receptor, their use in the treatment of cancer

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 分子免疫學中心

(英) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

代表人：(中) 1. 奧古斯汀 達維拉

(英) 1. DAVILA, AGUSTIN BIENVENIDO LAGE

地址：(中) 古巴罕巴拿城亞塔貝 2 1 6 及 1 5 街

(英) Calle 216 Esq. 15, Atabey, Ciudad de la Habana 12100, Cuba

國籍：(中英) 古巴 CUBA

三、發明人：(共 4 人)

1. 姓名：(中) 荷西 卡西米羅

(英) CASIMIRO, JOSE ENRIQUE MONTERO

國籍：(中) 古巴

(英) CUBA

2. 姓名：(中) 李文 沙度

(英) SARDUY, LIVAN BLADIMIR ALONSO

國籍：(中) 古巴

(英) CUBA

3. 姓名：(中) 羅蘭度 羅立奎

(英) RODRIGUEZ, ROLANDO PEREZ

國籍：(中) 古巴

(英) CUBA

4.姓 名：(中) 奧古斯丁 達維拉
(英) DAVILA, AGUSTIN BIENVENIDO LAGE
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 古巴 ; 2004/11/16 ; CU 261-2004 有主張優先權

五、中文發明摘要

發明之名稱：產生能避免介白素 2 與其受體結合之自體抗體的免疫治療調製劑及彼於治療癌症上之用途

本發明係關於建基於疫苗及能夠中和介白素 -2 (interleukin-2) 之單株抗體的醫藥組成物，該組成物可用於治療腫瘤。

特別是，本發明乃關於治療性調製劑，其能夠增加與源自腦膜炎奈瑟菌 (*Neisseria Meningitidis*) 之載體蛋白 P64K 共軛之 IL-2 於 Montanide ISA 51 佐劑中誘發能夠中和 IL-2 之自體抗體的免疫原性，且關於治療腫瘤 (包括乳癌) 之有效方法。

又，本發明亦關於建基於 IL-2 之疫苗與其他建基於特定腫瘤抗原或腫瘤生長因子之癌症疫苗及供癌症治療之標準使用的化學治療劑或放射線治療之治療性組合。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

IMMUNOTHERAPEUTIC FORMULATIONS TO GENERATE AUTOANTIBODIES CAPABLE TO AVOID THE BINDING OF INTERLEUKIN-2 TO ITS RECEPTOR, THEIR USE IN THE TREATMENT OF CANCER

The present invention is related to pharmaceutical compositions based on vaccines and monoclonal antibodies that neutralize the Interleukin-2, which are useful in the treatment of tumors.

Particularly the present invention is related to therapeutic formulations able to increase the immunogenicity of the IL-2 conjugated to the carrier protein P64k from the *Neisseria Meningitidis* in Montanide ISA 51 adjuvant for the induction of IL-2 neutralizing autoantibodies and the effective methods for the treatment of tumors, including breast cancer.

Furthermore, the present invention is related to therapeutic combination of the IL-2 based vaccine with other cancer vaccines based on specific tumor antigens or tumor growth factors, as well as chemotherapeutics agents or radiotherapy of standard use for cancer treatment.

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(4)圖

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於醫藥調製劑，此調製劑能夠增強針對介白素-2(IL-2)之免疫反應並產生能夠阻斷 IL-2 與彼之受體結合的自體抗體，且此調製劑可用於治療腫瘤。

【先前技術】

免疫系統及特別是 T 細胞能識別腫瘤抗原之能力的發現乃為發展操控免疫系統之策略的基本支柱之一，該策略之目的係為治療患有癌症之病人。

於是，為開發能找出浸潤腫瘤基質之特定 T 細胞(被認知為腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL))或源自未受處理之個人的周圍血液之特定 T 細胞或於使用治療性癌症疫苗後所產生之特定 T 細胞的方法，主要努力方向業已導向刺激此等細胞以增強彼等之活體內抗腫瘤效應作用能力。

因此，主要策略已被引導至增強對各種腫瘤相關抗原(TAA)的特定細胞毒性活性。主要治療方法已聚焦於活體外使用介白素-2(IL-2)以活化並擴增源自患有腫瘤之個體的 TIL，隨後對該等個體再輸注該 TIL(Rosenberg, S.A. et al.,(1986)Science 233, 1318-1321; Kawakami, Y. et al.,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91, 6458-6462; Kawakami, Y. et al.,(1994)Proc.Natl. Acad. Sci.USA 91, 3515-3519)。然而，不論於活體外得到經證實對細胞免疫反應之刺激，此類介入只有有限之治療結果。此事實乃導

致評估以使用治療性癌症疫苗之活性特定致免疫方案為基礎之治療形式，其中對該癌症疫苗設計含有與 IL-2 關連之腫瘤抗原的疫苗載體，藉以促進於活體內誘發有效之細胞免疫反應，但是這些方法產生拙劣的結果 (Rosenberg, S.A. et al., (1998) Nat. Med. 4, 321-327)。

最近，主要之臨床策略已轉移至開發以過繼轉移病患之針對自身腫瘤抗原的反應性 T 細胞為基礎之形式。使用抗 CD3 單株抗體 (mAb) 及 IL-2 於活體外刺激並擴增此等細胞，然後經再輸注至血流後，非經腸施予 IL-2。此方法被認為是治療癌症患者之多種主要治療性介入方式之一，雖然治療結果依然分歧 (Dudley, M.E. et al., (2002) Science 298, 850-854; Rosenberg, S.A. et al., (2004) Proc Natl Acad Sci. USA. 101 Suppl 2, 14639-45)。

所有該等治療策略的合理設計係依據使用 IL-2 作為抗腫瘤之免疫反應的細胞活化之必要分子 (US 6,060,068 及 US 5,830,452)。

IL-2 在免疫上之功能的基礎係依據於活體外所進行之實驗。由其發現，確認 IL-2 能夠刺激 T 細胞增殖 (故 IL-2 同義語係 T 細胞生長因子)。使用抗 IL-2 或抗 IL-2 受體可於活體外抑制 T 細胞之增殖及功能，進而證實此概念 (Smith, KA, Immunol Rev 51: 337-357, 1980)。

最近，經實驗證實：人體腫瘤可透過產生具有抗腫瘤免疫性之抑制性能力的 T 細胞以減少免疫系統之反應。這些細胞業已在展現不同分化標記之動物模式及病患體內經

特徵界定，雖然該等分化標記之相關性不同於實驗模式 (Bach, J.F.(2003)Nat Rev Immunol 3, 189-198; Chakraborty, N.G.et al.,(2004)Hum Immunol 65, 794-802; Markus, Y.M.y Sykes, M.(2004)J.Clin Oncol 22, 1136-1151)。

分化簇 25(CD25)乃構成 IL-2 受體之 α 鏈。此外，此細胞活素之受體的結構包含 β 鏈 (CD122)及 γ 鏈 (CD132)。該等鏈係由靜息之 T 淋巴細胞結構性表現，且此等細胞之活化會誘發 α 鏈之合成、高親和性雜三聚體受體之形成及 IL-2 分泌。CD25 係由 5~10%之 CD4+T 淋巴細胞及少於 1%之周圍 CD8+T 淋巴細胞結構性表現。這些細胞係無能 T 細胞且在活體外展現抑制性活性 (Shevach, E.M.(2002)Nat Rev Immunol 2, 389-400)。

最近業經證實：被動性投予抗 CD25mAb 對某些實驗腫瘤會誘發抗腫瘤反應，雖然其他腫瘤對此治療未有反應 (Onizuka S.et al.,(1999)Cancer Res 59, 3128-3133)。

免疫系統在誘發針對自體分子之反應的能力受到限制，特別是針對可溶性分子，諸如生長因子。然而，藉由經結合載體蛋白且於佐劑內被乳化之此等因子的活性致免疫作用會促進誘發針對此等分子的免疫反應 (US 5,984,018)。針對自體或異體分子所產生之特異性自體抗體會抑制該等分子與彼等之受體結合，進而阻斷因該結合所引發之增殖機轉。

由這些結果，可被認知為目前之技藝狀態是：抗腫瘤

反應取決於 IL-2 存在。因此，本案發明人決定活體內特徵界定抗 IL-2 自體抗體對腫瘤演化上的衝擊，該抗 IL-2 自體抗體係被於佐劑內與載體分子共軛之 IL-2 之主動免疫作用所誘發。

令人驚奇的是，阻斷 IL-2 與彼之受體結合之自體抗體的誘發作用會促進腫瘤生長之減緩，甚至亦能減緩對由被動性投予抗 CD25mAb 所誘發之抗腫瘤效果呈抗性之腫瘤之生長。此外，此類自體抗體之存在並不影響受處理之患者對癌症疫苗之免疫反應。

【發明內容】

本發明係關於對治療腫瘤有效之治療性調製劑，對此治療，受試個體的免疫系統所扮演的角色很重要。特別是，本發明包含能夠生成自體抗體之免疫治療性調製劑之製備，該自體抗體能阻斷介白素-2 與其受體結合並抑制腫瘤生長。

本發明之目的乃為治療性調製劑，其能抑制 IL-2 與其受體結合且可用於治療癌症患者，其中該調製劑包含與載體蛋白共軛之 IL-2 或其肽類；此外，此調製劑含有適宜之佐劑。特別是，本發明之治療性調製劑包括衍生自腦膜炎奈瑟菌之載體蛋白 P64K，且該佐劑選自氫氧化鋁及 Montanide ISA 51。

於本發明之一體現中，該治療性調製劑包含藉由化學共軛方式與 P64K 共軛之 IL-2。於本發明之另一體現中，

該調製劑包含呈融合蛋白型式之 IL-2 或其肽類及 P64K。

又，本發明之治療性調製劑能抑制 IL-2 與其受體結合且可用於治療癌症患者，且該治療性調製劑包括針對人 IL-2(hIL-2)之專一性單株抗體。

治療癌症患者之方法亦為本發明之目的，該方法需要阻斷 IL-2 與其受體結合，藉以引發針對腫瘤之適宜免疫反應，該方法包括投予含有 IL-2 或針對 IL-2 之抗體的疫苗組成物。

另一方面，本發明乃關於由建基於 IL-2 之疫苗與建基於專一性腫瘤抗原或腫瘤生長因子之其他癌症疫苗及真正慣常使用之化學治療劑或放射線治療所構成之治療性組合(體)。

該“治療性組合(體)”一詞係指物理組合(即呈混合物)，即二種不同且分離之構成成份的聯結(例如呈套組之型式)且彼等以組合方式治療患者。因此，醫藥組合體乃為治療療程所使用之組合體，該治療療程涉及二種化合物之投予，或如同藉於治療過程中投予相同患者之獨立劑量，藉物理聯結以達成此治療。

“癌症疫苗”一詞約指活性免疫治療之有用藥劑，使得此疫苗在個體內引發免疫反應，該免疫反應能識別用於該疫苗內之抗原且可被測量。

1.-獲得致免疫性組成物

本發明之疫苗組成物含有充當活性成份之與載體蛋白

共軛之人重組介白素-2(hIL-2r)，該載體蛋白宜為衍生自腦膜炎奈瑟菌 P64K 之外膜錯合物的蛋白(EP 04741313 A2 及 US 5,286,484)。此外，本疫苗組成物含有適當之佐劑。本發明之疫苗宜使用 Montanide ISA 51 充當佐劑。

hIL-2r 與載體蛋白間之共軛可藉化學共軛或藉基因工程技術獲致之融合蛋白的建構完成。

-獲得含有 hIL-2 之疫苗組成物，該 hIL-2 係藉化學共軛與 P64K 蛋白共軛。

為欲達成 hIL-2r 與 P64K 蛋白之蛋白共軛，將二種成份以由 20:1 至 5:1(hIL-2 之莫耳數對 P64K 蛋白之莫耳數)，宜為 10:1(hIL-2r 莫耳對 P64K 莫耳數)之不同比率混合。將戊二醛加至此混合物內，使其最終濃度介於 0.02 至 0.1%，宜為 0.5%，然後於室溫下培養 1-5 小時。最後，令培養物充分透析過經磷酸鹽緩衝之食鹽水(PBS)溶液。共軛反應乃藉 10%SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳法(Laemmli UK(1970)Nature 277, 680-685)予以證實。

-獲得融合蛋白之疫苗組成物，該融合蛋白係 hIL-2r 與 P64K 蛋白之融合產物。

藉聚合物酶鏈反應(PCR)，使用專一性引子，將編碼人 IL-2(447pb)之基因擴增。將生成之 DNA 片段酶切，然後將之連接表現載體之一特定結合部位，於該表現載體中，已轉殖有編碼載體蛋白之基因，故生成之蛋白乃包括前述分子之一或多複製。任何來自哺乳類細胞及細菌或酵母之表現載體皆可予使用。此載體亦可包括 6 個組胺酸在載

體蛋白之 N 終端。形成之質體可藉下列步驟予以證實：於瓊脂凝膠電泳內進行限制酶切分析，接著使用酵素 Sequenase 2,0(Amersham-USB)進行 DNA 序列之分析，最後經由“西方印漬法”技術，使用特定之抗 hIL-2 單株抗體來分析融合蛋白在大腸桿菌之任何表現株內之產製。為欲獲得蛋白，使用強破裂法將細菌細胞壁打破，然後藉差異沈澱法(使用硫酸銨)及層析法之組合來純化蛋白。最後，於無菌狀況下過濾蛋白，並於 -20°C 下保存或經冷凍乾燥後，於 4°C 保存直至使用為止。

獲得含有肽類之疫苗組成物，該肽類係衍生自經與 P64K 蛋白化學共軛之 hIL-2r 或呈融合蛋白之偶合者。

衍生自 IL-2 胺基酸序列的肽類(除以化學合成方式獲得)可藉化學共軛與 P64K 蛋白偶合，如述於 US 5,984,018。或者，由衍生自 hIL-2r 之肽及 P64K 蛋白所構成之融合蛋白實質上乃藉如同述及於前部份之方法製得。其例子可包括來自下列區段之肽類。

- | | |
|--------|-----------------------|
| 1) 肽 | $N^{33}-A^{50}$ |
| 胺基酸數目： | 18 |
| 序列： | NPKLTRMLTFK FYMPKKA |
| 2) 肽 | $T^{113}-T^{133}$ |
| 胺基酸數目： | 21 |
| 序列： | TIVEFLNRWITFCQSIISTLT |

-化學共軛物 hIL-2r-P64K 之電泳

本電泳作用可藉 10%SDS 聚丙烯凝膠電泳法 (Laemmli U.K.(1970)Nature 277, 680-685)法進行。使用 15mg 樣品於每阱內，並以考馬斯 (Coomassie)予以染色。

2.-疫苗組成物所產生之效果的特徵顯示，該疫苗組成物含有 hIL-2r 及蛋白 P64K。預臨床研究。

-疫苗組成物之免疫原性

為欲在動物內研究本發明之疫苗製劑的免疫原性，乃使用 8-12 週齡、體重 18-20g 之雌性 BALB/C 小白鼠。於實驗期間，使小白鼠於標準之飼養及運作條件下起居，該標準條件係依照 Good Practices of Care of and Use of the Experimental Animals，於 Standard Operation Procedures (SOPs)下建立者。它可遵循下列不同之免疫作用規劃：

-規劃 A，將 hIL-2r(係結合於 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗內)4- μ g 當量(係存在於 0.1mL 疫苗內)經由肌肉內途徑予以投服每二週一次，輪流注入四肢之免疫作用部位內。

-規劃 B，將 hIL-2r(係結合於 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗內)10- μ g 當量(係存在於 0.1mL 疫苗內)經由肌肉內途徑予以投服，最先二劑量係同時投服於二肢之各別免疫作用部位，而於二週後，二劑量則投服於其他二肢內。

-抗體對 hIL-2r 之反應的評估，該反應係被 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗所誘發。

自體抗體之力價可藉同前技藝狀態內現成可得之方法

之一於血清內予以偵測，上述之現成可得的方法係用於測量阻斷性抗體或評估周圍血液內之專一性免疫反應，測量專一性抗體或 B 細胞。

被疫苗 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 所誘發之抗-hIL-2r 抗體可藉間接 ELISA(酵素-聯接之免疫吸附劑定量分析)，使用來自被免疫之動物之血清而予以評估，其體現乃如下所述者：

取 96 阱平底微滴定碟 (Coostar, High Binding USA)，覆蓋以 50 μ L/阱之 hIL-2r，該 hIL-2r 係於碳酸鹽-碳酸氫鹽 0.1M，pH9.6 溶液內被調製成 10 μ g/ml 濃度者。將此平底碟於 4 $^{\circ}$ C 保溫過夜，然後以含有 0.05% Tween 20 之 PBS(PBS-Tween 20)加以清洗，具清洗量為 200 μ L/阱。然後，使平底碟內之各阱含有 100 μ L 之含有 1% 小牛血清白蛋白之 PBS(PBS-BSA 1%)，於 37 $^{\circ}$ C 下保溫 1 小時，然後以 PBS-Tween 20 以 200 μ L/阱之量清洗此平底碟，然後加入血清樣品 50 μ L/阱，該血清樣品係被 PBS-BSA 1% 稀釋成濃度不同之稀釋液者。俟於 37 $^{\circ}$ C 保溫一小時後，將平底碟清洗以 PBS-Tween 20，加入結合鹼性磷酸酶之山羊抗小白鼠血清 (Jackson Immunoresearch Laboratories)，其量為 50 μ L/阱，該結合物係被 PBS-BSA 稀釋 1/5000 倍數者，並於 37 $^{\circ}$ C 保溫一小時。將此平底碟清洗，並加入受酶作用物溶液 50 μ L/阱，此溶液係由磷酸對硝基苯酯 (Sigma) 之二乙醇緩衝溶液 (pH9.8) 1 μ g/mL 所構成。經於室溫下將平底碟保溫 30 分鐘後，使用 ELISA 解讀計

(Organon Teknika, Austria), 於 405nm 下測量反應產物之吸光值。

-被建基於 EGF 之疫苗所誘發之抗-hEGF 抗體反應的評估

自體抗體之力價可藉目前技藝狀態內現成可得之方法之一，於血清內予以偵測，上述之現成可得的方法係用於測量阻斷性抗體或評估周圍血液之專一性免疫反應，測量專一性抗體或 B 細胞。

被建基於 EGF 之疫苗所誘發之抗-hEGF 抗體可經間接之 ELISA(酵素-聯接之免疫吸附定量分析)，使用來自被免疫之動物的血清而予以評估，如同述及於 Gonzalez, G.et al.,(2002)Vaccine Research 5, 233-244。

-對於受血清培養後之 CTLL-2 細胞系增殖的效果，該血清係來自受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 或針對 hIL-2r 之專一性單株抗體(mAb)接種之血清。

於連續接種條件下，使取決於 IL-2 之 T 細胞 CTLL-2 於含有 1U/ml hIL-2 之 RPMI-1640 基質內增殖。CTLL-2 係於含有 25mL RPMI-1640 之 75cm² 細胞培養燒瓶內培養，該 RPMI-1640 含有 8-20%牛胎血清(FCS)，呈內含 0.5×10^5 - 10^6 細胞/mL 之懸浮液狀態。於玻管內擴增二日後，使用此等細胞。

為欲進行定量分析，由玻管內培養物萃取細胞，以 RPMI-1640 或 PBS 清洗細胞不少於 4 次。於 96 平底培養碟(Coaster, High Binding USA)內，接種以 5×10^3 細胞。

將細胞處理以血清，其比例為 1 : 10000，該血清係取自受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗或受抗 IL-2 專一性 mAb 免疫之動物，且證明對 IL-2 展現 ELSA 力價，並加入 hIL-2r 至上述含有細胞之血清內，使其濃度達 1U/mL。於 5%CO₂ 保溫器內，於濕氣下，於 37°C 進行培養 24 小時。增殖則藉於培養最後 18 至 24 小時期間因 [³H]胸苷濃度衝擊(進入細胞內)而予以測定，胸苷之進入細胞內係於液體閃爍計數器內予以測量，所有之運作乃於無菌狀態下進行。

3-hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗之抗腫瘤效果。預臨床研究。

為欲在動物體內研究本發明疫苗製劑之抗腫瘤效果，8-12 週齡，18-20g 重之 BALB/C 小白鼠乃加以使用。動物可依照先前詳述之規劃 A 及 B，使動物受 hIL-2-P64K/Montanide ISA 51 疫苗之免疫，並於一週後，經由正位皮下途徑，接種以乳房腫瘤 F3II 形式存在之腫瘤細胞系，其接種量為 5×10^4 細胞/動物。將帶有摸得出之腫瘤的動物作記號為陽性，並使用一測徑器來測量腫瘤生長，同時界定最長之表面長度(a)及其垂直寬度(b)，並將其腫瘤尺寸記錄成 a×b。以週期方式檢驗腫瘤。

令人驚奇且意料不到的是，本發明之作者業已發現到，在患有惡性腫瘤之受試者體內 IL-2 與其受體之結合中和作用、增強針對此腫瘤之免疫反應、及引起減小腫瘤大小。先前技藝指出：此類作用將造成個體之免疫系統對該腫

瘤之反應受抑制。

本作者發現到：當個體接受本發明之疫苗組成物的主動治療時，當循環之 IL-2 量實質減低時，可得到對腫瘤生長之此種功效，如同當接受抗 IL-2 單株抗體之被動治療所得到之腫瘤大小減小之效果般。

基於此理由，本發明乃導致不可否認之治療罹患惡性腫瘤之病人的益處，且提供有效之 IL-2 免疫接種方法，對病人而言，此方法較用於此等案例之傳統治療方法有效，簡單，且較少惱人及侵略性。

下列實例包括實驗細節，說明本發明之疫苗組成物之有效性。

【實施方式】

用於本發明疫苗組成物之重組 IL-2(hIL-2)在市面上可以獲得(US 5,614,185)。該疫苗所使用之源自腦膜炎奈瑟菌之蛋白 P64K 係藉由 EP 0474313 A2 和 US 5,286,484 所描述之重組 DNA 技術所獲得。

實例 1：hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗所誘發之抗體反應。

為欲增進針對人介白素-2 之致免疫性，乃將此 hIL-2 以化學方式結合至來自腦膜炎奈瑟菌之載體蛋白 P64K 蛋白。此化學結合作用可藉戊二醛方法來達成(US 5,984,018)。藉 10% SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳法，結合之

效率乃予以證實，分別使用各成份 (hIL-2, P64K) 之樣品以與化學共軛物 hIL-2r-P64K 及分子量之一標準樣式作比較。吾人可以證實：由於在施加 hIL-2r-P64K 之路徑存有連續部份，可驗證得到共軛物 (圖 1)。

為欲評估針對被 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗所誘發之 hIL-2r 的抗體反應，吾人乃依規劃 A 及 B 方式使 BALB/C 小白鼠免疫。將對 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗反應之取自動物的超免疫血清用作一陽性對照體，而將預免疫血清用作一陰性對照體。被免疫之動物之抗體力價的定義係指某一血清濃度，當被稀釋至此血清濃度時，血清之光密度乃大於預免疫血清之光密度的平均值加上 5 倍平均偏差值。為欲界定對照動物內之力價，吾人乃引用先前所述之標準，但使用 1%PBS-BSA 代替預免疫血清作為陰性對照體。誘發抗體反應，計達由 1:100 至 1:50000 之抗體力價。使免疫作用方案持續 52 日，為了需要修飾此方案以獲得類似或較佳之抗體力價的理由，吾人乃使用規劃 B，並獲得類似之結果，如圖 2 內所列示者。

實例 2：受血清處理之 CTLL-2 細胞系的增殖試驗，上述之血清係取自被 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗免疫之動物。

將於受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗免疫之動物內產生之血清抗體，藉以 IL-2-依賴性 T 細胞系 CTLL-2

予以培養而評估血清抗體之玻管內 IL-2 鍵聯能力。詳言之，於 IL-2 之存在下，將 CTLL-2 細胞接種於培養平碟內，使細胞生長，然後加入取自動物之不同血清稀釋液（帶有約 1 : 10000 抗體力價）。觀察到血清濃度與 CTLL-2 細胞系增殖之受抑制有直接關係（圖 3）。此事實說明來自被接種之動物之血清在玻管中展現 IL-2 中和能力。

實例 3：在受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗處理之動物內進行之抗-腫瘤實驗。

依照規劃 B 之方式，使動物受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗之免疫。一週後，將 5×10^4 F3II 腫瘤細胞接種於動物內。與受 PBS-P64K/Montanide ISA 51 免疫之對照組比較之下，腫瘤生長動力學在受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 免疫之動物內顯得較慢（圖 4d），吾人觀察到：在這二組之間腫瘤尺寸顯現統計學上有意義之差別。

實例 4：受抗-IL-2 專一性 mAb 處理之 CTLL 細胞系之增殖試驗。

將針對被 S4B6(ATCC#HB-8794)雜交瘤產生之 hIL-2r 之專一性抗體以 IL-2-依賴性 T-細胞系 CTLL-2 予以培養，評估其玻管內 IL-2 鍵聯能力。詳言之，於 IL-2 存在下，將 CTLL-2 細胞接種於培養平碟內，使其生長，然後加入不同濃度之抗體稀釋液。吾人觀察到：抗體濃度與 CTLL-2 細胞系增殖之受抑制有直接之關係（圖 5）。發現到：1 : 100 抗體

稀釋液能夠抑制大於 80%CTLL-2 細胞系增殖，證明單株抗體之玻管內 IL-2 中和能力。

實例 5：抗 -IL-2mAb 及抗 -CD25mAb(ATCC-PC61)之抗腫瘤效果。F3II 實驗模式(乳房腫瘤)。

使小白鼠連續 5 日受專一性單株抗體(抗 -IL-2mAb 或抗 -CD25mAb)之 1mg 每日劑量之處理。二日後，藉正位皮下注射，將實驗用乳房腫瘤細胞 F3II 接種於小白鼠內，其量為 5×10^4 細胞/小白鼠。週期性測量最長之表面長度(s)及其垂直寬度(b)。對照組(受 PBS 處理)之腫瘤尺寸大於受抗 -IL-2mAb 處理組之尺寸(圖 6)。二實驗組間之腫瘤尺寸顯示統計學上之不同。然而，在受抗 -CD25mAb (ATCC-PC61)處理之動物內之腫瘤尺寸類似於對照組之尺寸。此結果顯示 IL-2 中和抗體即使在 CD25 調節細胞之移除仍未有效果之腫瘤內展現強力之抗腫瘤效果。

實例 6：抗 -IL-2mAb 及抗 -CD25mAb(ATCC-PC61)之抗 -腫瘤效果，EL4 實驗模式(淋巴瘤)。

將 EL4 淋巴瘤皮下接種於 C57BL/6 動物內，其劑量為 5×10^4 細胞/小白鼠。於腫瘤接種前 2 日，將抗 -CD25mAb(PC61)以 1mg 之單一劑量經靜脈內注射動物，或於腫瘤接種前 6 日開始，經靜脈內施予抗 -IL-2mAb(S4B6)每日劑量 1mg 達連續 5 日。依據先前述及之類似規劃，令其他小白鼠組一併投服抗 -CD25 及抗 -IL-2mAbs。

將各組之腫瘤生長情形記錄。於接種腫瘤後，測量各小白鼠內二垂直維度內之腫瘤尺寸，每週測量二次。就 EL4 腫瘤而言，其統計學上之差異為 * $p=0.0232$ ，** $p=0.0039$ ，*** $p<0.0001$ 。

圖 7 顯示二種單株抗體之組合展現對腫瘤生長之強烈效果。

實例 7：抗-IL-2 自體抗體之誘發並不影響建基於 EGF 之癌疫苗

本實例乃評估針對表皮生長因子 (hEGF)(它係被 hEGF-P64K/Montanide ISA 51 癌疫苗所誘發者)之抗體反應是否會被先前受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗之免疫所影響。

詳言之，依照規劃 A 之方式，使 BALB/C 小白鼠受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗之免疫，並於 9 日後，受 hEGF-P64K/Montanide ISA 51 疫苗或 hEGF-/Montanide ISA 51 疫苗之免疫。取 $4\mu\text{g}$ 當量之共軛 hEGF，懸浮於 0.1mL 液體後，應用依 hEGF-P64K/Montanide ISA 51 疫苗之實驗模式，經皮下途徑予以接種。將對 hEGF-P64K/Montanide ISA 51 疫苗反應之取自動物的超免疫血清用作一陽性對照體，而將預免疫血清用作一陰性對照體。被免疫之動物之抗體力價的定義係指某一血清濃度，當被稀釋至此血清濃度時，血清之光密度乃大於預免疫血清之光密度的平均值加上 5 倍平均偏差值。為欲界定對

照動物內之力價，吾人乃引用先前所述之標準。但使用 1%PBS-BSA 代替預免疫血清作為陰性對照體。針對 hEGF 之抗體反應並不受前述抗-IL-2 抗體之誘發作用的影響，如圖 8 內所列示者。

實例 8：介白素-2 在活體內之受中和使得細胞分解活性恢復-此係於帶有腫瘤之宿主之淋巴結內評估者

在帶有腫瘤之宿主內，IL-2 對針對名義抗原之免疫反應所展現之中和效果乃加以評估。詳言之，於標準飼養條件下，圈養雌性 C57BL/6J 小白鼠(H-2^b)。於所有之實驗中，使用 6 及 12 週歲間大之小白鼠。卵白蛋白(OVA)及肽類：OVA grade VII(Sigma, St.Louis, MO)乃這些實驗所使用之示範蛋白 Ag。主要肽 OVA₂₇₅₋₂₆₄(SIINFEKL)乃以純度 >90% 情況下加以使用。增殖定量分析：對 C57BL/6 小白鼠接種 MB16F10 腫瘤 10⁴ 細胞之 PBS 懸浮液，其接種途徑為皮下注射，部位在左肋腹。週期性地測量腫瘤直徑。三週後，以如下方式使這些小白鼠免疫：於 0 日，以 OVA 1mg 及 Polyinosinic: polycytidylic acid [poly 1: C](PIC) (Sigma, St.Louis, MO)100mg/小白鼠之劑量皮下注射。隨後 2 日僅投服 PIC。同時，使動物受針對 hIL-2r(α IL-2)之專一性單株抗體之 PBS 懸浮液的處理連續 5 日。使用天然小白鼠之脾細胞來測定活體內細胞分解活性，該脾細胞係經螢光染料 CFSE(Molecular Probes, Paisley, UK)區別地標記。被 CFSE 高度標記之細胞乃

被用作標的，且以 SIINFEKL($1\ \mu\text{M}$; 於 37°C 保持 90 分鐘， $5\%\text{CO}_2$) 予以刺激，然而被 CFSE 低度標記之細胞則維持不被刺激以充當內部對照體。經肽刺激之標的細胞乃被充分清洗以移除游離肽，然後將此標的細胞以 1:1 比率共同靜脈內注入前述之被免疫的小白鼠內。16 小時後，移除淋巴結及脾細胞，並藉細胞計數法測定對應於二種螢光強度(CFSE 低度及 CFSE 高度)上總結果，計算未加入及加入 SIINFEKL($\text{CFSE}^{\text{int}}/\text{CFSE}^{\text{high}}$)之百分率間的比率，以獲得細胞毒性之一數值。於活體內，於受 OVA 加上 PIC 免疫之 C57BL/6 小白鼠內評估之由 OVA 肽類所引起之淋巴結細胞之細胞分解活性乃促成最大之反應。藉靜脈注射 1mg 抗-IL-2 單株抗體之每日劑量連續 5 日期間，在這些動物內之細胞溶解反應並不受影響。受 MB16F10 腫瘤接種之 C57BL/6 小白鼠變成免疫受抑制，由 OVA 所引起之細胞分解活性亦告降低。然而，活體內投服具有 IL-2 中和能力之一單株抗體之結果乃使得淋巴細胞之免疫反應恢復(圖 9)。

實例 9：介白素-2 之活體內之中和作用使得細胞分解活性恢復-此事實係於帶有腫瘤之宿主之脾細胞內評估者

IL-2 對帶有腫瘤之宿主內之名義上抗原之免疫反應的中和效果乃加以評估。詳言之，使 C57BL/6 小白鼠受 OVA 加上 PIC 之免疫作用，然後於活體內評估由 OVA 肽所引起之脾細胞的細胞分解活性，得一最大反應。藉靜脈

注射 1mg 抗-IL-2 單株抗體之每日劑量連續 5 日期間，在這些動物內之細胞分解反應並不受影響。

受 MB16F10 腫瘤接種之 C57BL/6 小白鼠變成免疫受抑制。由 OVA 所引起之細胞分解活性亦告減低。然而，活體內投服具有 IL-2 中和能力之一單株抗體之結果乃使得脾細胞之免疫反應恢復(圖 10)。

實例 10：於受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗免疫之動物內進行紅血球細胞種類

本實驗係用於評估是否 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗會誘發紅血球細胞計數之減緩。將依照規劃 A 被免疫之動物及一對照組於第 1 次注射 100 日後，比較紅血球細胞、白血球細胞及血小板之數目。在這些二組間之細胞數目未有差異，如圖 11 內所示者。

【圖式簡單說明】

圖 1-化學結合之 hIL-2r-P64K 之電泳。由左至右之帶乃對應於 P64K，hIL-2r，hIL-2r-P64K 以及分子量之一標準樣式。

圖 2-針對 hIL-2r 之抗體的力價。該抗體係藉接種 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 而被誘發者，而接種則使用先前說明之免疫規劃。y 軸代表針對 IL-2 之抗體之力價的幾何平均值。x 軸則代表對應於受下列物質免疫之動物的群體。

對照組：P64K/Montanide ISA 51。

Sch A IL-2：hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51，依照規劃 A 免疫。

Sch B IL-2：hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51，依照規劃 B 免疫。

圖 3-於 hIL-2r 存在下，於不同稀釋液內展現之 CTLL-2 系之增殖，上述之稀釋液係來自受疫苗 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 免疫之動物血清，而其力價則由 1：1000 至最高 1：50000。

圖 4-受疫苗 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 或疫苗 P64K/Montanide ISA 51(對照組)接種，然後再被 F3II 腫瘤種種之動物的腫瘤生長。y 軸乃代表腫瘤面積，其定義為較大之直徑乘以垂直方向選出之較小直徑。

圖 5-在 hIL-2r 存在下，對應針對 IL-2 之抗體的不同稀釋液之 CTLL-2 細胞系之增殖。

圖 6-經 F3II 腫瘤細胞系攻擊且經抗 IL-2mAb、抗 CD25mAb 或 PBS(對照組)處理之動物的腫瘤生長。y 軸代表腫瘤面積，其定義為直徑乘以垂直方向選出之較小直徑。

圖 7-受抗 IL-2mAb 及/或抗 -CD25mAb 處理或受 PBS 處理(對照組)，接著受淋巴瘤 EL4 接種後腫瘤之生長。y 軸代表腫瘤面積，其定義為直徑乘以垂直方向選出之較小直徑。

圖 8-因接種 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 及 hEGF-

P64K/Montanide ISA 51 而誘發之抗體對 EGF 之力價。y 軸係代表抗體對 EGF 之力價的幾何平均值。x 軸則代表被下列物質免疫之群體：

hIL-2r : hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51。

hEGF : hEGF/Montanide ISA 51

hIL-2r+hEGF : hIL-2r-P64K/Montanide+hEGF/Montanide

hEGF/P64K : hIL-2r-P64K/Montanide+hEGF/Montanide

hIL-2r+hEGF/P64K : hIL-2r-P64K/Montanide+hEGF/P64K/Montanide。

圖 9 由介白素 -2 誘發出之抗體使細胞分解活性恢復，此係於帶有腫瘤之宿主之淋巴結細胞內評估者。

於第 0 日將 OVA 加上 PIC 皮下注射於所有小白鼠使之免疫，OVA 之劑量為 1mg 每隻小白鼠，而 PIC 劑量則為 100mg/每隻，其後連續二日則僅投服 PIC。使用取自天然小白鼠之脾細胞(它被螢光染料 CFSE 差別地標記)來測定活體內細胞分解活性。被高度標記 CFSE 之細胞乃用作標的且被 SIINF EKL 刺激，而被低度標記 CFSE 之細胞則未被刺激以充當內部對照組，然後以 1:1 比率共同靜脈內注射於先前被免疫之小白鼠內。於淋巴結細胞內評估細胞分解活性。

對照組 - 受 PBS， α IL-2 處理之動物 - 受 IL-2 中和抗體，MB16F10 處理之動物 - 類似於對照組但受 MB16F10， α IL-2+MB16F10 接種之動物 - 受 IL-2 中和單株抗體處理之帶有 MB16F10 腫瘤之小白鼠。

圖 10-由介白素-2 誘發出之抗體使得細胞分解活性恢復，此係於帶有腫瘤細胞之宿主的脾細胞內評估者。

於第 0 日將 OVA 加上 PIC 皮下注射於所有之小白鼠使之免疫，OVA 之劑量為 1mg/每隻小白鼠，而 PIC 之劑量則為 100mg/每隻，其後連續二日則僅投服 PIC。使用取自天然小白鼠之脾細胞(它被螢光染料 CFSE 差別地標記)來測定活體內細胞分解活性。被高度標記 CFSE 之細胞乃用作標的且被 SIIFEKL 刺激，而被低度標記 CFSE 之細胞則未被刺激以充當內部對照組，然後以 1:1 比率共同靜脈內注射於先前被免疫之小白鼠內，於脾細胞內評估細胞分解活性。

對照組 - 受 PBS， α IL-2 處理之動物 - 受 IL-2 中和單株抗體，MB16F10 處理之動物 - 類似於對照組但受 MB16F10， α IL-2+NB16F10 接種之動物 - 受 IL-2 中和單株抗體處理之帶有 MB16F10 腫瘤細胞之小白鼠。

圖 11-相較於對照組(P64K/Montanide ISA 51)，受 hIL-2r-P64K/Montanide ISA 51 疫苗接種之動物內之白血球、紅血球及血小板數。

102年1月4日修(更)正

公告本

十、申請專利範圍

1. 一種抗 IL-2 中和單株抗體於製備治療性調製劑之用途，該治療性調製劑係藉由增強個體針對惡性腫瘤之免疫反應以治療該惡性腫瘤，其中該抗 IL-2 中和單株抗體阻斷 IL-2 與彼之受體結合且其中該抗 IL-2 中和單株抗體減少個體內循環 IL-2 量。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該抗 IL-2 中和單株抗體係針對人 IL-2。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，其中該治療性調製劑包含抗 IL-2 中和單株抗體與建基於腫瘤生長因子的癌症疫苗之組合。

公告本

圖 1

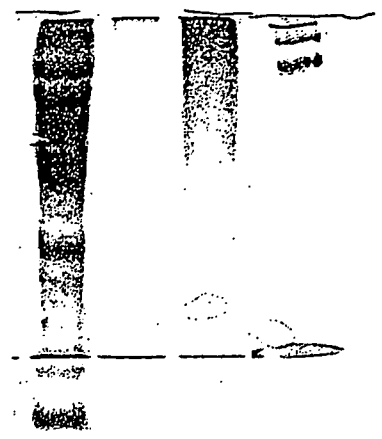


圖 2

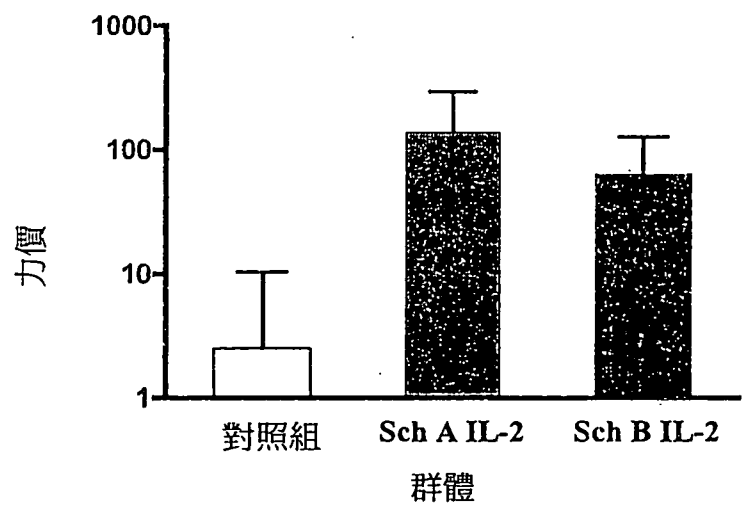


圖3

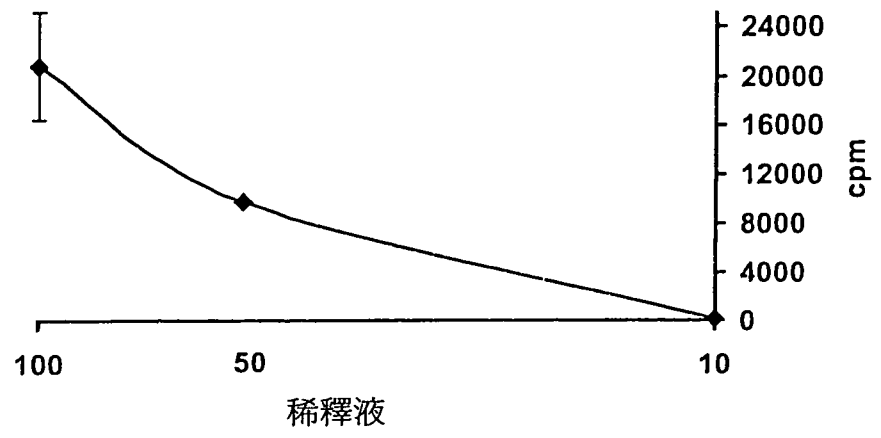


圖4

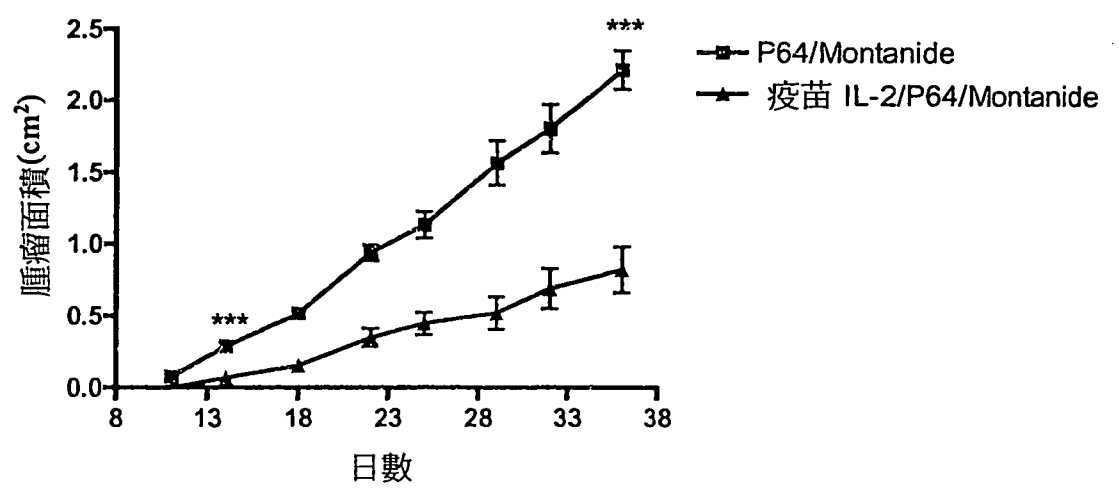


圖5

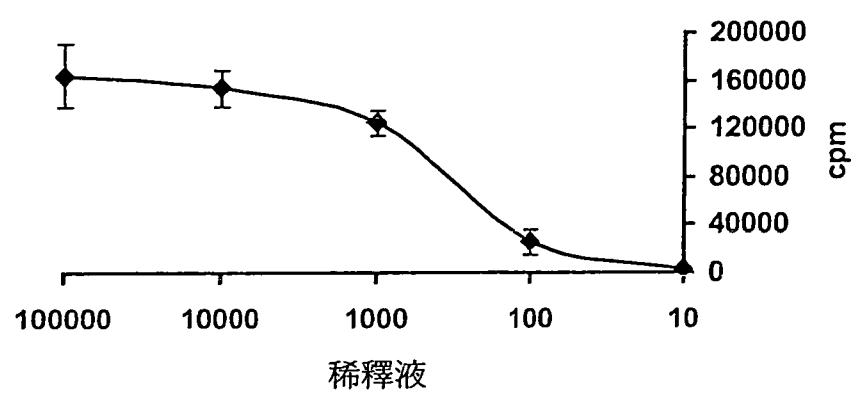


圖6

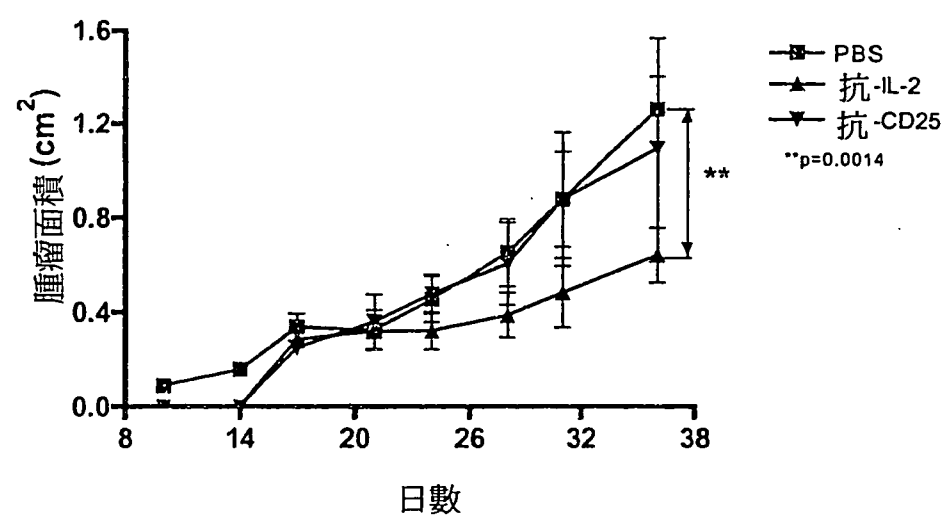


圖7

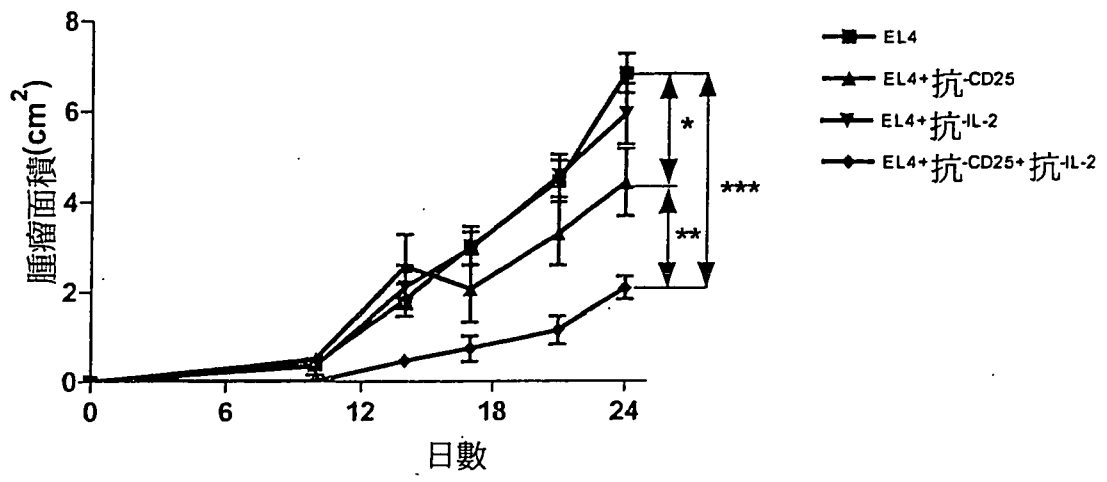


圖8

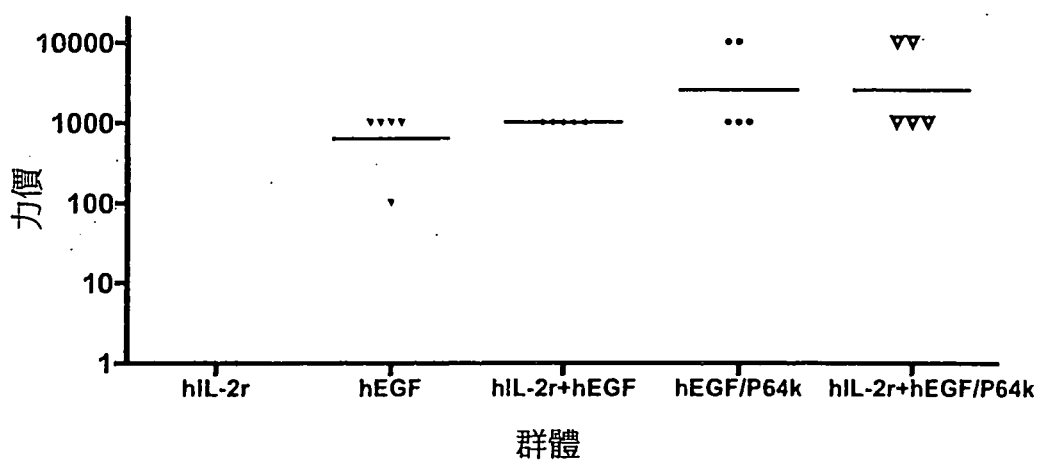


圖9

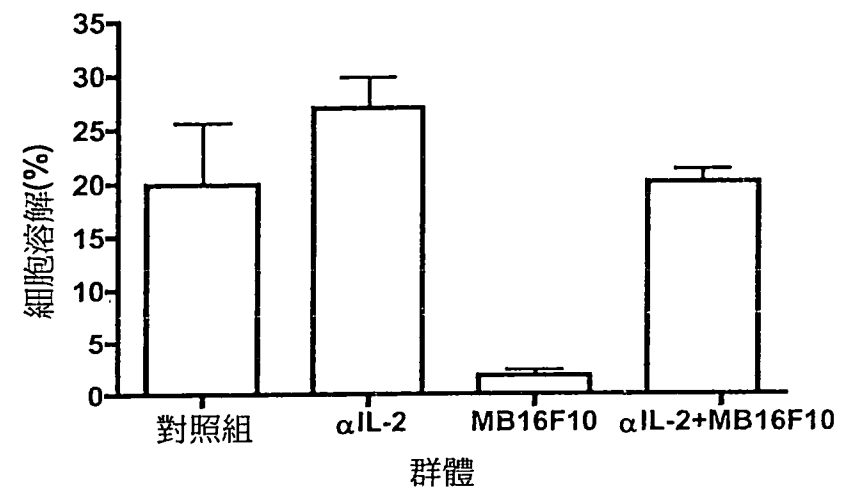


圖10

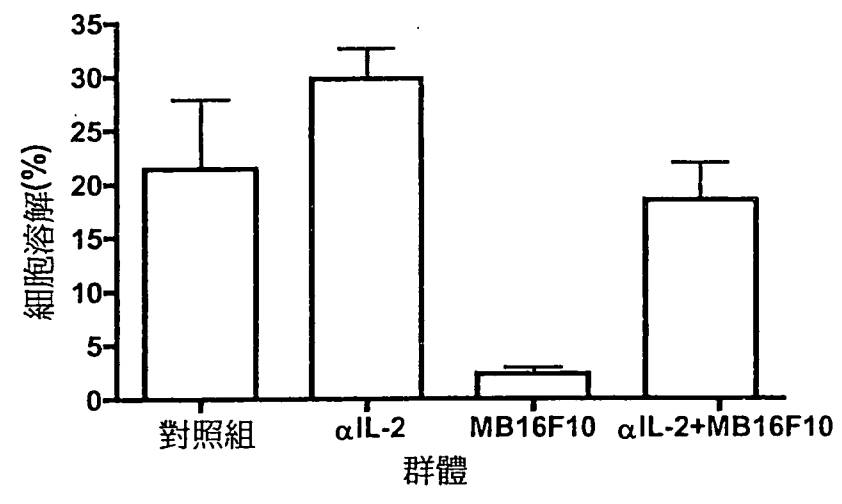


圖 11

