



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201014602 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098123109 (22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 07 月 08 日
(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
C12N15/11 (2006.01)
(30)優先權：2008/07/08 美國 61/134,264
2008/10/23 美國 61/197,258
(71)申請人：亞培公司 (美國) ABBOTT LABORATORIES (US)
美國
(72)發明人：古寄傑 GU, JIJIE (US)；哈晴斯 查爾司 W HUTCHINS, CHARLES W. (US)；朱
蓉蓉 ZHU, RONG-RONG (CN)；勝 蔣偉 SHEN, JIANWEI (US)；哈瑞思 馬利
亞 C HARRIS, MARIA C. (IT)；柏蘭格 愛琳 BELANGER, EILEEN (US)；穆塔
薩 安瓦 MURTAZA, ANWAR (US)；塔克沙 艾迪特 TARCSA, EDIT (US)；史
汀 威廉 B STINE, WILLIAM B. (US)；辛 瓊明 HSIEH, CHUNG MING (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：92 項 圖式數：9 共 235 頁

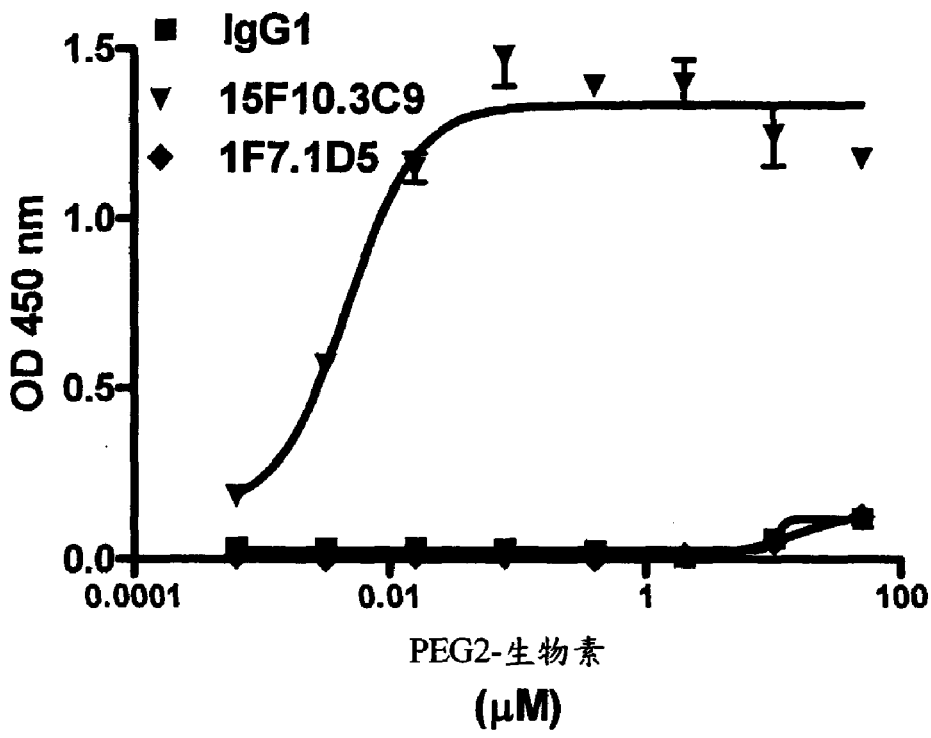
(54)名稱

前列腺素 E₂ 結合蛋白及其用途

PROSTAGLANDIN E₂ BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明涵蓋前列腺素 E₂(PGE₂)結合蛋白。本發明係關於為野生型、嵌合、CDR 移植及人類化抗體之抗體。較佳抗體對前列腺素 E₂ 具有高親和力且可中和前列腺素 E₂ 之活體外及活體內活性。本發明抗體可為全長抗體或其抗原結合部分。本發明亦提供本發明抗體之製備方法及使用方法。本發明抗體或抗原結合部分適用於偵測前列腺素 E₂ 及例如在罹患前列腺素 E₂ 活性有害之病症的人類個體中抑制前列腺素 E₂ 活性。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201014602 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098123109 (22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 07 月 08 日
(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
C12N15/11 (2006.01)
(30)優先權：2008/07/08 美國 61/134,264
2008/10/23 美國 61/197,258
(71)申請人：亞培公司 (美國) ABBOTT LABORATORIES (US)
美國
(72)發明人：古寄傑 GU, JIJIE (US)；哈晴斯 查爾司 W HUTCHINS, CHARLES W. (US)；朱
蓉蓉 ZHU, RONG-RONG (CN)；勝 蔣偉 SHEN, JIANWEI (US)；哈瑞思 馬利
亞 C HARRIS, MARIA C. (IT)；柏蘭格 愛琳 BELANGER, EILEEN (US)；穆塔
薩 安瓦 MURTAZA, ANWAR (US)；塔克沙 艾迪特 TARCSA, EDIT (US)；史
汀 威廉 B STINE, WILLIAM B. (US)；辛 瓊明 HSIEH, CHUNG MING (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：92 項 圖式數：9 共 235 頁

(54)名稱

前列腺素 E₂ 結合蛋白及其用途

PROSTAGLANDIN E₂ BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明涵蓋前列腺素 E₂(PGE₂)結合蛋白。本發明係關於為野生型、嵌合、CDR 移植及人類化抗體之抗體。較佳抗體對前列腺素 E₂ 具有高親和力且可中和前列腺素 E₂ 之活體外及活體內活性。本發明抗體可為全長抗體或其抗原結合部分。本發明亦提供本發明抗體之製備方法及使用方法。本發明抗體或抗原結合部分適用於偵測前列腺素 E₂ 及例如在罹患前列腺素 E₂ 活性有害之病症的人類個體中抑制前列腺素 E₂ 活性。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於結合蛋白及其組合物，例如對諸如前列腺素E₂(PGE₂)之脂質代謝物具特異性之抗體及抗原結合部分，及其製備方法、表徵方法及在預防、診斷及治療疾病中之使用方法。

本申請案為主張2008年7月8日申請之美國臨時申請案第61/134,264號及2008年10月23日申請之美國臨時申請案第61/197,258號之優先權的非臨時申請案，該等申請案之內容以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

諸如前列腺素(PG)、凝血脂素(TX)、白三烯(LT)及神經鞘胺醇-1-磷酸酯之生物活性脂質在各種病症之病源學中起關鍵生理學作用。(Wymann, MP及Schneiter R, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(2):162-76 (2008))。在發炎期間，細胞磷脂酶(尤其磷脂酶A₂及C)被活化且將細胞膜磷脂降解為花生四烯酸(AA)。AA藉由兩種主要途徑環加氧酶(COX)及脂質加氧酶(LO)路徑代謝。COX路徑產生前列腺素(PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、前列環素或PGI₂，及凝血脂素A₂或TXA₂)。LO路徑具有兩個分支；5-LO路徑產生白三烯(例如LTA₄、LTB₄、LTC₄、LTD₄、LTE₄及LTF₄)且15-LO路徑產生脂氧素(例如LXA₄、LXB₄)。諸如前列腺素(PG)、凝血脂素(TX)及白三烯(LT)之前列腺素類化合物具有各種生理學活性以在體內保持局部內穩定(The

Pharmacological Basis of Therapeutics, Gilman等人編，第7版，第660頁，Macmillan Publishing Co., New York (1985)。COX、PG G₂/PG H₂之產物藉由組織特異性異構酶的作用轉化成特異性PG，從而產生PGI₂、TXA₂、PGD₂、PGE₂及PGF_{2α}。PG之生物功能由組織特異性細胞表面視紫質樣七次跨膜G蛋白偶合受體(GPCR)介導。各PG之精確生理學/病理學作用由細胞環境(cellular context)、受體表現概況、配位體親和力及與信號轉導路徑之差異偶合確定(Haluska等人，Annu. Rev. Pharm. Tox. 10:213 (1989)；Prostanoids and their Receptors. In Comprehensive Medicinal Chemistry，第643頁，Pergamon Press, Oxford (1990))。PG一般在血管舒縮運動性調節、睡/醒週期、腸分泌、脂肪分解、腎小球過濾、肥大細胞去顆粒、神經傳遞、血小板凝集、黃體分解、子宮肌層收縮及分娩、發炎及關節炎、開放性動脈導管、細胞生長及分化，及免疫反應之調控中起多種生理學作用。在病理生理學方面，PG亦在包括疼痛及發炎、癌症、神經疾病、心血管疾病及高血壓之多種疾病中涉及。

前列腺素E₂(PGE₂)為前列腺素類化合物家族之成員。PGE₂廣泛參與胃腸道收縮及鬆弛、胃酸分泌、平滑肌鬆弛及神經傳遞質釋放。已鑑別出PGE₂之四種次型之受體，包括EP1、EP2、EP3及EP4(Negishi, M.等人，J. Lipid Mediators Cell Signalling, 12:379-391 (1995))，其各自涉及於不同信號轉導路徑中。

PGE₂為AA代謝之COX路徑的主要產物。其為關節中合成之主要PG且在發炎及關節炎之發病機制中起重要作用。已鑑別出5種PGE₂合成酶。(Smith WL, Am. J. Physiol. 263(2 Pt 2):F181-91 (1992))。在此等五種合成酶中，膜PGE合成酶(mPGES)-1似乎為負責PGE₂產生之關鍵PGE₂轉化酶。MPGES-1呈現相對於其他PGE合成酶之最高催化活性且與COX-1及/或COX-2結合發揮作用將PGH₂轉化為PGE₂。使用mPGES-1 KO小鼠(Kamei, D.等人, J. Biol. Chem., 279(32):33684-95 (2004); Trebino, C.E.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(15):9044-9 (2003))、特異性PGE₂受體同功異型物KO小鼠(McCoy, J.M.等人, J. Clin. Invest., 110(5):651-8 (2002); Majima, M.等人, Trends Pharmacol. Sci., 24(10):524-9 (2003); 及Amano, H.等人, J. Exp. Med., 197(2):221-32 (2003))及抗PGE₂特異性抗體(Portanova, J.P.等人, J. Exp. Med., 184(3):883-91 (1996); Zhang, Y.等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 283(3):1069-75(1997))進行之研究表明PGE₂在類風濕性關節炎(RA)、疼痛及發炎及癌症發展的動物模型中起重要作用。在不存在mPGES-1之狀況下，COX-1、COX-2及其他PGE₂合成酶之含量保持相對不變。mPGES-1 KO小鼠相較於野生型小鼠而言有活力、能生育且正常發育。然而，其在以各種發炎刺激物挑戰後呈現PGE₂之基礎產生量以及PGE₂自巨噬細胞之產生的急劇降低。此外，TXA₂之產生增加。mPGES-1 KO小鼠顯示降低之發病率及關節炎發展

的嚴重程度，且在不同模型中顯示對疼痛及發炎的抗性。若干實驗室已獨立產生不同EP受體同功異型物KO小鼠。此等小鼠有活力、能生育且正常發育。使用特異性EP同功異型物KO小鼠進行之研究證明PGE₂的各種功能係經特異性EP同功異型物介導。舉例而言，缺乏EP4同功異型物明顯影響小鼠之關節炎發展的嚴重程度，而缺乏EP3藉由調節基質細胞的VEGF產生及血管生成來影響腫瘤發展及進展。

現咸信前列腺素之生物合成及代謝中之缺陷在自體免疫及發炎病症之病源學中起重要作用。舉例而言，來自罹患類風濕性關節炎之患者的滑膜組織相較於來自未受影響個體之滑膜組織產生較大量的PGE₂及前列腺素F_{2α}(PGF_{2α}) (Blotman, F.等人，Rev. Rhum. Mal. Osteoartic, 46(4):243-7 (1979))。類似地，展現繼發於食物不耐之全身及腸胃症狀之患者中出現PGE₂及PGF_{2α}的合成增加。因此，繼發於某些食物攝取後之偏頭痛可能為2系列前列腺素之合成增加的結果。多發性硬化症亦與前列腺素PGE₁及PGE₂之正常含量的不平衡有關。生殖的多個方面(例如生育、妊娠及分娩)可受前列腺素調控。前列腺素在生殖生理學中亦起重要作用。過量前列腺素合成引起痛經及分娩，其可藉由靜脈內投與前列腺素或藉由插入前列腺素子宮托誘發。(Wang L.等人，Occup. Environ. Med. 61(12):1021-1026 (2004))。PGE₂過量合成亦在諸如不孕症、反覆流產、先兆驚厥及驚厥之生殖病症中起重要作用。因此，對阻斷或

調節 PGE₂ 之生物功能的對 PGE₂ 具特異性之抗體存在需要，其可用於預防及治療與過量產生 PGE₂ 有關之疾病以及用於診斷目的。

高特異性、高親和力 (K_D 為約 300 pM) 之抗 PGE₂ mAb、2B5 之產生業已報導過 (Mnich SJ 等人, *J. Immunol.* 155(9):4437-44 (1995))。在小鼠中之疼痛及發炎及大鼠中佐劑誘發之關節炎的動物模型中測定 2B5 相對於 COX-1,2 抑制劑吲哚美辛 (indomethacin) 之功效。(Portanova JP 等人, *J. Exp. Med.* 184(3):883-91 (1996))。此等研究明顯顯示 2B5 在減輕疼痛及發炎以及關節炎嚴重程度方面與吲哚美辛一樣有效，推論在此等動物模型中 PGE₂ 為 AA 代謝之 COX-1,2 路徑的關鍵參與者。

用 COX 抑制劑抑制 pan-PG 產生已成為幾十年來充分確認之治療策略。已知 COX 之兩種同功異型物 COX-1 及 COX-2，其各自由不同基因編碼。兩種同功異型物執行基本上相同之催化反應且具有類似三級結構 (Garavito RM 等人, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:183-206 (2003))。COX-1 幾乎在所有組織中會組成性地表現且咸信主要負責正常「管家」功能，諸如胃細胞保護及內穩定。相反地，COX-2 則會組成性地表現於特定組織中，且在發炎及癌症部位會高度地誘導出來。因此，認為 COX-2 介導之 PG 產生在發炎及癌症部位扮演重要的作用。慣用非類固醇消炎藥 (NSAID) (例如阿司匹靈 (aspirin)、吲哚美辛、布洛芬 (ibuprofen)) 抑制此兩種 COX 同功異型物。此等化合物為疼

痛、類風濕性關節炎(RA)、骨關節炎(OA)及心血管疾病的最廣泛使用之藥物，而現在考慮用以預防結腸癌及AD。慣用NSAID之主要不利條件為高風險人群中之胃及腎不良事件，咸信其係由抑制COX-1引起。因此，咸信第二代NSAID(COX-2選擇性抑制劑，例如賽利克西(celecoxib)、西樂葆(Celebrex)；羅非考昔(rofecoxib)、萬絡(Vioxx)；伐地考昔(valdecoxib)、貝曲(Bextra))具有更佳治療概況。此假定已導致其廣泛用於疼痛、RA及OA。自從在1999年核准第一種COX-2抑制劑以來，2004年COX-2抑制劑的總銷售額為約五十億美元。然而，最近一些COX-2選擇性抑制劑由於某些COX-2抑制劑在高風險患者中的心血管副作用而撤離市場，且正受FDA審查。可能由於COX抑制劑抑制所有PG之能力且尤其由於COX抑制劑差別干擾PGI₂及TXA₂(此兩者皆在保持心血管內穩定中起重要作用)產生之能力而產生與COX抑制劑相關之不利條件(Martínez-González J. 等人，Curr. Pharm. Des. 13(22):2215-2227 (2007))。抑制COX可使更多AA可用於LO路徑，因此增加可能造成與COX抑制相關之不良影響的白三烯及脂氧素之產生。使用COX-1及/或COX-2基因剔除小鼠及COX-1及COX-2特異性抑制劑進行的新近研究亦表明，關於兩種COX同功異型物之生理學作用的假定不正確。(Loftin, C.D. 等人，Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69:177-85 (2002))。此等研究表明COX-1及COX-2在供應PG以保持組織內穩定中皆有重要作用，且兩種同功異型物皆可造

成諸如疼痛、發炎及癌症之疾病發展。因此，以特異性抗體阻斷COX-1及COX-2路徑下游之有害PGE₂似乎為治療某些人類疾病之有吸引力的方法。

重要生物活性前列腺素之另一實例為PGD₂。PGD₂為肥大細胞在免疫挑戰時產生之花生四烯酸的主要環加氧酶產物(Lewis等人, *J. Immunol.* 129:1627-1631 (1982))。活肥大細胞(PGD₂之主要來源)為在諸如哮喘、過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、過敏性皮膚炎及其他疾病之病狀中驅動過敏性反應之一種關鍵作用者(Brightling等人, *Clin. Exp. Allergy* 33:550-556 (2003))。新近研究已顯示PGD₂經在多種人類組織中表現之兩種不同G蛋白偶合受體(GPCR)D-前列腺素類化合物受體(DP)及第2型輔助T細胞(CRTH2)上表現之化學引誘劑受體同源分子發揮其作用。PGD₂/CRTH2系統介導嗜伊紅血球、嗜鹼性細胞及Th2細胞之趨化性，其牽涉於過敏性發炎之誘發中(Ulven T等人, *Curr. Top. Med. Chem.* 6(13):1427-1444 (2006))。PGD₂之許多作用係經由其對表現於上皮及平滑肌上之G蛋白偶合受體D型前列腺素(「DP」)受體的作用介導。在哮喘中，長期以來已公認呼吸上皮為驅使疾病進展之發炎性細胞激素及趨化因子之關鍵來源(Holgate等人, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:113-117 (2000))。在哮喘之實驗鼠類模型中，氣管上皮上之DP受體在抗原挑戰時顯著上調(Matsuoka等人, *Science* 287:2013-2017 (2000))。DP受體牽涉於人類過敏性鼻炎中，其係特徵為打噴嚏、癢癢、鼻出血及鼻充

血之症狀的常見過敏性疾病。已顯示DP拮抗劑有效緩解多種物種之過敏性鼻炎症狀，且更特定言之已顯示抑制抗原誘發之鼻充血(過敏性鼻炎之最明顯症狀)(Jones等人，Am. J. Resp. Crit. Care Med. 167:A218 (2003)；Arimura等人，S-5751. J. Pharmacol. Exp. Ther. 298(2):411-9 (2001))。DP拮抗劑在過敏性結膜炎及過敏性皮膚炎之實驗模型中亦有效(Arimura等人，S-5751. J. Pharmacol. Exp. Ther. 298(2):411-9 (2001)；Torisu等人，Bioorg. & Med. Chem. 12:5361-5378 (2004))。因此，亦需要對PGD₂具特異性且阻斷或調節其生物功能，且因此可用於預防及治療與PGD₂過度表現有關之疾病之受體。

神經鞘胺醇-1-磷酸酯(S1P)為誘發許多細胞效應之生物活性脂質的另一實例，包括導致血小板凝集、細胞增殖、細胞形態、腫瘤細胞侵入、內皮細胞趨化性及內皮細胞活體外血管生成之彼等效應。因此，S1P受體為諸如傷口癒合及腫瘤生長抑制之治療應用的良好目標。S1P部分經由一組名為S1P1、S1P2、S1P3、S1P4及S1P5(原名分別為EDG-1、EDG-5、EDG-3、EDG-6及EDG-8)之G蛋白偶合受體向細胞傳導信號。此等受體與結構上相關之溶血磷脂酸(LPA)的三種其他受體(LPA1、LPA2及LPA3(原名為EDG-2、EDG-4及EDG-7))共有50-55%胺基酸及叢集一致性。(Ishii, I.等人，Mol. Pharmacol. 58(5):895-902 (2000))。在G蛋白偶合受體(GPCR)中，當配位體與彼受體結合時誘發構形改變，從而導致相關G蛋白之 α 次單元上的GDP置換為

GTP且隨後使G蛋白釋放至細胞質中。 α 次單元隨後自 $\beta\gamma$ 次單元解離且各次單元可隨後與效應蛋白締合，該等效應蛋白使第二信使活化而產生細胞反應。最終G蛋白上之GTP被水解成GDP，且G蛋白之次單元再次彼此締合且隨後與受體締合。擴增對一般GPCR途徑具有重要作用。一配位體與一受體結合導致許多G蛋白活化，其各自能夠與許多效應蛋白締合，導致擴增之細胞反應。由於個別受體皆為組織特異性與反應特異性受體，因此S1P受體成為良好藥物目標。由於開發對一種受體具有選擇性之促效劑或拮抗劑使細胞反應侷限於含彼受體之組織從而限制不當副作用，因此S1P受體之組織特異性係重要的。由於S1P受體之反應特異性允許開發出在不影響其他反應之狀況下啟始或抑制某些細胞反應之促效劑或拮抗劑，因此其亦係重要的。舉例而言，S1P受體之反應特異性可允許啟始血小板凝集而不影響細胞形態的S1P模擬。

S1P以神經鞘胺醇之代謝物形式在神經鞘胺醇與神經鞘胺醇激酶之反應中形成且大量儲存於存在高含量神經鞘胺醇激酶且不存在神經鞘胺醇解離酶之血小板凝集物中。S1P在血小板凝集期間釋放，積聚於血清中且亦存在於惡性腹水中。S1P生物降解最可能經由胞外磷酸水解酶(尤其神經鞘胺醇1-磷酸酯磷酸水解酶)水解而進行。因此需要對S1P具特異性以供藉由阻斷其與受體相互作用或穩定S1P且提高其生物效應來調節其生物功能之抗體，用於預防或治療自體免疫疾病、發炎性疾病及癌症。

由於PGE₂在多種人類病症中之作用，已設計出治療策略來抑制或抵抗PGE₂活性。詳言之，尚未報導適於傳遞至人類之結合及中和PGE₂的治療抗體。此項技術中對能夠結合及中和PGE₂的改良抗體存在需要。

【發明內容】

本發明係關於對諸如前列腺素E₂(PGE₂)之脂質代謝物具特異性之結合蛋白。本發明之PGE₂結合蛋白包括(但不限於)能夠結合PGE₂之抗體、抗原結合片段及具有各種骨架之抗原結合片段。

本發明之一態樣係關於能夠結合PGE₂之結合蛋白。在一實施例中，本發明之結合蛋白具有中和、穩定、拮抗及/或促效活性。在另一實施例中，結合蛋白能夠調節PGE₂之生物功能。舉例而言，結合蛋白能夠至少部分中和PGE₂。

在本發明之一態樣中，結合蛋白能夠結合PGE₂且防止PGE₂與一或多個PGE₂受體(例如EP1、EP2、EP3及EP4)結合。在本發明之一實施例中，結合蛋白能夠結合PGE₂且防止PGE₂與EP1、EP2、EP3及EP4受體結合。

本發明提供PGE₂結合蛋白之製備、表徵方法及使用PGE₂結合蛋白作為單獨療法或與其他治療劑一起作為組合療法之方法；及預防及/或治療由PGE₂介導之疾病的方法，例如自體免疫及發炎性疾病，諸如類風濕性關節炎、克隆氏病(Crohn's disease)、骨關節炎、AMD、淋巴腺病、溶血性貧血、紫癍、關節黏連性脊椎炎、多發性硬化症、糖尿病、癌症、疼痛、骨質流失/復原、動脈粥樣硬

化疾病、生殖病症及其他疾病。本發明之結合蛋白亦可用於診斷該等疾病。

在本發明之一實施例中，結合蛋白為結合PGE₂之經分離抗體或其抗原結合片段。可在基於經生物素標記之PGE₂ ELISA之檢定中以選自由以下組成之群的EC₅₀證明該結合：約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} M。在另一實施例中，在基於經³H標記之PGE₂的放射免疫檢定中以選自由以下組成之群的K_D證明結合蛋白與PGE₂之結合：約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} 。在另一實施例中，在經PGE₂受體EP4介導之PGE₂誘發鈣流入受結合蛋白與PGE₂結合抑制的FLIPR中以選自由以下組成之群的IC₅₀證明結合蛋白與PGE₂之結合：約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} 。

在一實施例中，在基於FACS之受體結合檢定中抗體以以下IC₅₀抑制經生物素標記之PGE₂與細胞表面上EP1、EP2、EP3及/或EP4受體之結合，或在基於ELISA之受體結合檢定中抗體以以下IC₅₀抑制經生物素標記之PGE₂與使用受體表現細胞製備之膜製劑上EP1、EP2、EP3及/或EP4受體的結合：約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M。

M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} ，或在基於 ^3H PGE₂之放射免疫檢定中抗體以以下IC₅₀抑制 ^3H -PGE₂與細胞表面或膜製劑上EP1、EP2、EP3及/或EP4受體之結合：約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} ，及/或在EP4介導之FLIPR檢定中抗體以以下IC₅₀抑制PGE₂誘發之鈣通量：約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} M。在一實施例中，抗體或其抗原結合片段結合PGE₂且在基於細胞表面之受體結合檢定或在基於放射免疫檢定之受體結合檢定中在100 nM之濃度下抑制PGE₂與其至少一種受體的結合達約70-100%。

在一實施例中，抗體為19C9、4F10、15F10、K1B、K7H、K3A、L11、L21、2B5-7.0、2B5-8.0或2B5-9.0或其變異體。在一實施例中，變異體為人類化變異體，諸如Hu2B5.P1或Hu2B5.P2。

在另一態樣中，本發明提供經分離抗體或其抗原結合片段，其結合PGE₂且在角叉菜膠誘發之齧齒動物爪水腫模型中抑制爪水腫達約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一特定實施例中，在角叉菜膠誘發之齧齒動物爪水腫模型中抗體抑制爪水腫超過約10%。

在另一態樣中，本發明提供經分離抗體或其抗原結合片段，其結合PGE₂且在齧齒動物之膠原蛋白誘發之關節炎模型中抑制爪腫脹或平均關節炎計分達約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一特定實施例中，在齧齒動物之膠原蛋白誘發之關節炎模型中抗體抑制爪腫脹或平均關節炎計分超過10%。

在另一態樣中，本發明提供經分離抗體或其抗原結合片段，其結合PGE₂且在角叉菜膠誘發之齧齒動物爪水腫模型中抑制爪水腫達約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一特定實施例中，在角叉菜膠誘發之齧齒動物爪水腫模型中抗體抑制爪水腫超過約10%。

在另一態樣中，本發明提供經分離抗體或其抗原結合片段，其結合PGE₂且在齧齒動物之膠原蛋白誘發之關節炎模型中抑制爪腫脹或平均關節炎計分達約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一特定實施例中，在齧齒動物之膠原蛋白誘發之關節炎模型中抗體抑制爪腫脹或平均關節炎計分超過10%。

在另一實施例中，如放射免疫檢定所量測，本發明之結合蛋白具有至多約 10^{-3}s^{-1} ；至多約 10^{-4}s^{-1} ；至多約 10^{-5}s^{-1} ；或至多約 10^{-6}s^{-1} 之與PGE₂之解離速率常數(k_{off})。較佳地，如放射免疫檢定所量測，本發明之結合蛋白具有約 10^{-3}s^{-1} 至約 10^{-4}s^{-1} ；約 10^{-4}s^{-1} 至約 10^{-5}s^{-1} ；或約 10^{-5}s^{-1} 至約 10^{-6}s^{-1} 的與PGE₂之解離速率常數(k_{off})。

在另一實施例中，藉由放射免疫檢定所測定，本發明之結合蛋白具有至多約 10^{-6} M；至多約 10^{-7} M；至多約 10^{-8} M；至多約 10^{-9} M；至多約 10^{-10} M；至多約 10^{-11} M；至多約 10^{-12} M；或至多 10^{-13} M的與PGE₂之解離常數(K_D)。較佳地，本發明之結合蛋白具有約 10^{-7} M至約 10^{-8} M；約 10^{-8} M至約 10^{-9} M；約 10^{-9} M至約 10^{-10} M；約 10^{-10} 至約 10^{-11} M；約 10^{-11} M至約 10^{-12} M；或約 10^{-12} M至約 10^{-13} M的與PGE₂之解離常數(K_D)。本發明之一態樣提供至少一種針對至少一種本發明之PGE₂結合蛋白的PGE₂抗個體基因型抗體。抗個體基因型抗體包括含有以下分子之任何蛋白質或肽，該分子包含免疫球蛋白分子之至少一部分，諸如(但不限於)重鏈或輕鏈之至少一個互補決定區(CDR)或其配位體結合部分、重鏈或輕鏈可變區、重鏈或輕鏈恆定區、構架區或其可併入本發明之結合蛋白中的任何部分。

在另一態樣中，本發明提供經分離抗體或其抗原結合片段，其結合前列腺素E₂且在基於細胞表面之受體結合檢定中以選自由以下組成之群的IC₅₀抑制前列腺素E₂與E₁、E₂、E₃及E₄受體中之至少一者的結合：約 1×10^{-6} 至 1×10^{-7} M、 1×10^{-7} 至 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} 至 1×10^{-9} M、 10^{-9} 至 10^{-10} M、 1×10^{-10} 至 1×10^{-11} M及 10^{-11} 至 10^{-12} M，或在基於ELISA之受體結合檢定中以選自由以下組成之群的IC₅₀抑制前列腺素E₂與E₁、E₂、E₃及E₄受體中之至少一者的結合：約 1×10^{-6} 至 1×10^{-7} M、 1×10^{-7} 至 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} 至 1×10^{-9} M、 10^{-9} 至 10^{-10} M、 1×10^{-10} 至 1×10^{-11} M及 10^{-11} 至 10^{-12} M。

在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段結合前列腺素E₂且在基於細胞表面之受體結合檢定或使用表現E1、E2、E3及E4受體中之至少一者的細胞或細胞膜製劑的基於³H-PGE₂之放射免疫檢定中在約100 nM之濃度下抑制前列腺素E₂與E1、E2、E3及E4受體中至少一者的結合達約70-100%。在一實施例中，抗體係選自由19C9、4F10、15F10、K1B、K7H、K3A、L11、L21、2B5-7.0、2B5-8.0及2B5-9.0組成之群。在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段能夠調節前列腺素E₂之生物功能，諸如中和前列腺素E₂。抗體或其抗原結合片段係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、雙硫鍵連接之Fv、scFv、單域抗體、雙功能抗體、多特異性抗體、雙重特異性抗體及雙特異性抗體。在一實施例中，抗體或其抗原結合片段為人類化抗體。在另一實施例中，抗體係選自由Hu2B5.P1及Hu2B5.P2組成之群。本發明亦提供包含抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在一實施例中，醫藥組合物進一步包含至少一種用於治療前列腺素E₂活性有害之病症的其他治療劑。

在另一態樣中，本發明提供產生結合前列腺素E₂之抗體或其片段之方法，該方法包含以下步驟：以前列腺素E₂-甲狀腺球蛋白免疫非人類動物，收集包含抗前列腺素E₂抗體之體液或器官，及分離該抗前列腺素E₂抗體。

在另一態樣中，本發明提供包含能夠結合前列腺素E₂之

抗原結合域之人類化抗體，該抗原結合域包含至少一個包含選自由SEQ ID NO: 54-59組成之群之胺基酸序列的CDR區。在另一實施例中，本發明提供包含抗原結合域之人類化抗體，該抗原結合域包含至少一個包含與選自由SEQ ID NO: 54-59組成之群之胺基酸序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或至少約98%同源之胺基酸序列的CDR區。在一實施例中，人類化抗體包含選自由SEQ ID NO: 78、79、80及81組成之群的胺基酸序列。

在一態樣中，本發明結合蛋白能夠結合PGE₂，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的CDR：CDR-H1：GYTFTKYWLG(SEQ ID NO: 54)、CDR-H2：DIYPGYDYTHYNEKFKD(SEQ ID NO: 55)、CDR-H3：SDGSSTY(SEQ ID NO: 56)、CDR-L1：TSSQNIVHSNGNTYLE(SEQ ID NO: 57)、CDR-L2：KVSNRFSG(SEQ ID NO: 58)、CDR-L3：FQVSHVPYT(SEQ ID NO: 59)。

在另一實施例中，本發明提供包含抗原結合域之結合蛋白或其片段，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的CDR：SEQ ID NO: 6、7、8、10、11、12、14、15、16、18、19、20、22、23、26、27、28、30、31、32、34、35、37、38及39。在另一實施例中，結合蛋白或其片段包含抗原結合域，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的

VH區：SEQ ID NO: 5、13、21、25、33、40、42及44。

在另一實施例中，結合蛋白或其片段包含抗原結合域，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VL區：SEQ ID NO: 9、17、24、29、36、41、43及45。在另一實施例中，結合蛋白或其片段包含抗原結合域，該抗原結合域包含至少一個包含選自由SEQ ID NO: 54-59組成之群之胺基酸序列的CDR區。

在一實施例中，結合蛋白包含至少3個例如選自以下VH CDR組之CDR，該VH CDR組選自由SEQ ID NO: 6、7及8；SEQ ID NO: 14、15及16；SEQ ID NO: 14、22及23，SEQ ID NO: 26、27及28，及32；SEQ ID NO: 26、34及35；及SEQ ID NO: 54、55及56組成之群。在另一實施例中，至少3個CDR係選自以下VL CDR組，該VL CDR組係選自由SEQ ID NO: 10、11及12；SEQ ID NO: 17、18及19；SEQ ID NO: 30、31及32；SEQ ID NO: 37、38及39；SEQ ID NO: 42、43及44；及SEQ ID NO: 57、58及59組成之群。在另一實施例中，至少3個CDR包含具有SEQ ID NO: 54、55及56之胺基酸序列的VH CDR組及/或具有SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列的VL CDR組。

在另一實施例中，結合蛋白包含至少兩個例如選自由以下組成之群的可變域CDR組：SEQ ID NO: 6、7、8及SEQ ID NO: 10、11、12；SEQ ID NO: 14、15、16及SEQ ID NO: 18、19、20；SEQ ID NO: 14、22、23及SEQ ID NO: 10、11、12；SEQ ID NO: 26、27、28及SEQ ID NO: 30、

31、32；及SEQ ID NO: 26、34、35及SEQ ID NO: 37、38、39。

在另一實施例中，本發明之結合蛋白包含兩個可變域，該兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:9；SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:17；SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:24；SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:29；SEQ ID NO:33及SEQ ID NO:36；SEQ ID NO:40及SEQ ID NO:41；SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43；及SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45。在另一實施例中，兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:60及SEQ ID NO:61；SEQ ID NO:62及SEQ ID NO:63；SEQ ID NO:64及SEQ ID NO:65；SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67；SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69；SEQ ID NO:70及SEQ ID NO:71；SEQ ID NO:72及SEQ ID NO:73；SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75；及SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77。在另一實施例中，兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79；及SEQ ID NO:80及SEQ ID NO:81。

在另一態樣中，本發明提供結合前列腺素E₂之人類化抗體或其片段，該人類化抗體包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VH區：SEQ ID NO: 60、62、64、66、68、70、72、74、76、78及80。在另一實施例中，人類化抗體或其片段包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VL區：SEQ ID NO: 61、63、65、

67、69、71、73、75、77、79及81。在另一實施例中，至少一個VH區或至少一個VL區包含含有至少一個胺基酸取代之人類受體構架序列，其中該構架序列之胺基酸序列與該人類受體構架序列之序列至少65%一致。舉例而言，人類受體構架在關鍵殘基處可包含至少一個構架胺基酸取代，該關鍵殘基係選自由以下組成之群：與CDR相鄰之殘基、糖基化位點殘基、稀有殘基、能夠與前列腺素E₂相互作用之殘基、能夠與CDR相互作用之殘基、典型殘基、重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基、Vernier區內之殘基，及在Chothia界定之可變重鏈CDR1與Kabat界定之第一重鏈構架之間重疊之區域中的殘基。

在另一實施例中，結合蛋白進一步包含人類受體構架。

在本發明之一實施例中，人類重鏈及輕鏈受體序列係選自表7及表8(實例4.2.1)中所述之序列。其他人類重鏈及輕鏈受體序列為此項技術中所熟知且適用於本發明。在一實施例中，結合蛋白為能夠結合PGE₂之CDR移植抗體或其抗原結合部分。在另一實施例中，結合蛋白為能夠結合PGE₂之人類抗體或其抗原結合部分。在一實施例中，CDR移植抗體或人類化抗體或其抗原結合部分包含一或多個本文揭示之CDR，例如三個或三個以上，四個或四個以上，五個或五個以上，或六個或六個以上CDR。在另一實施例中，CDR移植抗體或人類化抗體或其抗原結合部分包含人類受體構架。該人類受體構架可為人類免疫球蛋白之任何受體構架。在一特定實施例中，人類受體構架為本文

揭示之任一人類受體構架。在一實施例中，CDR係併入至人類受體構架之人類抗體可變域中。在一實施例中，人類抗體可變域為共同人類可變域。在另一實施例中，人類受體構架在關鍵殘基處包含至少一個構架區胺基酸取代，其中該關鍵殘基係選自由以下組成之群：與CDR相鄰之殘基；糖基化位點殘基；稀有殘基；能夠與PGE₂相互作用之殘基；能夠與CDR相互作用之殘基；典型殘基；重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基；Vernier區內之殘基；及在Chothia界定之可變重鏈CDR1與Kabat界定之第一重鏈構架之間重疊之區域中的殘基。在一實施例中，人類受體構架包含至少一個構架區胺基酸取代，其中該構架之胺基酸序列與該人類受體構架之序列至少65%一致且包含至少70個與該人類受體構架一致之胺基酸殘基。在一實施例中，關鍵殘基處之構架區胺基酸取代係選自由以下組成之群：在重鏈可變區中位置48之M(人類)取代為I(小鼠)，位置68之V(人類)取代為A(小鼠)，位置70之M(人類)取代為L(小鼠)，及位置72之T(人類)取代為V(小鼠)；及在輕鏈可變區中位置2之I(人類)取代為V(小鼠)及位置3之V(人類)取代為L(小鼠)。

在另一態樣中，本發明提供包含結合蛋白及連接多肽及/或免疫球蛋白恆定域中之任一者的抗體構築體。在一實施例中，抗體構築體係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、雙硫鍵連接之Fv、scFv、單域抗

體、雙功能抗體、多特異性抗體、雙重特異性抗體及雙特異性抗體。在一實施例中，抗體構築體包含選自由以下組成之群的重鏈免疫球蛋白恆定域：人類IgM恆定域、人類IgG1恆定域、人類IgG2恆定域、人類IgG3恆定域、人類IgG4恆定域，人類IgE恆定域及人類IgA恆定域。在一實施例中，抗體構築體包含具有選自由以下組成之群之胺基酸序列的免疫球蛋白恆定域：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:2；SEQ ID NO:3；SEQ ID NO:4；及SEQ ID NO:5。

在另一實施例中，本發明提供抗PGE2抗體結合物，該結合物包含抗PGE2抗體構築體及選自由免疫黏附分子、顯影劑、治療劑及細胞毒性劑組成之群的藥劑。在一實施例中，該藥劑為選自由放射性標記、酶、螢光標記、發光標記、生物發光標記、磁性標記及生物素組成之群的顯影劑。在另一實施例中，顯影劑例如為選自由 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 及 ^{153}Sm 組成之群的放射性標記。在另一實施例中，藥劑為選自由抗代謝物、烷基化劑、抗生素、生長因子、細胞激素、抗血管生成劑、抗有絲分裂劑、蔥環黴素(anthracycline)、毒素及細胞凋亡劑組成之群的治疗劑或細胞毒性劑。

在另一實施例中，結合蛋白經糖基化。在一特定實施例中，PGE2結合蛋白具有人類糖基化模式。

在另一實施例中，使PGE2結合蛋白、抗體構築體或抗體結合物結晶化(例如以晶體形式存在)。在一實施例中，晶體為無載劑醫藥控制釋放晶體。在另一實施例中，結晶

化結合蛋白、結晶化抗體構築體或結晶化抗體結合物具有比其可溶性對應物大的活體內半衰期。在另一實施例中，結晶化結合蛋白、結晶化抗體構築體或結晶化抗體結合物在結晶化後保留其生物活性。

本發明之一態樣係關於包含能夠結合PGE2之結合蛋白的DVD結合蛋白。較佳地，DVD結合蛋白能夠結合兩個PGE2結合位點或結合PGE2及第二目標。第二目標係選自由以下組成之群：CSF1(MCSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、FGF2、IFN α 1、IFN β 1、IFN γ 、組織胺及組織胺受體、IL-1 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 α 、IL-12 β 、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、KITLG、PDGFB、IL-2R β 、IL-4R、IL-5R α 、IL-8R α 、IL-8R β 、IL-12R β 1、IL-12R β 2、IL-13R α 1、IL-13R α 2、IL-18R1、TSLP、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL22、CCL24、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、XCL1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CX3CR1、GPR2、XCR1、FOS、GATA3、JAK1、JAK3、STAT6、TBX21、TGFB1、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBR及殼質酶。在一實施例中，DVD結合蛋白能夠識別PGE2及IL-1 β ；PGE2及IL-9；PGE2及IL-4；PGE2及IL-5；PGE2及IL-25；PGE2及TARC；PGE2及MDC；PGE2及MIF；PGE2

及 TGF- β ; PGE2 及 LHR 促效劑 ; PGE2 及 CL25 ; PGE2 及 SPRR2a ; PGE2 及 SPRR2b ; 或 PGE2 及 ADAM8 。 在一實施例中 , DVD 結合蛋白能夠結合 PGE2 及 TNF α 。

在另一態樣中 , 本發明提供編碼 PGE2 結合蛋白、抗體構築體或抗體結合物之經分離核酸。另一實施例提供包含本發明之經分離核酸之載體 , 其中該載體係選自由以下組成之群 : pcDNA ; pTT(Durocher 等人 , *Nucleic Acids Research* 2002 , 第 30 卷 , 第 2 期) ; pTT3(具有額外多選殖位點之 pTT) ; pEFBOS(Mizushima, S. 及 Nagata, S., (1990) *Nucleic Acids Research* 第 18 卷 , 第 17 期) ; pBV ; pJV ; pA2 ; 及 pBJ 。

在另一態樣中 , 本發明提供經本發明之載體轉型之宿主細胞。在一實施例中 , 宿主細胞為原核細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*))。在另一實施例中 , 宿主細胞為真核細胞 , 例如原生生物細胞、動物細胞、禽類細胞、植物細胞、真菌細胞(例如酵母細胞 , 諸如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、哺乳動物細胞(例如 CHO、COS 及 HEK293)、昆蟲細胞(例如 Sf9)。

在另一態樣中 , 本發明提供產生結合 PGE2 之蛋白質的方法 , 其包含在足以產生結合 PGE2 之結合蛋白的條件下在培養基中培養本發明之任一宿主細胞。另一實施例提供根據本發明之方法產生的結合蛋白。

在另一態樣中 , 本發明提供包含結晶化 PGE2 結合蛋白、結晶化抗體構築體或結晶化抗體結合物、成分及/或

至少一種聚合載劑之調配物。在一實施例中，聚合載劑為選自由以下組成之群的聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酐)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)、聚(乙二醇)、聚((羥丙基)甲基丙烯酸鹽胺)、聚[(有機)磷氮烯]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、氧化異丙烯多元醇類、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡糖、甘胺基聚糖、硫酸多糖及其摻合物及/或共聚物。在另一實施例中，該成分係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。

在另一態樣中，本發明提供治療個體之方法，其包含向該個體投與有效量之PGE2結合蛋白、抗體構築體、結合物或組合物之步驟。在一實施例中，個體為哺乳動物，諸如罹患發炎性疾病或本文所述之其他病症之人類。在一實施例中，本發明提供減輕、改善或預防該疾病或病症之一或多種症狀的方法，諸如下列疾病或病症之症狀：(a)類風濕性關節炎、過敏性關節炎、青少年型關節炎、關節黏連性脊椎炎及骨關節炎；(b)由病毒誘發之某些疾病，諸如格-巴二氏症候群(Guillain Barre syndrome)、感染性單核白血球增多症、其他病毒性淋巴腺病及疱疹病毒感染；(c)多發性硬化症及其他脫髓鞘疾病；(d)血液病，諸如溶血性

貧血及血小板減少症；(e)內分泌病症，諸如糖尿病、艾迪森氏病(Addison's disease)、特發性副甲狀腺低能症及慢性淋巴細胞性甲狀腺炎；(f)膠原蛋白病變，諸如全身性紅斑狼瘡症；及(g)生殖病症，諸如閉經、不孕症、反覆性流產及驚厥；及(h)腫瘤，諸如頭頸部腫瘤、肺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌等；及(i)發炎性腸病，包括克隆氏病及潰瘍性結腸炎；及(j)與骨關節炎及其他病症有關之疼痛；及(k)眼病，諸如年齡相關之黃斑變性(AMD)。

在另一態樣中，本發明提供包含PGE₂結合蛋白、抗體、構築體、結合物或組合物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在一實施例中，醫藥學上可接受之載劑充當適用於增加結合蛋白之吸收或分散之佐劑。在一實施例中，佐劑為玻尿酸酶。醫藥組合物可進一步包含至少一種用於診斷或治療PGE₂活性有害之病症的額外藥劑，例如選自由以下組成之群的藥劑：治療劑；顯影劑；細胞毒性劑；血管生成抑制劑(例如抗VEGF抗體或VEGF-trap)；激酶抑制劑(例如KDR或TIE-2抑制劑)；共刺激分子阻斷劑(例如抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig或抗CD20)；黏附分子阻斷劑(例如抗LFA-1、抗E/L選擇素(selectin)或小分子抑制劑)；抗細胞激素抗體或其功能片段(例如抗IL-18、抗TNF或抗IL-6/細胞激素受體抗體)；甲胺喋呤；環孢黴素(cyclosporine)；雷帕黴素(rapamycin)；FK506；可偵測標記或報導體；TNF拮抗劑；抗風濕藥；肌肉鬆弛劑；麻醉藥；非類固醇消炎藥(NSAID)；止痛劑；麻醉劑；鎮靜

劑；局部麻醉劑；神經肌肉阻斷劑；抗微生物劑；抗牛皮癬藥；皮質類固醇；同化類固醇；紅血球生成素；免疫作用；免疫球蛋白；免疫抑制劑；生長激素；激素替代藥物；放射性藥品；抗抑鬱劑；抗精神病藥物；興奮劑；哮喘藥物； β 促效劑；吸入類固醇；口服類固醇；腎上腺素或其類似物；細胞激素；及細胞激素拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供抑制及/或降低PGE₂活性之方法，其包含使PGE₂與PGE₂結合蛋白接觸以使得PGE₂活性被抑制及/或降低。在一實施例中，本發明提供在罹患PGE₂活性有害之病症的個體中抑制及/或降低PGE₂活性之方法，其包含向該個體投與結合蛋白以使得個體中之PGE₂活性被抑制及/或降低。在另一實施例中，該方法包含向個體投與本發明之PGE₂結合蛋白以使得實現治療。

在另一態樣中，本發明提供在個體中治療(例如治癒、抑制、改善、延遲或預防發作或預防重現或復發)或預防PGE₂相關病症之方法。該方法包括：以足以治療或預防PGE₂相關病症之量向個體投與PGE₂結合蛋白(尤其拮抗劑)，例如抗PGE₂抗體或其片段。PGE₂拮抗劑(例如抗PGE₂抗體或其片段)可單獨或與其他治療方式組合向個體投與。

在一實施例中，個體為哺乳動物，例如罹患一或多種PGE₂相關病症(例如特徵為過量PGE₂含量或生物合成)之人類。在一實施例中，本發明提供治療個體之發炎性病症及免疫病症之方法，該等病症特徵為過量PGE₂生物合成，

該等方法包含向該個體投與有效量之對PGE₂具特異性的抗體。可藉由本發明方法治療之病症包括涉及過量PGE₂合成的自體免疫及發炎性疾病及腫瘤。該等病症包括：(a)類風濕性關節炎、過敏性關節炎、青少年型關節炎、關節黏連性脊椎炎及骨關節炎；(b)由病毒誘發之某些疾病，諸如格-巴二氏症候群、感染性單核白血球增多症、其他病毒性淋巴腺病及疱疹病毒感染；(c)多發性硬化症及其他脫髓鞘疾病；(d)血液病，諸如溶血性貧血及血小板減少症；(e)內分泌病症，諸如糖尿病、艾迪森氏病、特發性副甲狀腺低能症及慢性淋巴細胞性甲狀腺炎；(f)膠原蛋白病變，諸如全身性紅斑狼瘡症；及(g)生殖病症，諸如閉經、不孕症、反覆性流產及驚厥；及(h)腫瘤，諸如頭頸部腫瘤、肺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌等；及(i)發炎性腸病，包括克隆氏病及潰瘍性結腸炎；及(j)與骨關節炎及其他病症有關之疼痛；及(k)眼病，諸如年齡相關之黃斑變性(AMD)。

在另一態樣中，本申請案提供偵測活體外樣本(例如生物學樣本，諸如血清、血漿、組織、活組織檢查)中PGE₂之存在的方法。標的方法可用於診斷例如免疫細胞相關病症之病症。該方法包括：(i)使樣本或對照樣本與如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段接觸；及(ii)偵測抗PGE₂抗體或其片段與樣本或對照樣本之間複合物的形成，其中樣本相對於對照樣本之複合物形成之統計學上顯著的變化指示樣本中存在PGE₂。

在另一態樣中，本申請案提供偵測活體內PGE₂存在之

方法(例如在個體中活體內成像)。標的方法可用於診斷例如PGE2相關病症之病症。該方法包括：(i)在允許抗體或片段與PGE2結合之條件下向個體或對照個體投與如本文所述之抗PGE2抗體或其片段；及(ii)偵測抗體或片段與PGE2之間複合物的形成，其中個體相對於對照個體之複合物形成之統計學上顯著的變化指示存在PGE2。

在另一態樣中，本發明之結合蛋白適用於治療選自由以下組成之群的病症：關節炎、骨關節炎、青少年慢性關節炎、膿毒性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑狼瘡症、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、發炎性腸病、胰島素依賴性糖尿病、甲狀腺炎、哮喘、過敏性疾病、牛皮癬、皮膚炎性硬皮病、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反應、與器官移植有關之急性或慢性免疫疾病、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、散播性血管內凝血、川崎氏病(Kawasaki's disease)、格雷夫氏病(Grave's disease)、腎病症候群、慢性疲勞症候群、華格納氏肉芽病(Wegener's granulomatosis)、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schoenlein purpura)、腎臟之微觀脈管炎、慢性活動型肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、中毒性休克症候群、膿毒病症候群、惡病質、感染性疾病、寄生蟲病、後天免疫缺乏症候群、急性橫貫性脊髓炎、亨廷頓氏舞蹈病(Huntington's chorea)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、中風、原發性膽汁性肝硬化、溶血

性貧血、惡性疾病、心臟衰竭、心肌梗塞、艾迪森氏病、偶發性I型多腺低減及II型多腺低減、史密特氏症候群 (Schmidt's syndrome)、成人(急性)呼吸窘迫症候群、禿頭症、斑禿、血清陰性關節病、關節病、萊特爾氏病 (Reiter's disease)、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸炎性關節病、腸病性滑膜炎、披衣菌、耶氏桿菌(yersinia)及沙門氏菌(salmonella)相關之關節病、脊椎關節病、動脈粥樣化病/動脈硬化症、特異體質過敏症、自體免疫性水皰病、尋常天疱瘡、落葉狀天疱瘡、類天疱瘡、線狀IgA病、自體免疫性溶血性貧血、庫氏試驗陽性溶血性貧血(Coombs positive haemolytic anaemia)、後天惡性貧血、青少年惡性貧血、肌痛性腦炎/皇家自由病(Royal Free Disease)、慢性皮膚黏膜念珠菌病、巨細胞動脈炎、原發性硬化性肝炎、隱源性自體免疫性肝炎、後天免疫缺乏疾病症候群、後天免疫缺乏相關疾病、B型肝炎、C型肝炎、普通易變型免疫缺乏(普通易變型低丙球蛋白血症)、擴張性心肌病、女子不孕症、卵巢功能衰竭、卵巢早衰、纖維化肺病、隱源性致纖維性肺泡炎、發炎後間質性肺病、間質性肺炎、結締組織病相關之間質性肺病、混合結締組織病相關之肺病、全身性硬化症相關之間質性肺病、類風濕性關節炎相關之間質性肺病、全身性紅斑狼瘡症相關之肺病、皮肌炎/多肌炎相關之肺病、休格連氏病相關之肺病(Sjögren's disease associated lung disease)、關節黏連性脊椎炎相關之肺病、脈管炎性彌漫性肺病、血黃素沈積症相關之肺

病、藥物誘發之間質性肺病、纖維化、放射性纖維化、閉塞性細支氣管炎、慢性嗜伊紅血球性肺炎、淋巴細胞浸潤性肺病、感染後間質性肺病、痛風性關節炎、自體免疫性肝炎、1型自體免疫性肝炎(經典自體免疫或類狼瘡性肝炎)、2型自體免疫性肝炎(抗LKM抗體肝炎)、自體免疫介導之低血糖症、B型胰島素抗性伴發黑色棘皮病、副甲狀腺低能症、與器官移植有關之急性免疫疾病、與器官移植有關之慢性免疫疾病、非炎性骨關節病、原發性硬化性膽管炎、1型牛皮癬、2型牛皮癬、特發性白血球減少病、自體免疫性嗜中性球減少症、腎病NOS、腎小球腎炎、腎臟之微觀脈管炎、萊姆病(lyme disease)、盤狀紅斑狼瘡、特發性男性不孕症或NOS、精子自體免疫、多發性硬化症(所有次型)、交感性眼炎、結締組織病繼發之肺性高血壓、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、結節性多動脈炎之肺部表現、急性風濕熱、類風濕性脊椎炎、斯蒂爾病(Still's disease)、全身性硬化症、休格連氏症候群、高安氏病(Takayasu's disease)/動脈炎、自體免疫性血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進症、甲狀腺腫性自體免疫性甲狀腺低能症(橋本氏病(Hashimoto's disease))、萎縮性自體免疫性甲狀腺低能症、原發性黏液水腫、晶狀體源性葡萄膜炎、原發性脈管炎、白斑病急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精誘發之肝損傷、膽汁淤積、特質性肝病、藥物誘發之肝炎、非酒精性脂肪變性肝炎、過敏症及哮喘、B族

鏈球菌 (GBS) 感染、精神障礙 (例如抑鬱症及精神分裂症)、Th2 型及 Th1 型介導之疾病、急性及慢性疼痛 (不同形式之疼痛)、及諸如肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌及直腸癌之癌症及造血系統惡性疾病 (白血病及淋巴瘤)、無 β 脂蛋白血症、手足發紺、急性及慢性寄生或感染過程、急性白血病、急性淋巴母細胞白血病 (ALL)、急性骨髓白血病 (AML)、急性或慢性細菌感染、急性胰腺炎、急性腎衰竭、腺癌、心房異位搏動、AIDS 癡呆複合症、酒精誘發之肝炎、過敏性結膜炎、過敏性接觸性皮膚炎、過敏性鼻炎、同種異體移植排斥反應、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、肌肉萎縮性側索硬化、貧血、心絞痛、前角細胞退化、抗 cd3 療法、抗磷脂症候群、抗受體過敏反應、主動脈及周圍動脈瘤、主動脈剝離、動脈性高血壓、動脈硬化症、動靜脈瘤、共濟失調、心房微顫 (持續性或陣發性)、心房撲動、房室傳導阻滯、B 細胞淋巴瘤、骨移植物排斥反應、骨髓移植 (BMT) 排斥反應、束枝傳導阻滯、伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、燒傷、心律不整、心臟頓抑症候群、心臟腫瘤、心肌病、心肺分流發炎反應、軟骨移植排斥反應、小腦皮質退化、小腦病症、紊亂性或多源性房性心動過速、與化學療法有關之病症、慢性髓細胞白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性發炎性病變、慢性淋巴細胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性水楊酸中毒、結腸直腸癌、充血性心臟衰竭、結膜炎、接觸性皮膚炎、肺原

性心臟病、冠狀動脈疾病、庫賈氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、培養物陰性敗血症、囊腫性纖維化、細胞激素療法相關之病症、拳擊員癡呆、脫髓鞘疾病、登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever)、皮膚炎、皮膚病病狀、糖尿病 (diabete、糖尿病 (diabetes mellitus)、糖尿病性動脈硬化病、泛發性路易體疾病 (Diffuse Lewy body disease)、擴張型充血性心肌病、基底神經節病症、中年唐氏症候群 (Down's Syndrome in middle age)、由阻斷CNS多巴胺受體之藥物誘發的藥物誘發之運動障礙、藥物敏感、濕疹、腦脊髓炎、心內膜炎、內分泌病、會厭炎、EB病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)、肢端紅痛症、錐體外及小腦病症、家族性噬血性淋巴組織細胞增殖症、胚胎胸腺移植排斥反應、弗立特里希氏共濟失調 (Friedreich's ataxia)、功能性周圍動脈病症、真菌性敗血症、氣性壞疽、胃潰瘍、腎小球腎炎、任何器官或組織的移植物排斥反應、革蘭氏陰性敗血症、革蘭氏陽性敗血症、胞內生物體引起之肉芽腫、毛細胞白血病、哈勒沃登-施帕茨病 (Hallerrorden-Spatz disease)、喬本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、花粉熱、心臟移植排斥反應、血色素沈著症、血液透析、溶血性尿毒癥候群/溶栓性血小板減少性紫癍、出血、肝炎 (A)、希氏束心律不整 (His bundle arrhythmias)、HIV感染/HIV神經病、霍奇金病 (Hodgkin's disease)、運動過度病症、過敏反應、過敏性肺炎、高血壓、運動功能減退病症、下丘腦-垂體-腎上腺軸評估、特

發性艾迪森氏病、特發性肺纖維化、抗體介導之細胞毒性、無力、嬰兒脊髓性肌萎縮症、主動脈發炎、a型流感、電離輻射曝露、虹膜睫狀體炎/葡萄膜炎/視神經炎、缺血再灌注損傷、缺血性中風、青少年類風濕性關節炎、青少年脊髓性肌萎縮症、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、腎臟移植排斥反應、退伍軍人桿菌(*legionella*)、利什曼體病(*leishmaniasis*)、麻風病、皮質脊髓系統病變、脂性水腫、肝移植排斥反應、淋巴水腫、瘧疾、惡性淋巴瘤、惡性組織球病、惡性黑素瘤、腦膜炎、腦膜炎球菌血症、代謝性/特發性偏頭痛、粒線體複合系統病症、混合結締組織病、單株球蛋白症、多發性骨髓瘤、多系統退化(Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager及Machado-Joseph)、重症肌無力、胞內鳥型分枝桿菌(*mycobacterium avium intracellulare*)、結核分枝桿菌(*mycobacterium tuberculosis*)、骨髓發育不良症候群、心肌梗塞、心肌缺血病症、鼻咽癌、新生兒慢性肺病、腎炎、腎病、神經退化性疾病、I型神經性肌肉萎縮、中性白血球減少性發熱、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma)、腹主動脈及其分支堵塞、阻塞性動脈病症、okt3療法、睪丸炎/副睪丸炎、睪丸炎/輸精管切除逆轉程序、內臟增大、骨質疏鬆症、胰腺移植排斥反應、胰腺癌、腫瘤相關症候群/惡性高血鈣症、副甲狀腺移植排斥反應、盆腔發炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、周圍動脈粥樣硬化疾病、周圍血管疾病、腹膜炎、惡性貧血、卡

氏肺囊蟲肺炎(pneumocystis carinii pneumonia)、肺炎、POEMS症候群(多發性神經病、內臟增大、內分泌病、單株球蛋白症及換膚症候群)、灌注後症候群、泵後症候群、MI心切開術後症候群、先兆驚厥、進行性核上性麻痺、原發性肺性高血壓、放射療法、雷諾現象(Raynaud's phenomenon)及疾病、雷諾病、雷夫蘇姆氏病(Refsum's disease)、規則狹窄QRS心動過速、腎血管性高血壓、再灌注損傷、限制型心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、路易體型老年癡呆(Senile Dementia of Lewy body type)、血清陰性關節病、休克、鐮形細胞性貧血、皮膚同種異體移植排斥反應、換膚症候群、小腸移植排斥反應、實體腫瘤、特異性心律不整、脊髓性共濟失調、脊髓小腦退化、鏈球菌肌炎、小腦結構病變、亞急性硬化泛腦炎、昏厥、心血管系統梅毒、全身性過敏、全身性發炎反應症候群、全身發作型青少年類風濕性關節炎、T細胞或FAB ALL、毛細管擴張、血栓閉塞性血管炎、血小板減少症、中毒、移植、外傷/出血、III型過敏反應、IV型過敏、不穩定型心絞痛、尿毒癥、尿膿毒病、蕁麻疹、心臟瓣膜病、靜脈曲張、脈管炎、靜脈疾病、靜脈栓塞、心室纖維性顫動、病毒及真菌感染、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎、病毒相關之噬血症候群、韋尼克-科爾薩科夫症候群(Wernicke-Korsakoff syndrome)、威爾遜氏病(Wilson's disease)、任何器官或組織的異種移植物排斥反應、急性冠狀動脈症候群、急性特發性多發性神經炎、急性發炎性脫髓鞘性多神

經根神經病、急性缺血、成人斯蒂爾病 (Adult Still's Disease)、斑禿、過敏症、抗磷脂抗體症候群、再生不全性貧血、動脈硬化症、特應性濕疹、異位性皮膚炎、自體免疫性皮膚炎、與鏈球菌感染有關之自體免疫病症、自體免疫性腸病、自體免疫性聽力損失、自身免疫性淋巴增生性症候群 (ALPS)、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢早衰、睪炎、支氣管擴張、大皰性類天疱瘡、心血管疾病、災難性抗磷脂症候群、乳糜瀉、頸椎關節黏連、慢性缺血、癍痕性類天疱瘡、具有多發性硬化症風險之臨床孤立症候群 (CIS)、結膜炎、兒童期初發型精神異常、慢性阻塞性肺病 (COPD)、淚囊炎、皮肌炎、糖尿病性視網膜病變、糖尿病、椎間盤突出症、盤脫垂、藥物誘發之免疫性溶血性貧血、心內膜炎、子宮內膜異位、眼內炎、上鞏膜炎、多形性紅斑、重症多形性紅斑、妊娠期類天疱瘡、格-巴二氏症候群 (GBS)、花粉熱、休斯症候群 (Hughes Syndrome)、特發性帕金森氏病、特發性間質性肺炎、IgE 介導之過敏症、免疫性溶血性貧血、包涵體肌炎、感染性眼部發炎疾病、發炎性脫髓鞘疾病、發炎性心臟病、發炎性腎病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、乾眼症、庫斯病 (Kussmaul disease) 或庫斯-麥爾病 (Kussmaul-Meier Disease)、蘭德里麻痺 (Landry's Paralysis)、朗格漢氏細胞組織球病 (Langerhan's Cell Histiocytosis)、網狀青斑、黃斑變性、顯微性多血管炎、白赫鐵列夫症 (Morbus Bechterev)、運動神經元病症、黏膜類天疱瘡、多器官衰

竭、重症肌無力、骨髓發育不良症候群、心肌炎、神經根病症、神經病、非A非B型肝炎、視神經炎、骨質溶解、少關節型青少年類風濕性關節炎(Pauciarticular JRA)、周圍動脈閉塞性疾病(PAOD)、周圍血管疾病(PVD)、周圍動脈疾病(PAD)、靜脈炎、結節性多動脈炎(或結節性動脈周圍炎)、多軟骨炎、風濕性多肌痛、白髮症、多關節型JRA、多發性內分泌缺乏症候群、多發性肌炎、風濕性多肌痛(PMR)、泵後症候群、原發性帕金森氏症、前列腺炎、純紅細胞發育不全、原發性腎上腺機能不全、復發性視神經脊髓炎、再狹窄、風濕性心臟病、SAPHO(滑膜炎、痤瘡、膿皰病、骨肥厚及骨炎)、硬皮病、繼發性澱粉樣變性病、休克肺、鞏膜炎、坐骨神經痛、繼發性腎上腺機能不全、聚矽氧相關之結締組織疾病、角層下膿皰性皮膚病(Sneddon-Wilkinson Dermatosi)s)、關節黏連性脊椎炎、史蒂文斯-強生症候群(Stevens-Johnson Syndrome, SJS)、全身性發炎反應症候群、顳動脈炎、弓形蟲性視網膜炎、中毒性表皮壞死溶解、橫貫性脊髓炎、TRAPS(腫瘤壞死因子受體)、I型過敏反應、II型糖尿病、蕁麻疹、尋常性間質肺炎(UIP)、脈管炎、春季結膜炎、病毒性視網膜炎、沃格特-小柳-原田症候群(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome)(VKH症候群)、濕式黃斑變性及傷口癒合。

在一實施例中，可以本發明之組合物及方法治療或診斷之疾病包括(但不限於)原發性及轉移性癌症，包括乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、口咽癌、下嚥癌、食道癌、胃

癌、胰腺癌、肝癌、膽囊癌及膽管癌、小腸癌、泌尿道癌(包括腎癌、膀胱癌及尿路上皮癌)、女性生殖道癌(包括子宮頸癌、子宮癌及卵巢癌以及絨膜癌及妊娠滋養層細胞疾病)、男性生殖道癌(包括前列腺癌、精囊癌、睪丸癌及生殖細胞腫瘤)、內分泌腺癌(包括甲狀腺癌、腎上腺癌及垂體腺癌)及皮膚癌，以及血管瘤、黑素瘤、肉瘤(包括骨骼及軟組織以及卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)引起之彼等瘤)、腦瘤、神經瘤、眼腫瘤及脊膜瘤(包括星形細胞瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、神經瘤、神經母細胞瘤、神經鞘瘤及腦膜瘤)、由諸如白血病之造血系統惡性疾病引起的實體腫瘤，及淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma))。

該方法包含以足以治療(例如減輕、改善)或預防一或多種症狀之量向個體投與PGE2拮抗劑，例如PGE2抗體或其片段。PGE2抗體可投與供治療或預防或兩者。PGE2拮抗劑(例如抗PGE2抗體或其片段)可如本文所述單獨或與其他治療方式組合向個體投與。較佳地，個體為哺乳動物，例如罹患本文所述之PGE2相關病症之人類。

在另一態樣中，本發明之結合蛋白適用於治療選自由以下組成之群的病症：急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓白血病、腎上腺皮質癌、肛門癌、闌尾癌、小腦星形細胞瘤、大腦星形細胞瘤、基底細胞癌、膽管癌、肝外癌、膀胱癌、骨癌、骨肉瘤/惡性纖維組織細胞瘤腦幹神經膠質

瘤、腦瘤、腦幹神經膠質瘤、大腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、幕上原始神經外胚層瘤、視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、乳癌、支氣管腺瘤/類癌、類癌瘤、類癌瘤、原發灶不明之胃腸道癌、中樞神經系統淋巴瘤、原發性小腦星形細胞瘤、子宮頸癌、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病慢性骨髓增生性病、結腸癌、結腸直腸癌、皮膚T細胞淋巴瘤、子宮內膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文(Ewing)家族腫瘤、顱外生殖細胞腫瘤、性腺外生殖細胞腫瘤、肝外膽管癌、眼癌、眼內黑素瘤視網膜母細胞瘤、膽囊癌、胃癌、胃腸道類癌瘤、胃腸道基質瘤(GIST)、顱外生殖細胞腫瘤、性腺外生殖細胞腫瘤、卵巢生殖細胞腫瘤、妊娠滋養層細胞腫瘤、神經膠質瘤、腦幹神經膠質瘤、大腦星形細胞瘤神經膠質瘤、兒童視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、毛細胞白血病、頭頸癌、肝細胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下嚥癌、眼內黑素瘤、胰島細胞癌(內分泌胰腺)、卡波西肉瘤、腎(腎細胞)癌、喉癌、急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、毛細胞白血病、唇及口腔癌、肝癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、AIDS相關性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenström Macroglobulinemia)、骨骼惡性纖維組織細胞瘤/骨肉瘤、神經管胚細胞瘤、黑素瘤、眼內(眼)黑素瘤、梅克爾細胞

癌 (Merkel Cell Carcinoma)、惡性間皮瘤、原發灶隱匿之轉移性鱗狀頸癌、口癌、多發性內分泌瘤症候群、多發性骨髓瘤/漿細胞贅瘤、蕈樣肉芽腫、骨髓發育不良症候群、骨髓發育不良/骨髓增生性疾病、骨髓性白血病、慢性骨髓白血病、多發性骨髓瘤、骨髓增生性病變、鼻腔及鼻竇癌、鼻咽癌、神經母細胞瘤、口部癌症 (Oral Cancer)、口腔癌 (Oral Cavity Cancer)、唇及口咽癌、骨肉瘤/骨骼惡性纖維組織細胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖細胞腫瘤、卵巢低度惡性潛在腫瘤、胰腺癌、胰島細胞胰腺癌、鼻竇及鼻腔癌、副甲狀腺癌、陰莖癌、咽癌、嗜鉻細胞瘤、松果體母細胞瘤及幕上原始神經外胚層瘤、垂體瘤、漿細胞贅瘤/多發性骨髓瘤、胸膜肺母細胞瘤、前列腺癌、直腸癌、腎細胞(腎)癌、腎盂及輸尿管癌、移行細胞癌、視網膜母細胞瘤、唾液腺癌、肉瘤、尤文家族腫瘤、卡波西肉瘤、軟組織肉瘤、子宮肉瘤、塞紮萊症候群 (Sézary Syndrome)、皮膚癌 (非黑素瘤)、皮膚癌 (黑素瘤)、梅克爾細胞皮膚癌 (Merkel Cell Skin Carcinoma)、小腸癌、鱗狀細胞癌、原發灶隱匿之轉移性鱗狀頸癌、胃癌、幕上原始神經外胚層瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、睪丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤、胸腺瘤及胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂及輸尿管移行細胞癌、妊娠滋養層細胞腫瘤、輸尿管及腎盂癌、移行細胞癌、尿道癌、子宮癌、子宮內膜子宮肉瘤、陰道癌、視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、陰門癌、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、威爾姆氏

瘤 (Wilms Tumor)。

在另一態樣中，本發明提供治療罹患 PGE₂ 有害之病症之患者的方法，其包含在投與如上文所述之第二藥劑之前、同時或之後投與如上文所揭示之任一結合蛋白的步驟。在一實施例中，可與一或多種 PGE₂ 拮抗劑 (例如抗 PGE₂ 抗體或其片段) 共投與及/或共調配之第二治療劑包括 (但不限於) 以下一或多者：吸入類固醇；口服類固醇；β 促效劑，例如短效或長效 β 促效劑；白三烯或白三烯受體之拮抗劑；組合藥物，諸如 ADVAIR；IgE 抑制劑，例如抗 IgE 抗體 (例如 XOLAIR)；磷酸二酯酶抑制劑 (例如 PDE4 抑制劑)；黃嘌呤；抗膽鹼藥物；肥大細胞穩定劑，諸如色甘酸；IL-4 抑制劑；IL-5 抑制劑；嗜酸性粒細胞趨化因子 (eotaxin)/CCR3 抑制劑；組織胺或其受體 (包括 H1、H2、H3 及 H4) 之拮抗劑，及前列腺素 D 或其受體 (DP1 及 CRTH2) 之拮抗劑。該等組合可用於治療哮喘及其他呼吸障礙。可與一或多種抗 PGE₂ 抗體或其片段共投與及/或共調配之治療劑的其他實例包括以下一或多者：尤其 TNF 拮抗劑 (例如 TNF 受體之可溶性片段，例如 p55 或 p75 人類 TNF 受體或其衍生物，例如 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF 受體-IgG 融合蛋白質，ENBREL))；TNF 酶拮抗劑，例如 TNF 轉化酶 (TACE) 抑制劑；葷毒鹼受體拮抗劑；TGF-β 拮抗劑；干擾素 γ；佩福尼酮 (perfenidone)；化學治療劑，例如甲胺喋呤、來氟米特 (leflunomide) 或西羅莫司 (sirolimus) (雷帕黴素) 或其類似物，例如 CCI-779；COX2 及 cPLA2 抑制劑；NSAID；免

疫調節劑；p38抑制劑，TPL-2、MK-2及NFkB抑制劑。額外第二藥劑係選自由以下組成之群：布替耐德(budenoside)、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素(cyclosporin)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、胺基水楊酸酯、6-巯嘌呤、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲硝噻唑(metronidazole)、脂質加氧酶抑制劑、美沙拉嗪(mesalamine)、奧沙拉嗪(olsalazine)、巴柳氮(balsalazide)、抗氧化劑、凝血脂素抑制劑、IL-1受體拮抗劑、抗IL-1 β 、單株抗體、抗IL-6單株抗體、生長因子、彈性蛋白酶抑制劑、吡啶基-咪唑化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF之抗體或促效劑、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配位體之抗體、甲胺喋呤、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特、NSAID、布洛芬、皮質類固醇、潑尼龍(prednisolone)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓形成劑、補體抑制劑、腎上腺素劑、IRAK、NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制劑、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯嘌呤、血管收縮素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體、可溶性p55 TNF受體、可溶性p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、消炎細胞激素、IL-4、IL-10、IL-11及TGF β 。

在一特定實施例中，本發明提供治療罹患前列腺素E₂有害之病症之患者的方法，該方法包含在投與第二藥劑之前、同時或之後投與本發明之結合蛋白的步驟，其中該第二藥劑係選自由普遍用於治療各種人類疾病及病症之藥物組成之群。該等藥物之清單可自網際網路www.drugs.com獲得。此清單頻繁更新以反映各種人類疾病治療的技術現狀。該等藥物之清單亦可獲自最新藥物指南(H. Winter Griffith, Stephen Moore之Complete Guide to Prescription & Nonprescription Drugs 2008., ISBN-13: 978-0399533723)。

抗PGE₂結合蛋白可與上文清單中之用於特定疾病病況之任何療法組合。舉例而言，抗PGE₂結合蛋白可與一或多種用於治療類風濕性關節炎及青少年類風濕性關節炎之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)甲胺喋呤、來氟米特、低劑量皮質類固醇(諸如普賴蘇(prednisone)或皮質酮(cortisone))，抗瘧疾藥物(諸如羥基氯化奎寧(hydroxychloroquine))、金、柳氮磺胺吡啶、青黴胺(penicillamine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、環孢黴素(cyclosporine)、二甲胺四環素(minocycline)、乙醯胺苯酚(acetaminophen)、阿司匹靈(aspirin)、布洛芬、萘普生(naproxen)、賽利克西、英利昔單抗(Infliximab)、依那西普(etanercept)、阿達木單抗(adalimumab)、阿巴西普(abatacept)、利妥昔單抗(rituximab)、阿那白滯素(anakinra)及其他靶向IL-6、IL-6R、IL-17、IL-18、IL-23、B7.1/B7.2之新穎生物劑及經口傳遞藥劑。抗PGE₂結

合蛋白可與一或多種用於治療骨關節炎之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)乙醯胺苯酚、阿司匹靈、布洛芬、萘普生、賽利克西、類固醇、人造關節液，諸如欣維可(synvisc)及膝爾康(hyalgan)。抗PGE₂結合蛋白可與一或多種用於治療克隆氏病之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)阿達木單抗、咪唑硫嘌呤錠(azasan)、阿薩克(asacol)、硫唑嘌呤、磺胺塞拉金(azulfidine)、布地縮松(budesonide)、依託科特(entocort)、滅滴靈(flagyl)、移護寧(imuran)、英利昔單抗、巯嘌呤、甲硝噻唑、普洛托斯他(protostat)、巯基嘌呤(purinethol)、瑞米卡德(remicade)及柳氮磺胺吡啶。抗PGE₂結合蛋白可與一或多種用於治療關節黏連性脊椎炎之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)阿西脫克(acetocot)、乙醯水楊酸、阿卡普林81(acuprin 81)、阿達木單抗、阿立伏(aleve)、阿姆闊(amcort)、阿那普西(anaprox)、阿瑞斯托闊(aristocort)、阿司匹靈、阿斯皮塔(aspirtab)、阿紫馬闊(azmacort)、百服寧(bufferin)、巴福克斯(buffex)、凱扶蘭(cataflam)、西樂葆(celebrex)、速免痛(clinoril)、皮質酮、雙氯芬酸(diclofenac)、地泊坦(dipentum)、艾斯普林(easprin)、依那西普(etanercept)、吲哚辛(indocin)、吲哚美辛、英利昔單抗、萘普生、瑞米卡德、曲安西龍(triamcinolone)及服他寧(voltaren)。抗PGE₂結合蛋白可與一或多種用於治療多發性硬化症之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)阿凡尼西(Avonex)、咪唑硫嘌呤錠、硫唑嘌呤、倍泰龍

(Betaseron) 、 布 比 普 瑞 (Bubbli-Pred) 、 克 帕 松 (Copaxone) 、 扣 托 隆 (Cotolone) 、 格 拉 默 (Glatiramer) 、 移 護 寧 、 干 擾 素 β -1a 、 干 擾 素 β -1b 溶 液 、 凱 普 瑞 (Key-Pred) 、 凱 普 瑞 SP(Key-Pred SP) 、 米 托 蔥 醌 (Mitoxantrone) 、 那 他 珠 單 抗 (Natalizumab) 、 那 凡 曲 隆 (Novantrone) 、 奧 拉 普 德 (Orapred) 、 奧 拉 普 德 ODT 、 培 地 普 德 (Pediapred) 、 普 瑞 傑 特 50(Pred-Ject-50) 、 普 瑞 達 闊 50(Predacort 50) 、 普 瑞 達 龍 50(Predalone 50) 、 普 瑞 德 特 50(Predate-50) 、 潑 尼 龍 、 普 瑞 隆 (Prelone) 、 利 比 (Rebif) 及 泰 沙 比 瑞 (Tysabri) 。 抗 PGE_2 結 合 蛋 白 可 與 一 或 多 種 用 於 治 療 各 種 人 類 癌 症 及 惡 性 疾 病 之 藥 劑 或 治 療 程 序 組 合 。 除 了 可 自 網 際 網 路 網 站 www.drugs.com 及 最 新 藥 物 指 南 (H. Winter Griffith, Stephen Moore 之 Complete Guide to Prescription & Nonprescription Drugs 2008., ISBN-13: 978-0399533723) 獲 得 之 清 單 之 外 ， NCI 亦 保 留 關 於 美 國 食 品 及 藥 品 管 理 局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 批 准 用 於 治 療 癌 症 或 與 癌 症 相 關 病 狀 之 某 些 藥 物 的 藥 物 資 訊 。 此 等 藥 劑 之 實 例 包 括 (但 不 限 於) 阿 百 先 (Abraxane) 、 阿 德 力 黴 素 (Adriamycin) 、 阿 杜 西 (Adrucil) 、 艾 達 樂 (Aldara) 、 阿 倫 單 抗 (Alemtuzumab) 、 力 比 泰 (Alimta) 、 胺 基 乙 醯 丙 酸 、 安 美 達 錠 (Anastrozole) 、 阿 瑞 匹 坦 (Aprepitant) 、 瑞 寧 德 (Arimidex) 、 阿 諾 新 (Aromasin) 、 阿 倫 恩 (Arranon) 、 三 氧 化 二 砷 、 阿 瓦 斯 汀 (Avastin)(貝 伐 單 抗 (Bevacizumab)) 、 阿 紫 胞 苷 (Azacitidine) 、 貝 伐 單 抗 、 蓓

薩羅丁 (Bexarotene)、硼替佐米 (Bortezomib)、坎帕斯 (Campath)(阿倫單抗)、坎普托斯塔 (Camptosar)(鹽酸伊立替康 (Irinotecan Hydrochloride))、卡培他濱 (Capecitabine)、卡鉑 (carboplatin)、西妥昔單抗 (Cetuximab)、順鉑 (cisplatin)、卡拉芬 (Clafen)(環磷醯胺)、氟伐拉濱 (Clofarabine)、科洛法瑞 (Clofarex)(氟伐拉濱)、科羅拉 (Clolar)(氟伐拉濱)、環磷醯胺、阿糖胞苷 (Cytarabine)、賽德薩-U(Cytosar-U)(阿糖胞苷)、賽托先 (Cytosan)(環磷醯胺)、達珂 (Dacogen)(地西他濱 (Decitabine))、達沙替尼 (Dasatinib)、地西他濱、蒂潑西 (DepoCyt)(脂質阿糖胞苷)、蒂潑福馬 (DepoFoam)(脂質阿糖胞苷)、鹽酸右雷佐生 (Dexrazoxane Hydrochloride)、多西他賽 (Docetaxel)、多昔 (Doxil)(鹽酸多柔比星脂質體 (Doxorubicin Hydrochloride Liposome))、鹽酸多柔比星、鹽酸多柔比星脂質體、Dox-SL(鹽酸多柔比星脂質體)、艾福德 (Efudex)(氟尿嘧啶)、艾倫斯 (Ellence)(鹽酸表柔比星 (Epirubicin Hydrochloride))、樂沙定 (Eloxatin)(奧沙利鉑 (oxaliplatin))、艾蒙德 (Emend)(阿瑞匹坦 (Aprepitant))、鹽酸表柔比星、愛必妥 (Erbitux)(西妥昔單抗)、鹽酸埃羅替尼 (Erlotinib Hydrochloride)、艾伐昔特 (Evacet)(鹽酸多柔比星脂質體)、艾維斯達 (Evista)(鹽酸雷洛昔芬 (Raloxifene Hydrochloride))、依西美坦 (Exemestane)、伐斯洛德 (Faslodex)(氟維斯群 (Fulvestrant))、非馬拉 (Femara)(來曲唑 (Letrozole))、氟洛普雷 (Fluoroplex)(氟尿嘧啶)、氟尿嘧

啖、氟維斯群、吉非替尼(Gefitinib)、鹽酸吉西他濱(Gemcitabine Hydrochloride)、吉妥單抗奧唑米星(Gemtuzumab Ozogamicin)、健擇(Gemzar)(鹽酸吉西他濱)、格列衛(Gleevec)(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate))、赫賽汀(Herceptin)(曲妥珠單抗(Trastuzumab))、和美新(Hycamtin)(鹽酸拓撲替康(Topotecan Hydrochloride))、甲磺酸伊馬替尼、咪喹莫特(Imiquimod)、易瑞沙(Iressa)(吉非替尼)、鹽酸伊立替康、伊沙匹隆(Ixabepilone)、埃坡黴素(Ixempra)(伊沙匹隆)、克奧昔芬(Keoxifene)(鹽酸雷洛昔芬)、克皮凡昔(Kepivance)(帕麗非明(Palifermin))、二甲苯磺酸拉帕替(Lapatinib Ditosylate)、來那度胺(Lenalidomide)、來曲唑、雷戊蘭(Levulan)(胺基乙醯丙酸)、立波杜(LipoDox)(鹽酸多柔比星脂質體)、脂質阿糖胞苷、美賽唑斯通(Methazolastone)(替莫唑胺(Temozolomide))、美洛沙(Mylosar)(阿紫胞苷)、麥羅塔(Mylotarg)(吉妥單抗奧唑米星)、奈米粒子太平洋紫杉醇(太平洋紫杉醇白蛋白穩定化奈米粒子調配物)、奈拉濱(Nelarabine)、尼奧沙(Neosar)(環磷醯胺)、多吉美(Nexavar)(甲苯磺酸索拉非尼(Sorafenib Tosylate))、尼羅替尼(Nilotinib)、諾瓦得士(Nolvadex)(檸檬酸他莫昔芬(Tamoxifen Citrate))、恩卡斯巴(Oncaspar)(培門冬酶(Pegaspargase))、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、太平洋紫杉醇白蛋白穩定化奈米粒子調配物、帕麗非明(Palifermin)、帕尼單抗(Panitumumab)、帕拉普

拉 (Paraplat)(卡鉑)、伯爾定 (Paraplatin)(卡鉑)、培門冬酶、培美曲塞二鈉 (Pemetrexed Disodium)、帕拉提諾-AQ(Platinol-AQ)(順鉑)、帕拉提諾 (Platinol)(順鉑)、鹽酸雷洛昔芬、雷利米得 (Revlimid)(來那度胺)、美羅華 (Rituxan)(利妥昔單抗 (Rituximab))、利妥昔單抗、司蘭索胸膜內氣溶膠 (Sclerosol Intrapleural Aerosol)(滑石粉)、甲苯磺酸索拉非尼、撲瑞賽 (Sprycel)(達沙替尼)、無菌滑石粉(滑石粉)、斯特瑞托克 (Steritalc)(滑石粉)、蘋果酸舒尼替尼 (Sunitinib Malate)、舒坦特 (Sutent)(蘋果酸舒尼替尼)、賽諾維 (Synovir)(沙立度胺)、滑石粉、檸檬酸他莫昔芬、塔拉賓 (Tarabine)PFS(阿糖胞苷)、特羅凱 (Tarceva)(鹽酸埃羅替尼)、塔革雷汀 (Targretin)(蓓薩羅丁 (Bexarotene))、塔賽格納 (Tasigna)(尼羅替尼)、紫杉酚(太平洋紫杉醇)、泰素帝(多西他賽)、替莫達 (Temodar)(替莫唑胺)、替莫唑胺、坦西莫司 (Temsirrolimus)、賽羅密德 (Thalomid)(沙立度胺)、沙立度胺、托泰克 (Totect)(鹽酸右雷佐生)、鹽酸拓撲替康、馱瑞塞爾 (Torisel)(坦西莫司 (Temsirrolimus))、曲妥珠單抗、三森諾 (Trisenox)(三氧化二砷)、泰克布 (Tykerb)(二甲苯磺酸拉帕替)、維克替比 (Vectibix)(帕尼單抗 (Panitumumab))、萬珂 (Velcade)(硼替佐米)、維達紫 (Vidaza)(阿紫胞苷)、伏立諾他 (Vorinostat)、希羅達 (Xeloda)(卡培他濱 (Capecitabine))、辛卡德 (Zinecard)(鹽酸右雷佐生)、唑來膦酸 (Zoledronic Acid)、唑林紫 (Zolinza)(伏立諾他 (Vorinostat))及擇泰

(Zometa)(唑來膦酸)。

在一較佳實施例中，上文揭示之PGE₂結合蛋白醫藥組合物係藉由至少一種選自以下之模式投與個體：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、大腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸腔內、子宮內、膀胱內、快速注射、陰道、直腸、經頰、舌下、鼻內及經皮。

【實施方式】

當與隨附圖式一起閱讀時，自以下對較佳實施例之描述將更充分理解本發明之前述及其他目標、特徵及優勢以及本發明自身。

本發明係關於前列腺素E₂(PGE₂)結合蛋白，尤其結合PGE₂之抗PGE₂抗體或其抗原結合片段。本發明之多個態樣係關於抗體及抗體片段及其醫藥組合物，以及用於製備該等抗體及片段之核酸、重組表現載體及宿主細胞。本發明亦涵蓋使用本發明抗體來在活體外或活體內偵測PGE₂、抑制一或多種PGE₂活性；及調控基因表現之方法。

除非本文另外定義，否則結合本發明使用之科學及技術術語將具有一般技術者通常所瞭解之含義。術語之含義及範疇應為清晰的，然而，在任何隱約含糊之事件中，本文提供之定義優先於任何字典或外來定義。此外，除非上下文另外要求，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括

單數。在本申請案中，除非另外說明，否則使用「或」意謂「及/或」。此外，使用術語「包括(including)」(以及其他形式，諸如「includes」及「included」)不具有限制性。同樣，除非另外明確說明，否則諸如「元件」或「組件」之術語涵蓋包含一個單元之元件及組件及包含一個以上次單元之元件及組件。

一般而言，本文所述之與細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質與核酸化學及雜交有關的所使用之命名法及其技術為此項技術中所熟知及常用之命名法及技術。除非另外說明，否則一般根據此項技術中熟知之習知方法及如本說明書全文所引用及論述之多種一般及更為具體之參考文獻所描述之方法執行本發明之方法及技術。酶促反應及純化技術係根據製造商說明書，如此項技術中通常所實現或如本文所述來執行。本文所述之結合分析化學、合成有機化學及醫學及醫藥化學使用之命名法及其實驗室程序與技術為此項技術中所熟知及常用之命名法及程序與技術。對於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞及患者之治療使用標準技術。

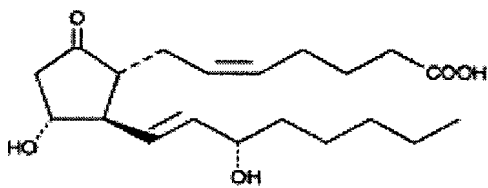
本發明可更容易地理解，所選擇之術語定義如下。

如本文所用之術語「多肽」係指胺基酸之任何聚合鏈。術語「肽」及「蛋白質」可與術語多肽互換使用且亦係指胺基酸之聚合鏈。術語「多肽」涵蓋天然或人工蛋白質、蛋白質片段及蛋白質序列之多肽類似物。多肽可為單體或聚合體。

術語「經分離蛋白質」或「經分離多肽」為一種蛋白質或多肽，根據其獲得起源或來源，該蛋白質或多肽不與其以天然狀態存在時相伴之天然相關組份締合；實質上不含來自同一物種之其他蛋白質；由來自不同物種之細胞表現；或在自然界中不存在。因此，化學合成或在不同於其天然起源之細胞的細胞系統中合成之多肽將與其天然相關組份「分離」。使用此項技術中熟知之蛋白質純化技術藉由分離亦可使蛋白質實質上不含天然相關組份。

如本文所用之術語「回收」係指例如使用此項技術熟知之蛋白質純化技術藉由分離使化學物質(諸如多肽)實質上不含天然相關組份之過程。

如本文所用之術語「前列腺素E₂」(本文中縮寫為PGE₂)係指具有以下結構之前列腺素或其保留一些或全部PGE₂活性之變異體：



如本文所用之「生物活性」係指細胞激素之固有生物學特性。PGE₂之生物學特性包括(但不限於)與PGE₂受體結合。

如本文所用之關於抗體、蛋白質或肽與第二化學物質之相互作用的術語「特異性結合」意謂該相互作用取決於化學物質上特定結構(例如抗原決定子或抗原決定基)之存在；例如，抗體識別且結合特定蛋白質結構而非與蛋白質

廣泛結合。若抗體對抗原決定基「A」具有特異性，則在含經標記「A」及抗體之反應中存在含抗原決定基A之分子(或游離、未經標記之A)將減少與該抗體結合之經標記A的量。

如本文所用之術語「抗體」泛指包含四個多肽鏈(兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈)之任何免疫球蛋白(Ig)分子或其保留Ig分子之必需抗原決定基結合特徵的任何功能片段、突變體、變異體或衍生物。該突變體、變異體或衍生物抗體型式為此項技術中所已知。下文論述其非限制性實施例。

在全長抗體中，各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含3個結構域CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域CL。可將VH及VL區進一步細分為高變區(稱為互補決定區(CDR))，其間散布有更為保守之區(稱作構架區(FR))。各VH及VL由三個CDR及四個FR構成，且自胺基末端至羧基末端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可為任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA)或子類。

如本文所用之術語抗體之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」(或簡稱為「抗體部分」)係指保留與抗原(例如PGE₂)特異性結合之能力的抗體之一或多個片段。抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。該等抗體實施例

亦可具有雙特異性、雙重特異性或多特異性型式；其與兩個或兩個以上不同抗原特異性結合。術語抗體之「抗原結合部分」內所涵蓋之結合片段的實例包括：(i) Fab片段，一種由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；(ii) F(ab')₂片段，一種包含經由位於鉸鏈區之二硫橋鍵連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii) Fd片段，其係由VH及CH1域組成；(iv) Fv片段，其係由抗體之單一臂之VL及VH域組成；(v) dAb片段(Ward等人，(1989) *Nature* 341:544-546，Winter等人，PCT公開案WO 90/05144 A1)，其包含單一可變域；及(vi)經分離互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個結構域(VL及VH)係由獨立基因編碼，但其可使用重組方法藉由使得其能夠製備為VL及VH區配對形成單價分子之單一蛋白質鏈(稱為單鏈Fv(scFv)；例如參見Bird等人，(1988) *Science* 242:423-426；及Huston等人，(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)的合成連接子聯接。該等單鏈抗體亦涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價、雙特異性抗體，其中VH及VL域表現於單個多肽鏈上，但使用過短以致於相同鏈上之兩個結構域之間不能配對的連接子，藉此迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且形成兩個抗原結合位點(例如參見Holliger, P等人，(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak, R.J等人，(1994) *Structure* 2:1121-1123)。該等抗體結合部分為此項技術中所已知

(Kontermann 及 Dubel 編， **Antibody Engineering** (2001) Springer-Verlag, New York， 第 790 頁 (ISBN 3-540-41354-5)。

如本文所用之術語「抗體構築體」係指包含一或多個與連接多肽或免疫球蛋白恆定域連接之本發明抗原結合部分的多肽。連接多肽包含兩個或兩個以上經肽鍵連接之胺基酸殘基且用於連接一或多個抗原結合部分。該等連接多肽為此項技術中所熟知(例如參見 Holliger, P 等人， (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448； Poljak, R.J 等人， (1994) *Structure* 2:1121-1123)。免疫球蛋白恆定域係指重鏈或輕鏈恆定域。人類 IgG 重鏈及輕鏈恆定域胺基酸序列為此項技術中所已知且呈現於表 1 中。

表 1：人類 IgG 重鏈恆定域及輕鏈恆定域之序列

蛋白質	序列標識符	序列
Ig γ -1 恆定區	SEQ ID NO.:1	12345678901234567890123456789012 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig γ -1 恆定區突變體	SEQ ID NO.:2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Ig κ 恆定區	SEQ ID NO.:3	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSF YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ig λ 恆定區	SEQ ID NO.:4	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

此外，抗體或其抗原結合部分可為較大免疫黏附分子之一部分，該較大免疫黏附分子係由該抗體或抗體部分與一或多個其他蛋白質或肽共價或非共價締合形成。該等免疫黏附分子包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區製備四聚scFv分子 (Kipriyanov, S.M. 等人，(1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) 及使用半胱胺酸殘基、標記肽及C端聚組胺酸標籤製備二價及經生物素標記scFv分子 (Kipriyanov, S.M. 等人，(1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)。可分別使用諸如完整抗體之木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化之習知技術自完整抗體製備諸如Fab及F(ab')₂片段之抗體部分。此外，可使用如本文所述之標準重組DNA技術獲得抗體、抗體部分及免疫黏附分子。

如本文所用之「經分離抗體」欲指實質上不含具有不同抗原特異性之其它抗體的抗體(例如，特異性結合PGE₂之經分離抗體實質上不含特異性結合除PGE₂以外之抗原的抗體)。然而，特異性結合PGE₂之經分離抗體可對其他抗原(諸如前列腺素E₁(PGE₁)分子)具有交叉反應性。此外，經分離抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學品。

如本文所用之術語「人類抗體」意欲包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本發明人類抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之

胺基酸殘基(例如，藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)，例如在CDR且尤其CDR3中。然而，如本文所用之術語「人類抗體」並不欲包括來源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上之抗體。

如本文所用之術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組方式製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體(在下文第II C部分中進一步描述)、自重組組合人類抗體文庫分離之抗體(Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H.及 Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V.及 Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H.及 Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378)、自人類免疫球蛋白基因轉殖基因動物(例如小鼠)分離之抗體(例如參見Taylor, L. D.等人, (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A.及 Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M.等人, (2000) *Immunology Today* 21:364-370)或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列拼接至其他DNA序列的任何其他方式製備、表現、產生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，在某些實施例中，該等重組人類抗體經受活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列轉殖基因動物時，經受活體內體細胞突變誘發)且因此重組抗

體之VH及VL區胺基酸序列為儘管來源於人類生殖系VH及VL序列且與人類生殖系VH及VL序列相關、但可能在活體內不天然存在於人類抗體生殖系譜內的序列。一實施例提供可使用此項技術中熟知之技術產生之能夠結合PGE₂之完全人類抗體，該等技術諸如(但不限於)使用人類Ig噬菌體文庫(諸如Jermutus等人，PCT公開案第WO 2005/007699 A2號中所揭示之噬菌體文庫)。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一物種之重鏈及/或輕鏈可變區序列及來自另一物種之恆定區序列的抗體，諸如具有鼠類重鏈及輕鏈可變區與人類恆定區連接之抗體。

術語「CDR移植抗體」係指包含來自一物種之重鏈及/或輕鏈可變區序列但其中VH及/或VL之一或多個CDR區之序列經另一物種之CDR序列置換的抗體，諸如具有一或多個鼠類CDR(例如CDR3)已經人類CDR序列置換之鼠類重鏈及輕鏈可變區之抗體。

術語「人類化抗體」係指包含來自非人類物種(例如小鼠)之重鏈及輕鏈可變區序列，但其中至少一部分VH及/或VL序列已經改變而更「類似人類」，亦即更加類似於人類生殖系可變序列的抗體。一種類型之人類化抗體為CDR移植抗體，其中將人類CDR序列引入非人類VH及VL序列中以置換相應非人類CDR序列。在一實施例中，提供人類化抗PGE₂抗體及抗原結合部分。該等抗體係藉由使用慣用融合瘤技術獲得鼠類抗PGE₂單株抗體，隨後使用活體外遺傳工程改造(諸如Kasaian等人PCT公開案第WO 2005/123126

A2號中所揭示者)人類化產生。

術語「Kabat編號」、「Kabat界定」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。此項技術中公認之此等術語係指相比於抗體或其抗原結合部分之重鏈及輕鏈可變區中之其他胺基酸殘基更可變(亦即高變)之胺基酸殘基的編號系統(Kabat等人,(1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391及Kabat, E.A.等人,(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版,美國衛生及公共服務部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH公開案第91-3242號)。對於重鏈可變區而言,高變區範圍為CDR1之胺基酸位置31至35,CDR2之胺基酸位置50至65,及CDR3之胺基酸位置95至102。對於輕鏈可變區而言,高變區範圍為CDR1之胺基酸位置24至34,CDR2之胺基酸位置50至56,及CDR3之胺基酸位置89至97。

如本文所用之術語「受體」及「受體抗體」係指提供或編碼一或多個構架區之胺基酸序列之至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的抗體或核酸序列。在一些實施例中,術語「受體」係指提供或編碼恆定區之抗體胺基酸或核酸序列。在另一實施例中,術語「受體」係指提供或編碼構架區及恆定區中之一或多者的抗體胺基酸或核酸序列。在一特定實施例中,術語「受體」係指提供或編碼一或多個構架區之胺基酸序列之至少80%、較佳至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的人類抗體胺基酸或核酸序列。根據此實施例,受

體可含有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個或至少10個不出現於人類抗體之一或多個特定位置之胺基酸殘基。受體構架區及/或受體恆定區可例如來源於或獲自生殖系抗體基因、成熟抗體基因、功能性抗體(例如此項技術中熟知之抗體、處於開發中之抗體或市售抗體)。

如本文所用之術語「CDR」係指抗體可變序列內之互補決定區。重鏈及輕鏈之可變區中各存在三個CDR，各可變區之該三個CDR指定為CDR1、CDR2及CDR3。如本文所用之術語「CDR組」係指存在於能夠結合抗原之單一可變區中的三個CDR之群。此等CDR之確切邊界已根據不同系統經不同界定。Kabat所述之系統(Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (國家健康研究院 (National Institutes of Health), Bethesda, Md. (1987)及(1991))不僅提供適用於抗體之任何可變區的明確殘基編號系統，且亦提供界定三個CDR之確切殘基邊界。此等CDR可稱為Kabat CDR。Chothia及其合作者(Chothia及Lesk, J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)及Chothia等人，*Nature* 342:877-883 (1989))發現Kabat CDR內之某些子部分即使在胺基酸序列層面具有極大多樣性，亦採用幾乎相同的肽主鏈構形。此等子部分指定為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」及「H」分別表示輕鏈區及重鏈區。此等區可稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊之邊界。界定與Kabat CDR重疊之CDR之其他邊界已由Padlan(FASEB J.

9:133-139(1995)) 及 MacCallum(J Mol Biol 262(5):732-45(1996))描述。其他CDR邊界界定可能不嚴格遵循以上系統中之一者，但仍會與Kabat CDR重疊，不過根據特定殘基或殘基群或甚至整個CDR不顯著影響抗原結合之預測或實驗研究結果其可能會縮短或延長。本文中所用之方法可利用根據此等系統中之任一者所界定之CDR，但較佳實施例使用Kabat或Chothia界定之CDR。

如本文所用之術語「標準」殘基係指CDR或構架中界定如由Chothia等人，J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987)；Chothia等人，J. Mol. Biol. 227:799 (1992)所定義之特定標準CDR結構之殘基。根據Chothia等人，許多抗體之CDR之關鍵部分即使在胺基酸序列層面具有極大多樣性，亦具有幾乎相同的肽主鏈構形。各標準結構主要指定一組使胺基酸殘基之鄰接區段形成環之肽主鏈扭轉角。

如本文所用之術語「供體」及「供體抗體」係指提供一或多個CDR之抗體。在一較佳實施例中，供體抗體為來自不同於獲得或產生構架區之抗體之物種的抗體。在人類化抗體之情形下，術語「供體抗體」係指提供一或多個CDR之非人類抗體。

如本文所用之術語「構架」或「構架序列」係指可變區減去CDR之剩餘序列。因為CDR序列之確切界定可由不同系統確定，所以構架序列之含義遵循相應的不同解釋。六個CDR(輕鏈之CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3及重鏈之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)亦將輕鏈及重鏈上之構架區在各

鏈上分成四個子區(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位於FR1與FR2之間，CDR2位於FR2與FR3之間，且CDR3位於FR3與FR4之間。在不將特定子區指定為FR1、FR2、FR3或FR4之狀況下，構架區當以其他名稱提及時代表天然存在之單一免疫球蛋白鏈之可變區中之組合FR。如本文所用之一FR代表四個子區中之一者，且FR代表構成構架區之四個子區中之兩個或兩個以上子區。例示性FR序列參見表5及6。

如本文所用之術語「生殖系抗體基因」或「生殖系抗體基因片段」係指由未經歷導致遺傳重排及突變從而表現特定免疫球蛋白之成熟過程之非淋巴細胞編碼的免疫球蛋白序列。(例如參見Shapiro等人，*Crit. Rev. Immunol.* 22(3): 183-200 (2002)；Marchalonis等人，*Adv Exp Med Biol.* 484:13-30 (2001))。本發明之各個實施例所提供之一個優點基於如下認知：生殖系抗體基因比成熟抗體基因更可能保留物種中個體之必需胺基酸序列結構特徵，因此當用於治療彼物種時，不太可能判別為來自外來來源。

如本文所用之術語「關鍵」殘基係指可變區中對抗體(尤其人類化抗體)之結合特異性及/或親和力具有較大影響的某些殘基。關鍵殘基包括(但不限於)以下一或多種殘基：與CDR相鄰之殘基、潛在糖基化位點(可為N-或O-糖基化位點)、稀有殘基、能夠與抗原相互作用之殘基、能夠與CDR相互作用之殘基、典型殘基、重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基、Vernier區內之殘基，及Chothia

界定之可變重鏈CDR1與Kabat界定之第一重鏈構架之間重疊之區域中的殘基。

如本文所用之術語「人類化抗體」為與所關注抗原免疫特異性結合且包含實質上具有人類抗體胺基酸序列之構架(FR)區及實質上具有非人類抗體胺基酸序列之互補決定區(CDR)的抗體或其變異體、衍生物、類似物或片段。如本文所用之術語「實質上」在CDR之情形下係指具有與非人類抗體CDR之胺基酸序列至少80%、較佳至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%一致之胺基酸序列的CDR。人類化抗體包含至少一個且通常兩個可變域(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)之實質上全部，其中全部或實質上全部CDR區對應於非人類免疫球蛋白(亦即供體抗體)之彼等CDR區且全部或實質上全部構架區為人類免疫球蛋白共同序列之彼等構架區。較佳地，人類化抗體亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體含有輕鏈以及至少重鏈之可變域。抗體亦可包括重鏈之CH1、鉸鏈區、CH2、CH3及CH4區。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化輕鏈。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化重鏈。在特定實施例中，人類化抗體僅含有輕鏈及/或人類化重鏈之人類化可變域。

人類化抗體可選自任何類別之免疫球蛋白，包括IgM、IgG、IgD、IgA及IgE，及任何同型，包括(但不限於)IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。人類化抗體可包含一種以

上類型或同型之序列，且特定恆定域可經選擇以使用此項技術中熟知之技術優化所要效應功能。

人類化抗體之構架區及CDR區不需要與親本序列精確對應，例如供體抗體CDR或一致構架可藉由取代、插入及/或缺失至少一個胺基酸殘基來誘發突變以使在該位點處之CDR或構架殘基不與供體抗體或共同構架對應。然而，在一較佳實施例中，該等突變將不會廣泛進行。一般而言，至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%及最佳至少95%之人類化抗體殘基將對應於親本FR及CDR序列之彼等殘基。如本文所用之術語「共同構架」係指共同免疫球蛋白序列之構架區。如本文所用之術語「共同免疫球蛋白序列」係指由相關免疫球蛋白序列家族中最常見之胺基酸(或核苷酸)形成之序列(例如參見Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在免疫球蛋白家族中，共同序列中之各位置係由該家族中在彼位置處最常見之胺基酸佔據。若兩個胺基酸以同等頻率出現，則共同序列中可包括任一個。

如本文所用之「Vernier」區係指如Foote及Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499所述之可調節CDR結構且微調與抗原之配合的構架殘基子集。Vernier區殘基形成作為CDR基礎之層且可對CDR之結構及抗體親和力產生影響。

術語「多價結合蛋白」在本說明書中用於表示包含兩個或兩個以上抗原結合位點之結合蛋白。多價結合蛋白較佳經工程改造成具有三個或三個以上抗原結合位點且通常不

為天然存在之抗體。術語「多特異性結合蛋白」係指能夠結合兩個或兩個以上相關或不相關目標之結合蛋白。如本文所用之雙重可變域(DVD)結合蛋白為包含兩個或兩個以上抗原結合位點之結合蛋白且為四價或多價結合蛋白。該等DVD結合蛋白可為單特異性的，亦即能夠結合一個抗原；或多特異性的，亦即能夠結合兩個或兩個以上抗原。包含兩個重鏈DVD多肽及兩個輕鏈DVD多肽之DVD結合蛋白稱為DVD-IgTM。DVD-Ig之每一半包含重鏈DVD多肽及輕鏈DVD多肽，及兩個抗原結合位點。各結合位點包含重鏈可變域及輕鏈可變域，其中每一抗原結合位點總計有6個CDR參與抗原結合。

如本文所用之術語「中和」係指當結合蛋白特異性結合細胞激素或脂質代謝物時，中和細胞激素或脂質代謝物之生物活性。中和結合蛋白較佳為中和抗體，其與PGE₂之結合對PGE₂之生物活性產生抑制作用。較佳地，中和結合蛋白結合PGE₂且使PGE₂之生物活性降低至少約10%、20%、40%、60%、80%、85%或85%以上。可藉由量測此項技術中熟知的PGE₂生物活性之一或多個指標來評估中和結合蛋白對PGE₂之生物活性的抑制。舉例而言，藉由使用過表現EP4受體之HEK293細胞進行EP4檢定來評估對PGE₂誘發之鈣流入的抑制(參見實例1.1.C 1)。

術語「活性」包括以下活性，諸如抗體對抗原之結合特異性/親和力，例如與PGE₂抗原結合之抗PGE₂抗體；及/或抗體之中和效力，例如與PGE₂之結合抑制PGE₂之生物活

性的抗 PGE₂ 抗體，例如藉由使用過表現 EP4 受體之 HEK293 細胞進行的 EP4 檢定來評估對 PGE₂ 誘發之鈣流入之抑制(參見實例 1.1.C 1)。

術語「抗原決定基」包括能夠與免疫球蛋白或 T 細胞受體特異性結合之任何多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括分子之化學活性表面基團(諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基)，且在某些實施例中，其可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。抗原決定基為由抗體結合之抗原區域。在某些實施例中，當抗體在蛋白質及/或大分子之複雜混合物中優先識別其目標抗原時，認為該抗體特異性結合抗原。

本文所用之術語「表面電漿共振」係指允許藉由(例如)使用 BIAcore 系統 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ) 偵測生物傳感器基質內蛋白質濃度之改變來分析即時生物特異性相互作用之光學現象。更多描述參見 Jönsson, U. 等人，(1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26；Jönsson, U. 等人，(1991) *Biotechniques* 11:620-627；Johnsson, B. 等人，(1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131；及 Johnson, B. 等人，(1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

如本文所用之術語「 k_{on} 」意欲指如此項技術所已知之抗體與抗原締合形成抗體/抗原複合物之締合速率常數。

如本文所用之術語「 k_{off} 」意欲指如此項技術已知之抗體自抗體/抗原複合物解離之解離速率常數。

如本文所用之術語「 K_D 」意欲指如此項技術已知之特定抗體-抗原相互作用之解離常數。

如本文所用之術語「經標記結合蛋白」係指已併有可供鑑別結合蛋白之標記的蛋白質。較佳地，標記為可偵測標記物，例如併入經放射性標記之胺基酸或與可由經標記抗生物素蛋白(例如含有可以光學或比色方法偵測之螢光標記物或酶促活性之抗生蛋白鏈菌素)偵測之具有生物素基部分之多肽連接。用於多肽之標記之實例包括(但不限於)以下：放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm)；螢光標記(例如FITC、若丹明(rhodamine)、釷系金屬磷光體)；酶標記(例如辣根過氧化酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)；化學發光標記物；生物素基；由二次報導體識別之預定多肽抗原決定基(例如白胺酸拉鏈對序列、二次抗體之結合位點、金屬結合域、抗原決定基標籤)；及諸如釷螯合物之磁化劑。

術語「抗體結合物」係指以化學性方式連接第二化學部分(諸如治療劑或細胞毒性劑)之結合蛋白(諸如抗體)。本文所用之術語「藥劑」表示化合物、化合物之混合物、生物大分子或由生物材料製備之萃取物。較佳地，治療劑或細胞毒性劑包括(但不限於)百日咳毒素(pertussis toxin)、紫杉酚、細胞鬆弛素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽

(tenoposide) 、 長 春 新 鹼 (vincristine) 、 長 春 鹼 (vinblastine) 、 秋 水 仙 鹼 (colchicin) 、 多 柔 比 星 (doxorubicin) 、 道 諾 黴 素 (daunorubicin) 、 二 羥 基 炭 疽 菌 素 二 酮 (dihydroxy anthracin dione) 、 米 托 蒨 醌 、 光 神 黴 素 (mithramycin) 、 放 線 菌 素 D (actinomycin D) 、 1-脫 氫 罌 固 酮 、 糖 皮 質 激 素 、 普 魯 卡 因 (procaine) 、 丁 卡 因 (tetracaine) 、 利 多 卡 因 (lidocaine) 、 普 萘 洛 爾 (propranolol) 及 嘌 呤 黴 素 (puromycin) 以 及 其 類 似 物 或 同 系 物 。

如 本 文 所 用 之 術 語 「 晶 體 」 及 「 結 晶 化 」 係 指 以 晶 體 形 式 存 在 之 抗 體 或 其 抗 原 結 合 部 分 。 晶 體 為 固 態 物 質 之 一 種 形 式 ， 其 不 同 於 諸 如 非 晶 形 固 態 或 液 晶 態 之 其 他 形 式 。 晶 體 係 由 原 子 、 離 子 、 分 子 (例 如 蛋 白 質 ， 諸 如 抗 體) 或 分 子 集 合 體 (例 如 抗 原 / 抗 體 複 合 物) 之 規 則 的 重 複 三 維 陣 列 構 成 。 此 等 三 維 陣 列 係 根 據 特 定 數 學 關 係 排 列 。 晶 體 中 重 複 之 基 本 單 元 或 構 建 塊 稱 為 不 對 稱 單 元 。 以 符 合 既 定 之 定 義 明 確 的 晶 體 學 對 稱 性 之 排 列 重 複 不 對 稱 單 元 提 供 晶 體 之 「 單 位 晶 胞 」 。 在 所 有 三 個 維 度 中 藉 由 規 則 平 移 重 複 單 位 晶 胞 將 提 供 晶 體 。 參 見 Giege, R. 及 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 第 2 版 , 第 20 1-16 頁 , Oxford University Press, New York, New York, (1999) 。

一 實 施 例 提 供 用 於 釋 放 結 合 蛋 白 之 組 合 物 ， 其 中 該 組 合 物 包 含 調 配 物 ， 該 調 配 物 又 包 含 如 上 文 所 揭 示 之 結 晶 化 結 合 蛋 白 、 結 晶 化 抗 體 構 築 體 或 結 晶 化 抗 體 結 合 物 ， 及 成

分；及至少一種聚合載劑。較佳地，聚合載劑為選自由以下組成之群的一或多者之聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酞)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)、聚(乙二醇)、聚((羥丙基)甲基丙烯醯胺)、聚[(有機)磷氮烯]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、氧化異丙烯多元醇類、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡醣、甘胺基聚糖、硫酸多醣，其摻合物及共聚物。較佳地，該成分係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。另一實施例提供治療哺乳動物之方法，其包含向該哺乳動物投與有效量之上文所揭示之組合物的步驟。

如本文所提及之術語「聚核苷酸」意謂兩個或兩個以上核苷酸(核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸或任一類核苷酸的經修飾形式)之聚合形式。該術語包括DNA之單股或雙股形式，但較佳為雙股DNA。

如本文所用之術語「經分離聚核苷酸」將意謂一種聚核苷酸(例如基因組、cDNA或合成來源者，或其某種組合)，鑒於其來源，該「經分離聚核苷酸」不與在自然界中連同該「經分離聚核苷酸」一起存在之聚核苷酸之全部或一部分締合；可操作性連接至在自然界中不與其連接之聚核苷酸；或本質上不作為較大序列之一部分存在。

如本文所用之術語「載體」意欲指一種能夠轉運已與其連接之另一核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質體」，其係指內部可連接其他DNA區段之環狀雙股DNA環。另一類型之載體為病毒載體，其中可將其他DNA區段連接至病毒基因組。某些載體能夠在其所引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中之後整合至宿主細胞之基因組中，且藉此與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠指導與其可操作性連接之基因的表現。該等載體在本文中稱為「重組表現載體」(或簡稱為「表現載體」)。一般而言，適用於重組DNA技術中之表現載體通常呈質體形式。因為質體為載體之最常用形式，所以在本說明書中，「質體」與「載體」可互換使用。然而，本發明意欲包括表現載體之該等其他形式，諸如起等效作用之病毒載體(例如複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒及與腺相關病毒)。

術語「可操作性連接」係指所述組份處於允許其按其預定方式作用之關係中的並置。控制序列「可操作性連接」至編碼序列係以使編碼序列之表現在與控制序列相容之條件下實現的方式連接。「可操作性連接」之序列包括與所關注基因鄰接之表現控制序列以及反式作用或在一定距離外作用以控制所關注基因的表現控制序列。如本文所用之術語「表現控制序列」係指為實現其所連接之編碼序列的表現及加工所必需之聚核苷酸序列。表現控制序列包括適

當轉錄啟始、終止、啟動子及強化子序列；有效RNA加工信號，諸如拼接及聚腺苷酸化信號；穩定細胞質mRNA之序列；提高轉譯效率之序列(亦即Kozak共同序列)；增強蛋白質穩定性之序列；及必要時增加蛋白質分泌之序列。該等控制序列之性質視宿主生物體而不同；在原核生物中，該等控制序列一般包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄終止序列；在真核生物中，該等控制序列包括啟動子及轉錄終止序列。術語「控制序列」意欲包括存在對於表現及加工而言必要的組份，且亦可包括存在具有益處之其他組份，例如前導序列及融合搭配物序列。本發明之蛋白構築體可使用此項技術中已知之表現載體及宿主細胞(包括表現卡匣、載體、重組宿主細胞)及自單一開放閱讀框架重組表現及蛋白水解加工重組聚合蛋白質及前蛋白質之方法來表現及純化(例如WO 2007/014162)。

如本文所定義之「轉型」係指使外源DNA進入宿主細胞中之任何過程。可在天然或人工條件下使用此項技術中熟知的各種方法進行轉型。轉型可依靠用於將外來核酸序列插入至原核或真核宿主細胞中之任何已知方法進行。該方法係基於所轉型之宿主細胞選擇且可包括(但不限於)病毒感染、電穿孔、脂質轉染及粒子轟擊。該等「轉型」細胞包括插入之DNA能夠以自主複製質體或宿主染色體之一部分的形式複製的穩定轉型細胞。其亦包括在有限時段內短暫表現所插入之DNA或RNA的細胞。

如本文所用之術語「重組宿主細胞」(或簡稱為「宿主

細胞」)意欲指已引入外源DNA之細胞。應瞭解，該等術語不僅欲指特定個體細胞，而且亦指該細胞之子代。因為某些修飾可能因突變或環境影響而在繼代中發生，所以該子代實際上可能不與親本細胞相同，但其仍包括在如本文所用之術語「宿主細胞」之範疇內。較佳地，宿主細胞包括原核細胞、真核細胞、昆蟲細胞或選自生命界中之任一者的細胞。較佳真核細胞包括原生生物、真菌、植物及動物細胞。最佳地，宿主細胞包括(但不限於)原核細胞株大腸桿菌；哺乳動物細胞株CHO、HEK 293及COS；昆蟲細胞株Sf9；及真菌細胞釀酒酵母(*S. cerevisiae*)。

重組DNA、寡核苷酸合成及組織培養及轉型可使用標準技術進行(例如電穿孔、脂質轉染)。酶促反應及純化技術可根據製造商說明書或如此項技術中通常所實現或如本文所述執行。上述技術及程序一般可根據此項技術中熟知之習知方法及如本說明書全文所引用及論述之各種綜合性參考文獻及更具體之參考文獻中所述執行。例如參見 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。

如此項技術已知及如本文所用之「轉殖基因生物體」係指具有含有轉殖基因之細胞的生物體，其中引入生物體(或生物體之祖先)中之轉殖基因表現並不在該生物體中天然表現之多肽。「轉殖基因」為穩定且可操作性整合至發育成轉殖基因生物體之細胞之基因組中，從而指導所編碼

基因產物於轉殖基因生物體之一或多種細胞類型或組織中表現的DNA構築體。

術語「調控」與「調節」可互換使用，且如本文中所使用，其係指所關注分子之活性(例如PGE₂之生物活性)的改變或變化。調節可為所關注分子之某一活性或功能之量值的增加或降低。分子之例示性活性及功能包括(但不限於)結合特徵、酶促活性、細胞受體活化及信號轉導。

相應地，如本文所用之術語「調節劑」為能夠使所關注分子之活性或功能(例如PGE₂之生物活性)改變或變化的化合物。舉例而言，調節劑可引起分子的某一活性或功能之量值相較於在不存在該調節劑狀況下所觀察到之活性或功能之量值增加或減小。在某些實施例中，調節劑為降低分子之至少一種活性或功能之量值的抑制劑。例示性抑制劑包括(但不限於)蛋白質、肽、抗體、肽體(peptibody)、碳水化合物或小有機分子。肽體描述於例如WO 01/83525中。

如本文所用之術語「促效劑」係指當與所關注分子接觸時引起分子的某一活性或功能之量值相較於在不存在促效劑狀況下所觀察到之活性或功能之量值增加的調節劑。所關注特定促效劑可包括(但不限於)PGE₂或多肽、核酸、碳水化合物或與PGE₂結合之任何其他分子。

如本文所用之術語「拮抗劑」或「抑制劑」係指當與所關注分子接觸時引起分子的某一活性或功能之量值相較於在不存在拮抗劑狀況下所觀察到之活性或功能之量值降低

的調節劑。所關注特定拮抗劑包括阻斷或調節PGE₂之生物或免疫活性之拮抗劑。PGE₂之拮抗劑及抑制劑可包括(但不限於)蛋白質、核酸、碳水化合物或與PGE₂結合之任何其他分子。

術語「抑制與受體之結合」係指結合蛋白防止PGE₂與其受體中之一或多者結合的能力。該對與受體結合之抑制將導致降低或消除由PGE₂與其受體結合所介導之生物活性。

如本文所用之術語「有效量」係指足以降低或改善病症或其一或多種症狀之嚴重程度及/或持續時間；阻止病症進展；引起病症消退；預防與病症相關之一或多種症狀復發、發展、發作或進展；偵測病症，或增強或改良另一療法(例如預防劑或治療劑)之預防或治療作用的療法之量。

如本文所用之術語「樣本」係以其最廣泛意義使用。如本文所用之「生物樣本」包括(但不限於)來自活物(living thing)或先前為活物之任何量的物質。該等活物包括(但不限於)人類、小鼠、大鼠、猴、犬、家兔及其他動物。該等物質包括(但不限於)血液、血清、尿液、滑液、細胞、器官、組織、骨髓、淋巴結及脾臟。

在一較佳實施例中，結合蛋白為能夠結合PGE₂之CDR移植抗體或其抗原結合部分。較佳地，CDR移植抗體或其抗原結合部分包含來自上文揭示之2B5-7.0或2B5-8.0或2B5-9.0之一或多個CDR。較佳地，CDR移植抗體或其抗原結合部分包含人類受體構架。更佳地，人類受體構架為與2B5-7.0或2B5-8.0或2B5-9.0之小鼠抗體構架具有大於60%同源

性之人類受體構架中之任一者。

在一較佳實施例中，結合蛋白為能夠結合PGE₂之人類化抗體或其抗原結合部分。較佳地，人類化抗體或其抗原結合部分包含上文揭示之一或多個CDR併入至人類受體構架之人類抗體可變域中。較佳地，人類抗體可變域為共同人類可變域。更佳地，人類受體構架在關鍵殘基處包含至少一個構架區胺基酸取代，其中該關鍵殘基係選自由以下組成之群：與CDR相鄰之殘基；糖基化位點殘基；稀有殘基；能夠與PGE₂相互作用之殘基；能夠與CDR相互作用之殘基；典型殘基；重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基；Vernier區內之殘基；及在Chothia界定之可變重鏈CDR1與Kabat界定之第一重鏈構架之間重疊之區域中的殘基。較佳地，人類受體構架包含至少一個構架區胺基酸取代，其中該構架之胺基酸序列與該人類受體構架之序列至少65%一致且包含至少70個與該人類受體構架一致之胺基酸殘基。

在一實施例中，人類化抗體或其抗原結合部分包含三個或三個以上上文揭示之CDR。在一特定實施例中，人類化抗體或其抗原結合部分包含六個上文揭示之CDR。

本發明之一實施例提供包含上文揭示之任一結合蛋白及連接多肽或免疫球蛋白之抗體構築體。在一較佳實施例中，抗體構築體係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、雙硫鍵連接之Fv、scFv、單域抗

體、雙功能抗體、多特異性抗體、雙重特異性抗體、DVD-IgTM及雙特異性抗體。在一較佳實施例中，抗體構築體包含選自由以下組成之群的重鏈免疫球蛋白恆定域：人類IgM恆定域、人類IgG1恆定域、人類IgG2恆定域、人類IgG3恆定域、人類IgG4恆定域、人類IgE恆定域及人類IgA恆定域。在另一實施例中，本發明提供抗體結合物，其包含上文揭示之抗體構築體及選自由以下組成之群的藥劑：免疫黏附分子、顯影劑、治療劑及細胞毒性劑。在一較佳實施例中，顯影劑係選自由放射性標記、酶、螢光標記、發光標記、生物發光標記、磁性標記及生物素組成之群。更佳地，顯影劑為選自由以下組成之群的放射性標記： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 及 ^{153}Sm 。在一較佳實施例中，治療劑或細胞毒性劑係選自由以下組成之群：抗代謝物、烷基化劑、抗生素、生長因子、細胞激素、抗血管生成劑、抗有絲分裂劑、蔥環黴素、毒素及細胞凋亡劑。

在另一實施例中，抗體構築體經糖基化。較佳地，糖基化為人類糖基化模式。

在另一實施例中，上文揭示之結合蛋白、抗體構築體或抗體結合物為晶體。較佳地，晶體為無載劑醫藥控制釋放晶體。在一較佳實施例中，結晶化結合蛋白、結晶化抗體構築體或結晶化抗體結合物具有比其可溶性對應物大的活體內半衰期。在另一較佳實施例中，結晶化結合蛋白、結晶化抗體構築體或結晶化抗體結合物在結晶化後保留生物

活性。

本發明之一態樣係關於編碼上文揭示之結合蛋白、抗體構築體或抗體結合物中之任一者的經分離核酸。另一實施例提供包含上文揭示之經分離核酸之載體，其中該載體係選自由以下組成之群：pcDNA；pTT(Durocher等人，*Nucleic Acids Research* 2002，第30卷，第2期)；pTT3(具有額外多選殖位點之pTT)；pEFBOS(Mizushima, S.及Nagata, S. (1990) *Nucleic acids Research* 第18卷，第17期)；pBV；pJV；pA2；及pBJ。

在另一態樣中，宿主細胞經上文揭示之載體轉型。較佳地，宿主細胞為原核細胞。更佳地，宿主細胞為大腸桿菌。在另一實施例中，宿主細胞為真核細胞。較佳地，真核細胞係選自由原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及真菌細胞組成之群。更佳地，宿主細胞為哺乳動物細胞，包括(但不限於)CHO、HEK293及COS；或真菌細胞，諸如釀酒酵母；或昆蟲細胞，諸如Sf9。

本發明之另一態樣提供產生結合PGE₂之結合蛋白的方法，其包含在足以產生結合PGE₂之結合蛋白的條件下在培養基中培養上文揭示之任一宿主細胞。另一實施例提供根據上文揭示之方法產生的結合蛋白。

本發明亦提供包含如上文揭示之結合蛋白、抗體構築體或抗體結合物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在另一實施例中，醫藥組合物包含至少一種用於治療PGE₂活性有害之病症的額外治療劑。較佳地，額外藥劑係選自由

以下組成之群：治療劑、顯影劑、細胞毒性劑、血管生成抑制劑(包括(但不限於)抗VEGF抗體或VEGF-trap)；激酶抑制劑(包括(但不限於)KDR及TIE-2抑制劑)；共刺激分子阻斷劑(包括(但不限於)抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig、抗CD20)；黏附分子阻斷劑(包括(但不限於)抗LFA-1 Ab、抗E/L選擇素Ab、小分子抑制劑)；抗細胞激素抗體或其功能片段(包括(但不限於)抗IL-18、抗TNF、抗IL-6/細胞激素受體抗體)；甲胺喋呤；環孢黴素；雷帕黴素；FK506；可偵測標記或報導體；TNF拮抗劑；抗風濕藥；肌肉鬆弛劑；麻醉藥；非類固醇消炎藥(NSAID)；止痛劑；麻醉劑；鎮靜劑；局部麻醉劑；神經肌肉阻斷劑；抗微生物劑；抗牛皮癬藥；皮質類固醇；同化類固醇；紅血球生成素；免疫作用；免疫球蛋白；免疫抑制劑；生長激素；激素替代藥物；放射性藥品；抗抑鬱劑；抗精神病藥物；興奮劑；哮喘藥物； β 促效劑；吸入類固醇；腎上腺素或類似物；細胞激素及細胞激素拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供抑制PGE₂活性之方法，其包含使PGE₂與上文揭示之結合蛋白接觸以使得PGE₂活性受到抑制。在一相關態樣中，本發明提供在罹患PGE₂活性有害之病症的人類個體中抑制PGE₂活性之方法，其包含向該人類個體投與上文揭示之結合蛋白以使得人類個體中之PGE₂活性被抑制且實現治療。

在另一態樣中，本發明提供在個體中治療(例如治癒、抑制、改善、延遲或預防發作或預防重現或復發)或預防

PGE₂相關病症之方法。該方法包括：以足以治療或預防PGE₂相關病症之量向個體投與PGE₂結合劑(尤其拮抗劑)，例如如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段。PGE₂拮抗劑(例如抗PGE₂抗體或其片段)可如本文所述單獨或與其他治療方式組合向個體投與。

在一實施例中，本發明提供用於治療(例如減輕、改善)或預防罹患一或多種PGE₂相關病症之哺乳動物個體(例如人類)之一或多種症狀的方法及組合物，該等病症包括例如涉及過量PGE₂合成的自體免疫及發炎性疾病及腫瘤。該等病症包括：(a)類風濕性及過敏性關節炎；(b)某些由病毒誘發之疾病，諸如格-巴二氏症候群、感染性單核白血球增多症、其他病毒性淋巴腺病及疱疹病毒感染；(c)多發性硬化症及其他脫髓鞘疾病；(d)血液病，諸如溶血性貧血及血小板減少症；(e)內分泌病症，諸如糖尿病、艾迪森氏病、特發性副甲狀腺低能症及慢性淋巴細胞性甲狀腺炎；(f)膠原蛋白病變，諸如全身性紅斑狼瘡症；及(g)生殖病症，諸如閉經、不孕症、反覆性流產及驚厥；及(h)腫瘤，諸如頭頸部腫瘤、肺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌等，及(i)腸胃器官病症(例如發炎性腸病(IBD)，諸如潰瘍性結腸炎及/或克隆氏病)；及(j)疼痛病症，諸如與骨關節炎及其他病症相關之疼痛；及(k)眼病，諸如年齡相關之黃斑變性(AMD)。因此，揭示內容包括PGE₂結合劑(諸如抗PGE₂抗體或其片段)用於治療之用途及PGE₂結合劑(諸如抗PGE₂抗體或其片段)用於製備用以治療之藥物的用途。

該方法包含以足以治療(例如減輕、改善)或預防一或多種症狀之量向個體投與PGE₂拮抗劑，例如PGE₂抗體或其片段。PGE₂抗體可投與供治療或預防或兩者。PGE₂拮抗劑(例如抗PGE₂抗體或其片段)可如本文所述單獨或與其他治療方式組合向個體投與。較佳地，個體為哺乳動物，例如罹患本文所述之PGE₂相關病症之人類。

在另一態樣中，本申請案提供活體外偵測樣本(例如生物學樣本，諸如血清、血漿、組織、活組織檢查)中PGE₂之存在的方法。標的方法可用於診斷例如免疫細胞相關病症之病症。該方法包括：(i)使樣本或對照樣本與如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段接觸；及(ii)偵測抗PGE₂抗體或其片段與樣本或對照樣本之間複合物的形成，其中樣本相對於對照樣本之複合物形成之統計學上顯著的變化指示樣本中存在PGE₂。

在另一態樣中，本發明提供治療罹患PGE₂有害之病症之患者的方法，其包含在投與如上文所述之第二藥劑之前、同時或之後投與如上文所揭示之任何結合蛋白的步驟。在一較佳實施例中，可與一或多種PGE₂拮抗劑(例如抗PGE₂抗體或其片段)共投與及/或共調配之額外治療劑包括(但不限於)以下一或多者：MTX；口服類固醇；金屬蛋白酶抑制劑；柳氮磺胺吡啶；硫唑嘌呤；6-巯嘌呤；血管收縮素轉化酶抑制劑；可溶性細胞激素受體；可溶性p55 TNF受體；可溶性p75 TNF受體；sIL-1RI；sIL-1RII；sIL-6R；消炎細胞激素；IL-4；IL-10；IL-11及TGFβ。

在一較佳實施例中，上文揭示之醫藥組合物係藉由至少一種選自以下之模式投與：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、大腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸腔內、子宮內、膀胱內、快速注射、陰道、直腸、經頰、舌下、鼻內及經皮。

本發明之一態樣提供至少一種針對至少一種本發明之 PGE₂ 結合蛋白的 PGE₂ 抗個體基因型抗體。抗個體基因型抗體包括含有以下分子之任何蛋白質或肽，該分子包含免疫球蛋白分子之至少一部分，諸如(但不限於)重鏈或輕鏈之至少一個互補決定區(CDR)或其配位體結合部分、重鏈或輕鏈可變區、重鏈或輕鏈恆定區、構架區或其可併入本發明之結合蛋白中的任何部分。

I. 結合前列腺素 E₂ 之抗體

在本發明中提供以高親和力、緩慢解離速率及高中和能力與 PGE₂ 結合之鼠類單株抗體或其抗原結合部分。本發明亦提供結合 PGE₂ 之嵌合抗體。本發明亦提供結合 PGE₂ 之人類化抗體或其抗原結合部分。較佳地，抗體或其部分為經分離抗體。較佳地，本發明抗體為中和人類抗 PGE₂ 及/或人類抗 PGE₂ 抗體。

A. 抗前列腺素 E₂ 抗體之製備方法

本發明之抗體及抗體片段可藉由任何此項技術已知之方

法產生，諸如融合瘤、微生物(例如噬菌體、細菌、酵母)、重組、核糖體、mRNA及DNA呈現或其組合。許多方法可用於操作抗體以改良抗體特性，包括此項技術中熟知之人類化、親和力成熟、抗體同型轉換、生理化學特性及藥物動力學概況改良等。

1.使用融合瘤技術製備抗前列腺素E₂單株抗體

單株抗體可使用此項技術已知之多種技術製備，包括使用融合瘤、重組、噬菌體及酵母呈現技術或其組合。可例如使用融合瘤技術產生單株抗體，包括此項技術中已知且在例如 Harlow 等人，Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版。1988)；Hammerling 等人，Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)中教示之彼等融合瘤技術。如本文所用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。術語「單株抗體」係指來源於包括任何真核、原核或噬菌體純系之單一純系而非由產生其之方法產生的抗體。

使用融合瘤技術產生及篩選特異性抗體之方法為此項技術中常規且熟知的。在一實施例中，本發明提供產生單株抗體之方法以及由該方法產生之抗體，該方法包含培養分泌本發明抗體之融合瘤細胞，其中該融合瘤較佳藉由將自以本發明抗原免疫之小鼠分離的脾細胞與骨髓瘤細胞融合且隨後篩選由該融合產生之融合瘤中分泌能夠結合本發明多肽之抗體的融合瘤純系來產生(參見實例1.2)。簡言之，

可以稱為半抗原載體蛋白結合物的載體蛋白結合之PGE₂免疫小鼠。此處，半抗原為PGE₂且載體蛋白可為牛甲狀腺球蛋白、匙孔螺血藍蛋白、牛血清白蛋白、卵白蛋白等中之任一者。在一較佳實施例中，PGE₂-甲狀腺球蛋白結合物與佐劑一起投與以刺激免疫反應。該等佐劑包括完全或不完全弗氏佐劑(Freund's adjuvant)、RIBI(胞壁醯二肽)或ISCOM(免疫刺激複合物)。該等佐劑可藉由將多肽隔離於局部沈積物中來保護該多肽免於快速分散，或其可含有刺激宿主分泌對巨噬細胞及免疫系統之其他組份具有趨化性之因子的物質。較佳地，若投與多肽，則免疫時程將包含分散於數週之內投與多肽兩次或兩次以上。

以PGE₂-甲狀腺球蛋白結合物免疫動物之後，可自該動物獲得抗體及/或產生抗體之細胞。藉由放血或處死動物自動物獲得含有抗PGE₂抗體之血清。血清可如自動物中獲得時原樣使用，可自該血清獲得免疫球蛋白溶離份或可自該血清純化出抗PGE₂抗體。以此方式獲得之血清或免疫球蛋白為多株血清或免疫球蛋白，因此具有一組不同特性。

一旦偵測到免疫反應，例如在小鼠血清中偵測到對抗原PGE₂具有特異性之抗體，即採集小鼠脾臟且分離脾細胞。隨後藉由熟知技術將脾細胞與例如來自細胞株SP20(可獲自ATCC)之細胞的任何合適骨髓瘤細胞融合。藉由有限稀釋來選擇及選殖融合瘤。隨後藉由此項技術中已知之方法檢定融合瘤純系中分泌能夠結合PGE₂之抗體之細胞。可藉由用陽性融合瘤純系免疫小鼠來產生腹水，其一般含有高

含量之抗體。

在另一實施例中，可由經免疫動物製備產生抗體之永生融合瘤。免疫後，處死動物且如此項技術中所熟知將脾B細胞與永生骨髓瘤細胞融合。例如參見Harlow及Lane，同上文。在一較佳實施例中，骨髓瘤細胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性細胞株)。在融合及抗生素選擇後，使用PGE₂或其一部分或表現PGE₂之細胞篩選融合瘤。在一較佳實施例中，初始篩選係使用酶聯免疫檢定法(ELISA)或放射免疫檢定法(RIA)執行，較佳為ELISA。在WO 00/37504中提供ELISA篩選之一實例。

選擇產生抗PGE₂抗體之融合瘤，選殖且針對包括旺盛融合瘤生長、高抗體產量及如下文進一步論述之所要抗體特徵之所要特徵進一步篩選。融合瘤可在同基因型動物、缺乏免疫系統之動物(例如裸小鼠)中活體內培養及擴增或在細胞培養物中活體外培養及擴增。選擇、選殖及擴增融合瘤之方法為一般技術者所熟知。

在一較佳實施例中，融合瘤為如上文所述之小鼠融合瘤。在另一較佳實施例中，融合瘤產生於非人類、非小鼠物種中，諸如大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬。在另一實施例中，融合瘤為人類融合瘤，其中將人類非分泌性骨髓瘤與表現抗PGE₂抗體之人類細胞融合。

可藉由已知技術產生識別特異性抗原決定基之抗體片段。舉例而言，本發明之Fab及F(ab')₂片段可藉由使用諸如木瓜蛋白酶(以產生Fab片段)或胃蛋白酶(以產生F(ab')₂)

片段)之酶進行免疫球蛋白分子之蛋白水解裂解而產生。
F(ab')₂片段含有可變區、輕鏈恆定區及重鏈之CH1域。

2.使用SLAM製備抗前列腺素E₂單株抗體

在本發明之另一態樣中，由單一經分離淋巴細胞使用如以下文獻中所述之此項技術中稱為選擇淋巴細胞抗體法(SLAM)之程序產生重組抗體：美國專利第5,627,052號、PCT公開案WO 92/02551及Babcock, J.S.等人，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848。在此方法中，使用抗原特異性溶血空斑檢定(antigen-specific hemolytic plaque assay)篩選分泌所關注抗體之單細胞(例如來源於第1部分所述經免疫動物中之任一者的淋巴細胞)，其中使用諸如生物素之連接子使抗原PGE₂、PGE₂次單元或其片段與綿羊紅血球偶合且用於鑑別分泌對PGE₂具有特異性之抗體的單細胞。鑑別所關注分泌抗體之細胞後，藉由逆轉錄酶PCR自細胞取得重鏈及輕鏈可變區cDNA，且隨後可表現該等可變區，在適當免疫球蛋白恆定區(例如人類恆定區)之情形下，可於諸如COS、HEK293或CHO細胞之哺乳動物宿主細胞中表現。隨後可例如藉由淘選經轉染細胞以分離出表現針對PGE₂之抗體的細胞，使經來源於活體內選擇之淋巴細胞之經擴增免疫球蛋白序列轉染的宿主細胞於活體外經歷進一步分析及選擇。經擴增免疫球蛋白序列可在活體外諸如藉由活體外親和力成熟法(諸如PCT公開案WO 97/29131及PCT公開案WO 00/56772中所述之方法)進一步操作。

3.使用轉殖基因動物製備抗前列腺素E₂單株抗體

在本發明之另一實施例中，藉由以PGE₂-載體蛋白結合物免疫包含一些或所有人類免疫球蛋白基因座之非人類動物來產生抗體。在一較佳實施例中，非人類動物為XENOMOUSE轉殖基因小鼠，其為包含人類免疫球蛋白基因座之大片段且缺乏小鼠抗體產生之經工程改造之小鼠品系。例如參見Green等人，*Nature Genetics* 7:13-21 (1994) 及美國專利 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598及6,130,364。亦參見1991年7月25日公開之WO 91/10741、1994年2月3日公開之WO 94/02602、1996年10月31日公開之WO 96/34096及WO 96/33735、1998年4月23日公開之WO 98/16654、1998年6月11日公開之WO 98/24893、1998年11月12日公開之WO 98/50433、1999年9月10日公開之WO 99/45031、1999年10月21日公開之WO 99/53049、2000年2月24日公開之WO 00 09560及2000年6月29日公開之WO 00/037504。XENOMOUSE轉殖基因小鼠產生完全人類抗體之類成年人類譜系且產生抗原特異性人類Mab。XENOMOUSE轉殖基因小鼠經由引入人類重鏈基因座及x輕鏈基因座之百萬鹼基(megabase)規模的生殖系構型YAC片段而含有人類抗體譜系之約80%。參見Mendez等人，*Nature Genetics* 15:146-156 (1997)，Green及Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)。

4.使用重組抗體文庫製備抗前列腺素E₂單株抗體

亦可使用活體外方法來製備本發明之抗體，其中篩選抗體文庫以鑑別具有所要結合特異性之抗體。該篩選重組抗體文庫之方法為此項技術中所熟知且包括例如以下文獻中所述之方法：Ladner等人，美國專利第5,223,409號；Kang等人，PCT公開案第WO 92/18619號；Dower等人，PCT公開案第WO 91/17271號；Winter等人，PCT公開案第WO 92/20791號；Markland等人，PCT公開案第WO 92/15679號；Breitling等人，PCT公開案第WO 93/01288號；McCafferty等人，PCT公開案第WO 92/01047號；Garrard等人，PCT公開案第WO 92/09690號；Fuchs等人，(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372；Hay等人，(1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85；Huse等人，(1989) *Science* 246:1275-1281；McCafferty等人，*Nature* (1990) 348:552-554；Griffiths等人，(1993) *EMBO J* 12:725-734；Hawkins等人，(1992) *J Mol Biol* 226:889-896；Clackson等人，(1991) *Nature* 352:624-628；Gram等人，(1992) *PNAS* 89:3576-3580；Garrard等人，(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377；Hoogenboom等人，(1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137；及Barbas等人，(1991) *PNAS* 88:7978-7982，美國專利申請公開案20030186374及PCT公開案第WO 97/29131號。

重組抗體文庫可來自以PGE₂-載體蛋白結合物免疫之個體。或者，重組抗體文庫可來自未處理個體(亦即未經PGE₂-載體蛋白結合物免疫之個體)，諸如來自未經PGE₂-

載體蛋白結合物免疫之人類個體的人類抗體文庫。藉由以包含PGE₂之藥劑篩選重組抗體文庫，藉此選擇識別PGE₂之彼等抗體來選擇本發明之抗體。進行該篩選及選擇之方法為此項技術中所熟知，諸如先前段落中之參考文獻中所述之方法。為選擇對PGE₂具有特定結合親和力之本發明抗體，諸如以特定k_{off}速率常數自PGE₂解離之抗體，可使用此項技術已知之表面電漿共振方法選擇具有所要k_{off}速率常數之抗體。為選擇對PGE₂具有特定中和活性之本發明抗體，諸如具有特定IC₅₀之抗體，可使用此項技術中已知之評估對PGE₂活性之抑制的標準方法。

舉例而言，亦可使用此項技術中已知的各種噬菌體呈現方法來產生本發明之抗體。在噬菌體呈現方法中，功能性抗體域呈現於攜帶其編碼聚核苷酸序列之噬菌體顆粒表面上。詳言之，可利用該噬菌體呈現由譜系或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用抗原(例如使用經標記抗原或結合或捕獲於固體表面或珠粒之抗原)來選擇或鑑別表現結合所關注抗原之抗原結合域的噬菌體。此等方法中所用之噬菌體通常為絲狀噬菌體，該噬菌體包括自具有Fab、Fv或二硫鍵穩定之Fv抗體域與噬菌體基因III或基因VIII蛋白質重組融合之噬菌體表現的fd及M13結合域。可用於製備本發明抗體之噬菌體呈現方法之實例包括以下文獻中揭示之方法：Brinkman等人，J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995)；Ames等人，J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995)；Kettleborough等人，Eur. J.

Immunol. 24:952-958 (1994); Persic等人, Gene 187 9-18 (1997); Burton等人, Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT申請案第PCT/GB91/01134號; PCT公開案WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 及美國專利第5,698,426號; 第5,223,409號; 第5,403,484號; 第5,580,717號; 第5,427,908號; 第5,750,753號; 第5,821,047號; 第5,571,698號; 第5,427,908號; 第5,516,637號; 第5,780,225號; 第5,658,727號; 第5,733,743號及第5,969,108號。

如上文參考文獻中所述, 在噬菌體選擇後, 可自噬菌體分離抗體編碼區且將其用於產生包括人類抗體之完整抗體或任何其他所要抗原結合片段, 且例如下文詳細描述, 使其於包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌之任何所要宿主中表現。舉例而言, 亦可使用此項技術中已知之方法採用重組產生Fab、Fab'及F(ab')₂片段之技術, 諸如PCT公開案WO 92/22324; Mullinax等人, BioTechniques 12(6):864-869 (1992); 及Sawai等人, AJRI 34:26-34 (1995); 及Better等人, Science 240:1041-1043 (1988)中揭示之方法。可用於產生單鏈Fv及抗體之技術的實例包括美國專利4,946,778及5,258,498; Huston等人, Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu等人, PNAS 90:7995-7999 (1993); 及Skerra等人, Science 240:1038-1040 (1988)中所述之技術。

可應用此項技術已知之篩選大型組合文庫之其他方法替代用噬菌體呈現篩選重組抗體文庫來鑑別本發明之雙重特異性抗體。一種類型之替代表現系統為如以下文獻中所述將重組抗體文庫表現為RNA-蛋白質融合體之表現系統：Szostak及Roberts之PCT公開案第WO 98/31700號，及Roberts, R.W.及Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302。在此系統中，在mRNA與其藉由活體外轉譯在3'端帶有嘌呤黴素(一種肽基受體抗生素)之合成mRNA而編碼之肽或蛋白質之間形成共價融合體。因此，可基於所編碼之肽或蛋白質(例如抗體或其部分)之特性(諸如抗體或其部分與雙重特異性抗原之結合)，自mRNA之複雜混合物(例如組合文庫)中富集特定mRNA。可藉由如上所述之重組方式(例如在哺乳動物宿主細胞中)表現自該等文庫篩選回收之編碼抗體或其部分之核酸序列，且此外，可藉由再進行幾輪已在最初選擇之序列中引入突變之mRNA-肽融合體的篩選或藉由如上所述使重組抗體活體外親和力成熟之其他方法使其經歷進一步親和力成熟。

在另一方法中，亦可使用此項技術中已知的酵母呈現方法產生本發明之抗體。在酵母呈現方法中，使用遺傳方法將抗體域繫栓於酵母細胞壁且使其在酵母表面上呈現。詳言之，可利用該酵母來呈現由譜系或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用於製備本發明抗體之酵母呈現方法的實例包括Wittrup等人之美國專利第6,699,658號中所揭示之方法。

5. 使用 PROfusion mRNA 呈現製備抗前列腺素 E₂ 單株抗體

PROfusion™ 技術為上文所述之 mRNA 呈現技術中的一種。PROfusion™ 技術可用於呈現與其編碼 DNA 序列偶合之人類抗體片段 (VH 或 VL 或 scFv) 以供針對各種抗原進行選擇。可用於製備本發明抗體之 mRNA 呈現方法之實例包括 Szostak 等人，美國專利第 6,207,446 號；第 6,214,553 號；及 Gold 等人，美國專利第 6,194,550 號及 Roberts, R.W. 及 Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302 中揭示之方法。在此系統中，在 mRNA 與其藉由活體外轉譯在 3' 端帶有嘌呤黴素 (一種肽基受體抗生素) 之合成 mRNA 而編碼之肽或蛋白質之間形成共價融合體。因此，可基於所編碼之肽或蛋白質 (例如抗體或其部分) 之特性 (諸如抗體或其部分與雙重特異性抗原之結合)，自 mRNA 之複雜混合物 (例如組合文庫) 中富集特定 mRNA。可藉由如上所述之重組方式 (例如在哺乳動物宿主細胞中) 表現自該等文庫篩選回收之編碼抗體或其部分之核酸序列，且此外，可藉由再進行幾輪已在最初選擇之序列中引入突變之 mRNA-肽融合體的篩選或藉由如上所述使重組抗體活體外親和力成熟之其他方法使其經歷進一步親和力成熟。

6. 抗前列腺素 E₂ 單株抗體之親和力成熟

活體外方法亦可用於本發明抗體之親和力成熟，其中藉由使用易錯 PCR 或合成組合寡核苷酸或寡核苷酸定向突變誘發在一初始抗體之 CDR 及 / 或構架中引入點突變來產生

突變誘發抗體文庫。接著可篩選突變誘發文庫以鑑別具有改良結合特異性之抗體。該篩選重組抗體文庫之方法為此項技術中所熟知且包括例如以下文獻中所述之方法：Ladner等人，美國專利第5,223,409號；Kang等人，PCT公開案第WO 92/18619號；Dower等人，PCT公開案第WO 91/17271號；Winter等人，PCT公開案第WO 92/20791號；Markland等人，PCT公開案第WO 92/15679號；Breitling等人，PCT公開案第WO 93/01288號；McCafferty等人，PCT公開案第WO 92/01047號；Garrard等人，PCT公開案第WO 92/09690號；Fuchs等人，(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372；Hay等人，(1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85；Huse等人，(1989) *Science* 246:1275-1281；McCafferty等人，*Nature* (1990) 348:552-554；Griffiths等人，(1993) *EMBO J* 12:725-734；Hawkins等人，(1992) *J Mol Biol* 226:889-896；Clackson等人，(1991) *Nature* 352:624-628；Gram等人，(1992) *PNAS* 89:3576-3580；Garrard等人，(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377；Hoogenboom等人，(1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137；及Barbas等人，(1991) *PNAS* 88:7978-7982，美國專利申請公開案20030186374及PCT公開案第WO 97/29131號。

進行該篩選及選擇之方法為此項技術中所熟知，諸如先前段落中之參考文獻中所述。為選擇對PGE₂具有特定結合親和力之本發明抗體，諸如以特定k_{off}速率常數自PGE₂解離之抗體，可使用此項技術已知之表面電漿共振方法選擇

具有所要 k_{off} 速率常數之抗體。為選擇對 PGE_2 具有特定中和活性之本發明抗體，諸如具有特定 IC_{50} 之抗體，可使用此項技術中已知之評估對 PGE_2 活性之抑制的標準方法。

舉例而言，亦可使用此項技術中已知之各種呈現方法使本發明抗體親和力成熟。在噬菌體呈現方法中，功能性抗體域呈現於攜帶其編碼聚核苷酸序列之噬菌體顆粒表面上。詳言之，可利用該噬菌體呈現由譜系或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用抗原(例如使用經標記抗原或結合或捕獲於固體表面或珠粒之抗原)來選擇或鑑別表現結合所關注抗原之抗原結合域的噬菌體。此等方法中所用之噬菌體通常為絲狀噬菌體，該噬菌體包括自具有Fab、Fv或二硫鍵穩定之Fv抗體域與噬菌體基因III或基因VIII蛋白質重組融合之噬菌體表現之fd及M13結合域。可用於製備本發明抗體之噬菌體呈現方法之實例包括以下文獻中揭示之方法：Brinkman等人，J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995)；Ames等人，J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995)；Kettleborough等人，Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994)；Persic等人，Gene 187 9-18 (1997)；Burton等人，Advances in Immunology 57:191-280 (1994)；PCT申請案第PCT/GB91/01134號；PCT公開案WO 90/02809；WO 91/10737；WO 92/01047；WO 92/18619；WO 93/11236；WO 95/15982；WO 95/20401；及美國專利第5,698,426號；第5,223,409號；第5,403,484號；第5,580,717號；第5,427,908號；第5,750,753號；第

5,821,047 號 ; 第 5,571,698 號 ; 第 5,427,908 號 ; 第 5,516,637 號 ; 第 5,780,225 號 ; 第 5,658,727 號 ; 第 5,733,743 號及第 5,969,108 號。

如上文參考文獻中所述，在噬菌體選擇後，可自噬菌體分離抗體編碼區且將其用於產生包括人類抗體之完整抗體或任何其他所要抗原結合片段，且例如下文詳細描述，使其於包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌之任何所要宿主中表現。舉例而言，亦可使用此項技術中已知之方法採用重組產生 Fab、Fab' 及 F(ab')₂ 片段之技術，諸如 PCT 公開案 WO 92/22324；Mullinax 等人，BioTechniques 12(6):864-869 (1992)；及 Sawai 等人，AJRI 34:26-34 (1995)；及 Better 等人，Science 240:1041-1043 (1988) 中揭示之方法。可用於產生單鏈 Fv 及抗體之技術的實例包括美國專利 4,946,778 及 5,258,498；Huston 等人，Methods in Enzymology 203:46-88 (1991)；Shu 等人，PNAS 90:7995-7999 (1993)；及 Skerra 等人，Science 240:1038-1040 (1988) 中所述之技術。

可應用此項技術中已知之篩選大型組合文庫之其他方法替代用噬菌體呈現篩選重組抗體文庫來鑑別本發明之雙重特異性抗體。一種類型之替代表現系統為如以下文獻中所述將重組抗體文庫表現為 RNA-蛋白質融合體之表現系統：Szostak 及 Roberts 之 PCT 公開案第 WO 98/31700 號，及 Roberts, R.W. 及 Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302。在此系統中，在 mRNA 與其藉由活

體外轉譯在3'端帶有嘌呤黴素(一種肽基受體抗生素)之合成mRNA而編碼之肽或蛋白質之間形成共價融合體。因此,可基於所編碼之肽或蛋白質(例如抗體或其部分)之特性(諸如抗體或其部分與雙重特異性抗原之結合),自mRNA之複雜混合物(例如組合文庫)中富集特定mRNA。可藉由如上所述之重組方式(例如在哺乳動物宿主細胞中)表現自該等文庫篩選回收之編碼抗體或其部分之核酸序列,且此外,可藉由再進行幾輪已在最初選擇之序列中引入突變之mRNA-肽融合體的篩選或由如上所述使重組抗體活體外親和力成熟之其他方法使其經歷進一步親和力成熟。

在另一方法中,可使用此項技術中已知之酵母呈現方法產生本發明抗體。在酵母呈現方法中,使用遺傳方法將抗體域繫栓於酵母細胞壁且使其在酵母表面上呈現。詳言之,可利用該酵母呈現由譜系或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用於製備本發明抗體之酵母呈現方法的實例包括 Wittrup 等人之美國專利第 6,699,658 號中所揭示之方法。

B. 產生重組前列腺素 E₂ 抗體

可藉由此項技術中已知之多種技術中之任一者產生本發明之抗體。舉例而言,自宿主細胞表現,其中藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。術語「轉染」之各種形式意欲涵蓋通常用於將外源DNA引入原核或真核宿主細胞中之多種技術,例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-聚葡萄糖轉染及其類似技術。儘管可能於原核

或真核宿主細胞中表現本發明之抗體，但較佳於真核細胞中表現抗體，且最佳於哺乳動物宿主細胞中表現，因為該等真核細胞(且尤其哺乳動物細胞)比原核細胞更有可能組裝及分泌適當摺疊且具免疫活性之抗體。

用於表現本發明重組抗體之較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括在 Urlaub 及 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 中描述之 dhfr-CHO 細胞，例如 R.J. Kaufman 及 P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621 中所述，與 DHFR 選擇標記一起使用)、NS0 骨髓瘤細胞、COS 細胞及 SP2 細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由培養宿主細胞歷時足以使抗體在宿主細胞中表現或更佳使抗體分泌至生長宿主細胞之培養基中的一段時間而產生抗體。可使用標準蛋白質純化方法自培養基回收抗體。

亦可使用宿主細胞產生功能性抗體片段，諸如 Fab 片段或 scFv 分子。應瞭解以上程序之變化在本發明範疇內。舉例而言，可能需要用編碼本發明抗體之輕鏈及/或重鏈之功能性片段的 DNA 轉染宿主細胞。亦可使用重組 DNA 技術來移除一些或所有編碼與所關注抗原結合不需要之輕鏈與重鏈中之任一者或兩者的 DNA。本發明抗體亦涵蓋由該等截短 DNA 分子表現之分子。此外，可藉由標準化學交聯方法使本發明抗體與第二抗體交聯來產生一重鏈及一輕鏈為本發明之抗體且另一重鏈及輕鏈對除所關注抗原以外之抗原具有特異性的雙功能抗體。

在本發明之抗體或其抗原結合部分之一較佳重組表現系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈及抗體輕鏈兩者之重組表現載體引入至 dhfr-CHO 細胞中。在重組表現載體中，抗體重鏈與輕鏈基因各自與 CMV 強化子/AdMLP 啟動子調控元件可操作性連接以驅動基因之高水準轉錄。重組表現載體亦攜有 DHFR 基因，其允許使用甲胺喋呤選擇/擴增來選擇已經該載體轉染之 CHO 細胞。培養所選擇之轉型體宿主細胞以允許表現抗體重鏈及輕鏈且自培養基回收完整抗體。使用標準分子生物學技術來製備重組表現載體、轉染宿主細胞、選擇轉型體、培養宿主細胞及自培養基回收抗體。本發明進一步提供藉由在合適培養基中培養本發明之宿主細胞直至本發明之重組抗體得以合成來合成本發明重組抗體之方法。該方法可進一步包含自培養基分離重組抗體。

產生抗前列腺素 E₂ 嵌合抗體

嵌合抗體為抗體之不同部分來源於不同動物物種之分子，諸如具有來源於鼠類單株抗體之可變區及人類免疫球蛋白恆定區之抗體。產生嵌合抗體之方法為此項技術中所已知且在實例 2.1 中詳細論述。例如參見 Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi 等人, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies 等人, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 美國專利第 5,807,715 號; 第 4,816,567 號及第 4,816,397 號。此外，可使用為藉由將來自具有適當抗原特異性之小鼠抗體分子之基因與來自具有適當生物活性之人類抗體分子之

基因拼接於一起來產生「嵌合抗體」而研發的技術 (Morrison等人，1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855； Neuberger等人，1984, Nature 312:604-608； Takeda等人，1985, Nature 314:452-454)。

在一實施例中，藉由用人類IgG1恆定區置換第1部分所述之鼠類單株抗PGE₂抗體之重鏈恆定區來產生本發明之嵌合抗體。在一特定實施例中，本發明之嵌合抗體包含含有 SEQ ID 60、62、64、66、68、70、72、74、76、78及80之胺基酸序列的重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)SEQ ID 61、63、65、67、69、71、73、75、77、79及81。

抗前列腺素E₂人類化抗體

人類化抗體為來源於結合所要抗原之非人類物種抗體的抗體分子，其具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之構架區。已知人類Ig序列揭示於例如 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi； www.atcc.org/phage/hdb.html； www.sciquest.com/； www.abcam.com/； www.antibodyresource.com/onlinecomp.html； www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html； www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html； www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm； www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html； www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/； www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html； www.antibodyresource.com/； mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno-logy.html www.immunologylink.com/；

pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html ; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/ ; www.pebio.com/pa/340913/340913.html ; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/ ; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html ; www.biodesign.com/table.asp ; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html ; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html ; www.isac-net.org/sites_geo.html ; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html ; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html ; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/ ; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html ; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html ; imgt.cnusc.fr:8104/ ; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html ; antibody.bath.ac.uk/ ; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html ; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html ; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/ ; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm ; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html ; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html ; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html ; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html ; www.jerini.de/frroducts.htm ; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)。該等輸入序列可用於降低免疫原性或降低、增加或改良結合、親和力、締合速率、解離速率、親和性、特異性、半衰期或如此項技術中已知之任何

其他合適特徵。

可用來自 CDR 供體抗體之相應殘基取代人類構架區中之構架殘基以改變、較佳改良抗原結合。此等構架取代係由此項技術中熟知之方法鑑別，例如藉由模擬 CDR 與構架殘基之相互作用以鑑別對抗原結合重要之構架殘基以及進行序列比較以鑑別特定位置之異常構架殘基。(例如參見 Queen 等人，美國專利第 5,585,089 號；Riechmann 等人，Nature 332:323 (1988))。三維免疫球蛋白模型普遍可得且為熟習此項技術者所熟悉。可獲得說明及顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。檢驗此等顯示准許分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中的可能作用，亦即，分析影響候選免疫球蛋白與其抗原結合之能力的殘基。以此方式，可自共同及輸入序列選擇及組合 FR 殘基以便達成所要之抗體特徵，諸如對目標抗原之親和力增加。一般而言，CDR 殘基直接且最大程度上參與影響抗原結合。可使用此項技術中已知之多種技術使抗體人類化，諸如(但不限於)Jones 等人，Nature 321:522 (1986)；Verhoeyen 等人，Science 239:1534 (1988))，Sims 等人，J. Immunol. 151: 2296 (1993)；Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)，Carter 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)；Presta 等人，J. Immunol. 151:2623 (1993)，Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)；Studnicka 等人，Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)；Roguska. 等人，PNAS 91:969-973 (1994)；PCT 公

開案 WO 91/09967、PCT/: US 98/16280、US 96/18978、US 91/09630、US 91/05939、US 94/01234、GB 89/01334、GB 91/01134、GB 92/01755；WO 90/14443、WO 90/14424、WO 90/14430、EP 229246、EP 592,106；EP 519,596、EP 239,400、美國專利第 5,565,332 號、第 5,723,323 號、第 5,976,862 號、第 5,824,514 號、第 5,817,483 號、第 5814476 號、第 5763192 號、第 5723323 號、第 5,766886 號、第 5,714,352 號、第 6,204,023 號、第 6,180,370 號、第 5,693,762 號、第 5,530,101 號、第 5,585,089 號、第 5,225,539 號；及第 4,816,567 號中所述之技術。

C. 抗體之產生及產生抗體之細胞株

較佳地，本發明之抗 PGE₂ 抗體展現較高的降低或中和 PGE₂ 活性之能力，例如如藉由此項技術中已知的若干活體外及活體內檢定中之任一者所評估(例如參見實例 1.1.C)。舉例而言，在 EP4 檢定中此等抗體以至少約 10⁻⁶ M、約 10⁻⁷ M、約 10⁻⁸ M、約 10⁻⁹ M、約 10⁻¹⁰ M、約 10⁻¹¹ M 或約 10⁻¹² M 範圍內之 IC₅₀ 值中和 PGE₂ 誘發之鈣流入。

在較佳實施例中，經分離抗體或其抗原結合部分結合 PGE₂，其中該抗體或其抗原結合部分如放射免疫檢定所測定以約 0.1 s⁻¹ 或更低之 k_{off} 速率常數自 PGE₂ 解離，或其以約 1×10⁻⁶ M 或更低之 IC₅₀ 抑制 PGE₂ 活性。或者，抗體或其抗原結合部分可如放射免疫檢定所測定以約 1×10⁻² s⁻¹ 或更低之 k_{off} 速率常數自 PGE₂ 解離，或可以約 1×10⁻⁷ M 或更低之

IC₅₀抑制PGE₂活性。或者，抗體或其抗原結合部分可如放射免疫檢定所測定以約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或更低之 k_{off} 速率常數自PGE₂解離，或可以約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 或更低之IC₅₀抑制PGE₂。或者，抗體或其抗原結合部分可如放射免疫檢定所測定以約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或更低之 k_{off} 速率常數自PGE₂解離，或可以約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 或更低之IC₅₀抑制PGE₂活性。或者，抗體或其抗原結合部分可如放射免疫檢定所測定以約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或更低之 k_{off} 速率常數自PGE₂解離，或可以約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 或更低之IC₅₀抑制PGE₂活性。或者，抗體或其抗原結合部分可如放射免疫檢定所測定以約 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 或更低之 k_{off} 速率常數自PGE₂解離，或可以約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 或更低之IC₅₀抑制PGE₂活性。

本發明之單株抗體阻斷PGE₂與EP1、EP2、EP3及EP4受體中之至少一者結合。細胞表面之基於FACS之受體結合檢定與³H標記之PGE₂結合檢定皆表明鼠類型式及人類化型式抗PGE₂皆能夠有效阻斷PGE₂與其受體之結合。本發明設想與人類化抗PGE₂抗體Hu2B5.7之Fab部分複合之PGE₂的晶體結構。

在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，諸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。較佳地，重鏈恆定區為IgG1重鏈恆定區或IgG4重鏈恆定區。此外，抗體可包含輕鏈恆定區：κ輕鏈恆定區或λ輕鏈恆定區。較佳地，抗體包含κ輕鏈恆定區。或者，抗體部分可為例如Fab片段或單鏈Fv片段。

用於改變抗體效應功能之Fc部分中胺基酸殘基的置換為此項技術中所已知(Winter等人，美國專利第5,648,260號；第5624821號)。抗體之Fc部分介導若干重要效應功能，例如細胞激素誘導、ADCC、吞噬作用、補體依賴性細胞毒性(CDC)以及抗體及抗原-抗體複合物之半衰期/清除率。視治療目標而定，在一些狀況下，此等效應功能為治療性抗體所需，但在其他狀況下可能並非必要或甚至有害。某些人類IgG同型(尤其IgG1及IgG3)分別經由與FcγR及補體C1q結合來介導ADCC及CDC。新生兒Fc受體(FcRn)為確定抗體循環半衰期的重要組份。在另一實施例中，置換抗體恆定區(例如抗體之Fc區)中的至少一個胺基酸殘基，以使得抗體之效應功能得以改變。在另一實施例中，Fc片段之活性可藉由使Fc部分之N連接型聚糖唾液酸化(例如經由與複合物上之次末半乳糖的2,6鍵聯，免疫球蛋白G(IgG)中Asn 297處存在之雙分支聚糖)而大大增強(Anthony, RM (2008) Science 320:373-376)。

一實施例提供本發明之抗體或抗體部分經衍生化或連接於另一功能分子(例如另一肽或蛋白質)的經標記結合蛋白。舉例而言，本發明之經標記結合蛋白可藉由將本發明之抗體或抗體部分與一或多個其他分子實體功能性連接(例如經由化學偶合、基因融合、非共價締合或其他方式)得到，該一或多個其他分子實體諸如另一抗體(例如雙特異性抗體或雙功能抗體)、可偵測劑、細胞毒性劑、醫藥劑及/或可介導抗體或抗體部分與另一分子(諸如抗生蛋白

鏈菌素核心區或聚組胺酸標籤)締合之蛋白質或肽。

可用來衍生本發明之抗體或抗體部分之適用可偵測劑包括螢光化合物。例示性螢光可偵測劑包括螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、5-二甲胺-1-萘磺醯氯、藻紅素及其類似物。亦可用諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶、葡萄糖氧化酶及其類似酶之可偵測酶衍生抗體。當用可偵測酶衍生抗體時，藉由添加酶用來產生可偵測反應產物之其他試劑對其加以偵測。舉例而言，當存在可偵測劑辣根過氧化酶時，添加過氧化氫及二胺基聯苯胺會產生可偵測之有色反應產物。亦可以生物素衍生抗體，且經由間接量測抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素結合來偵測。

本發明之另一實施例提供一種結晶化結合蛋白。本發明較佳係關於如本文所揭示之完整抗PGE₂抗體及其片段之晶體以及包含該等晶體之調配物及組合物。在一實施例中，結晶化結合蛋白具有比結合蛋白之可溶對應物高之活體內半衰期。在另一實施例中，結合蛋白在結晶化後保留生物活性。

本發明之結晶化結合蛋白可按照此項技術中已知及如WO 02072636中所揭示之方法產生。

本發明之另一實施例提供一種抗體或其抗原結合部分包含一或多個碳水化合物殘基之糖基化結合蛋白。新生活體內蛋白質產生可經歷稱為轉譯後修飾之進一步加工。詳言之，可酶促添加糖(糖基)殘基，一種稱為糖基化之過程。所得帶有共價連接之寡醣側鏈之蛋白質稱為糖基化蛋白質。

或醣蛋白。抗體為在Fc域以及可變域中具有一或多個碳水化合物殘基之醣蛋白。Fc域中之碳水化合物殘基對Fc域之效應功能具有重要影響，而對抗體之抗原結合或半衰期影響極小(R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), 第11-16頁)。相反，可變域之糖基化可對抗體之抗原結合活性產生影響。可變域中之糖基化可能由於位阻作用而對抗體結合親和力具有負面影響(Co, M.S.等人, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367)或導致對抗原之親和力增加(Wallick, S.C.等人, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A.等人, *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723)。

本發明之一態樣係針對產生結合蛋白之O連接型或N連接型糖基化位點已突變之糖基化位點突變體。熟習此項技術者可使用標準熟知技術產生該等突變體。保留生物活性但具有增加或減小之結合活性的糖基化位點突變體為本發明之其他目標。

在另一實施例中，本發明之抗體或抗原結合部分之糖基化經修飾。舉例而言，可製備去糖基化之抗體(亦即缺乏糖基化之抗體)。糖基化可經改變以例如增加抗體對抗原之親和力。該等碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列中之一或多個糖基化位點實現。舉例而言，可進行一或多個導致消除一或多個可變區糖基化位點從而消除該位點處之糖基化的胺基酸取代。該種糖基化可增加抗體對抗原之親和力。該種方法在PCT公開案WO 2003016466A2及美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中進一步詳細描述。

或者或另外，可製備具有改變之糖基化類型的本發明之經修飾抗體，諸如海藻糖基殘基之量減少的低海藻糖基化抗體或平分型GlcNac結構增加之抗體。已證明該等經改變之糖基化模式增強抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由例如使抗體在糖基化機構改變之宿主細胞中表現來實現。此項技術中已描述糖基化機構改變之細胞且其可用作表現本發明之重組抗體之宿主細胞，由此產生糖基化改變之抗體。例如參見Shields, R. L.等人，(2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740；Umana等人，(1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1以及歐洲專利第EP 1,176,195號；PCT公開案WO 03/035835；WO 99/54342 80。

蛋白質糖基化視所關注蛋白質之胺基酸序列以及表現該蛋白質之宿主細胞而定。不同生物體可產生不同糖基化酶(例如糖基轉移酶及糖苷酶)且具有不同的可利用受質(核苷酸糖)。由於該等因素，因此蛋白質糖基化模式及糖基殘基之組成可視表現特定蛋白質之宿主系統而不同。適用於本發明之糖基殘基可包括(但不限於)葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖、n-乙醯基葡糖胺及唾液酸。糖基化結合蛋白較佳包含糖基殘基以使得糖基化模式為人類的。

熟習此項技術者已知不同蛋白質糖基化可產生不同蛋白質特徵。舉例而言，在諸如酵母之微生物宿主中產生且利用酵母內源性途徑糖基化之治療性蛋白質的功效可比諸如CHO細胞株之哺乳動物細胞中表現之相同蛋白質的功效低。該等醣蛋白亦可能在人類中具有免疫原性且在投與後

展示降低之活體內半衰期。人類及其他動物中之特定受體可識別特定糖基殘基且促進自血流中快速清除蛋白質。其他不利作用可包括蛋白質摺疊、溶解性、對蛋白酶之敏感度、運輸、轉運、區室化、分泌、由其他蛋白質或因子識別、抗原性或過敏原性的改變。因此，從業人員可能偏好具有特定糖基化組成及模式(例如與人類細胞或預定個體動物之物種特異性細胞中所產生者相同或至少類似的糖基化組成及模式)之治療性蛋白質。

表現不同於宿主細胞之糖基化蛋白質的糖基化蛋白質可藉由遺傳修飾宿主細胞以表現異源糖基化酶來實現。使用此項技術中已知之技術，從業人員可產生展現人類蛋白質糖基化之抗體或其抗原結合部分。舉例而言，已對酵母菌株進行遺傳修飾以表現非天然存在之糖基化酶，以使得此等酵母菌株中所產生之糖基化蛋白質(亦即醣蛋白)展現與動物細胞(尤其人類細胞)之蛋白質糖基化相同的蛋白質糖基化(美國專利申請案20040018590及20020137134及PCT公開案WO 2005100584 A2)。

除結合蛋白外，本發明亦係針對對本發明之該等結合蛋白具有特異性之抗個體基因型(抗Id)抗體。抗Id抗體為識別通常與另一抗體之抗原結合區締合之獨特決定子的抗體。可藉由以結合蛋白或其含CDR之區域免疫動物來製備抗Id。經免疫動物將識別且應答免疫抗體之個體基因型決定子且產生抗Id抗體。抗Id抗體亦可用作在另一動物中誘發免疫反應之「免疫原」，從而產生所謂抗抗Id抗體。

此外，熟習此項技術者將瞭解可使用經遺傳工程改造以表現各種糖基化酶之宿主細胞文庫來表現所關注之蛋白質，以使得該文庫之成員宿主細胞產生具有變異糖基化模式之所關注蛋白質。從業人員隨後可選擇及分離具有特定新穎糖基化模式之所關注蛋白質。較佳地，具有經特定選擇之新穎糖基化模式之蛋白質展現改良或改變之生物特性。

D. 抗前列腺素E₂抗體之用途

鑒於本發明之抗PGE₂抗體或其部分與PGE₂結合之能力，其可用於使用諸如酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、放射免疫檢定(RIA)或組織免疫組織化學之習知免疫檢定偵測人類PGE₂(例如諸如血清或血漿之生物樣本中之PGE₂)。本發明提供一種偵測生物樣本中PGE₂之方法，其包含使生物樣本與本發明之抗體或抗體部分接觸且偵測與PGE₂結合之抗體(或抗體部分)或未結合抗體(或抗體部分)，由此偵測生物樣本中之PGE₂。抗體經可偵測物質直接或間接標記以便於偵測結合或未結合抗體。合適可偵測物質包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質及放射性物質。合適酶之實例包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；合適輔基複合物之實例包括抗生物素蛋白/生物素及抗生物素蛋白/生物素；合適螢光物質之實例包括傘酮(umbelliferone)、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹醯氯或藻紅素；發光物質之實例包括魯米諾(luminol)；且合適放射性物質之實例包括

^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{66}Ho 或 ^{153}Sm 。

作為標記抗體之替代方法，可在生物流體中藉由競爭免疫檢定利用經可偵測物質標記之 PGE_2 標準物及未經標記之抗 PGE_2 抗體來檢定 PGE_2 。在此檢定中，組合生物樣本、經標記 PGE_2 標準物及抗 PGE_2 抗體且測定與未標記抗體結合之經標記 PGE_2 標準物之量。生物樣本中 PGE_2 之量與同抗 PGE_2 抗體結合之經標記 PGE_2 標準物之量成反比。類似地，亦可在生物流體中藉由競爭免疫檢定利用經可偵測物質標記之 PGE_2 標準物及未經標記之抗 PGE_2 抗體來檢定 PGE_2 。

本發明之抗體及抗體部分較佳能夠在活體外及活體內中和 PGE_2 活性。因此，本發明之該等抗體及抗體部分可用於例如在含有 PGE_2 之細胞培養物中、在具有與本發明抗體交叉反應之 PGE_2 的人類個體或其它哺乳動物個體中抑制 PGE_2 活性。在一實施例中，本發明提供抑制 PGE_2 活性之方法，其包含使 PGE_2 與本發明之抗體或抗體部分接觸以使得 PGE_2 活性被抑制。舉例而言，在含有或懷疑含有 PGE_2 之細胞培養物中，可向培養基中添加本發明之抗體或抗體部分以抑制培養物中之 PGE_2 活性。

在另一實施例中，本發明提供一種降低個體、有利地罹患 PGE_2 活性有害之疾病或病症之個體中 PGE_2 活性之方法。本發明提供降低罹患該種疾病或病症之個體中 PGE_2 活性之方法，該方法包含向該個體投與本發明之抗體或抗體

部分以使得個體之PGE₂活性得以降低。較佳地，個體為人類個體。或者，個體可為表現能夠結合本發明抗體之PGE₂的哺乳動物。更進一步，個體可為已引入(例如藉由投與PGE₂或藉由表現PGE₂合成酶轉殖基因)PGE₂之哺乳動物。可出於治療目的向人類個體投與本發明抗體。此外，可將本發明抗體投與出於獸醫學目的或作為人類疾病之動物模型表現能夠與該抗體結合之PGE₂之非人類哺乳動物。就後種狀況而言，該等動物模型可用於評估本發明抗體之治療功效(例如測試投與劑量及時程)。

本文所用之術語「PGE₂活性有害之病症」意欲包括已證實罹患該病症之個體中存在PGE₂為或懷疑為造成該病症之病理生理的原因，或為造成該病症惡化之因素的疾病及其他病症。因此，PGE₂活性有害之病症為預期降低PGE₂活性會緩解病症之症狀及/或進展的病症。該等病症可表現為例如罹患該病症之個體的生物流體中PGE₂之濃度增加(例如個體之血清、血漿、滑液等中PGE₂之濃度增加)，其可例如使用如上文所述之抗PGE₂抗體來偵測。可用本發明抗體治療之病症的非限制性實例包括下文與本發明抗體之醫藥組合物相關之部分中所論述的彼等病症

已暗示PGE₂在引起與類風濕性關節炎相關之病理學反應中起關鍵作用。然而，關節炎中亦涉及不同免疫球蛋白路徑之其他介體，且除PGE₂之外阻斷此等介體亦可提供額外治療益處。因此，可將本發明之結合蛋白併入至DVD-IgTM蛋白質中，其中在DVD-IgTM中能夠結合目標對，該等目標

對包括(但不限於)PGE₂及促炎性細胞激素，諸如腫瘤壞死因子 α (TNF- α)。阻斷PGE₂及TNF- α 兩者可具有組合TNF- α 之DMARD作用且藉由阻斷PGE₂減輕疼痛之有益作用。在一較佳實施例中，本發明之DVD-IgTM結合目標PGE₂及TNF α 且用於治療類風濕性關節炎。

本發明之一態樣係關於包含能夠結合PGE₂之結合蛋白的DVD-IgTM結合蛋白。較佳地，DVD-IgTM結合蛋白能夠結合PGE₂及第二目標。第二目標係選自由以下組成之群：TNF、EGF、EGFR、IGF1、IGF2、IGF1/2、IGFR Erb2、Erb3、VEGF、VEGFR、Muc-1、CSF1(MCSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、FGF2、IFN γ 1、IFN γ 1、IFN γ 、組織胺及組織胺受體、IL-1 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 α 、IL-12 β 、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、KITLG、PDGFB、IL-2R α 、IL-4R、IL-5R α 、IL-8R α 、IL-8R β 、IL-12R β ,1、IL-12R β ,2、IL-18R1、TSLP、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL22、CCL24、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、XCL1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CX3CR1、GPR2、XCR1、FOS、GATA3、JAK1、JAK3、STAT6、TBX21、TGFB1、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBR及殼質酶。更佳地，DVD結合蛋白能夠識別PGE₂及TNF α 、PGE₂及IL-6、PGE₂及

IL-1 β 、PGE₂及IL-6R、PGE₂及CTLA-4、PGE₂及EGF、PGE₂及IGF-1/2、PGE₂及Erb2、PGE₂及Erb3、PGE₂及VEGF。最佳地，DVD結合蛋白能夠結合PGE₂及TNF α 。用於治療自體免疫疾病之較佳DVD-Ig包括(但不限於)含有抗PGE₂抗體及選自由以下組成之群之目標的DVD-Ig：TNF α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6或IL-6R、CTLA-4Ig、BAFF、TACI、RANKL，或DKK1或SOCT、MMP13，或MMP1或MMP4。較佳用於癌症療法之目標對包括PGE₂+EGF或EGFR、PGE₂+IGF1或IGF1R、PGE₂+IGF2或IGF2R、PGE₂+IGF1/2、PGE₂+VEGF或VEGFR、PGE₂+Erb2、PGE₂+Erb3及PGE₂+S1P。

已暗示PGE₂在引起與類風濕性關節炎或癌症相關之病理學反應中起關鍵作用。然而，關節炎或癌症中亦涉及不同免疫球蛋白路徑之其他介體，且除PGE₂之外阻斷此等介體亦可提供額外治療益處。目前用於治療各種人類疾病及病症之藥物的清單可在網際網路www.drugs.com獲得。此清單頻繁更新以反映各種人類疾病治療的技術現狀。抗PGE₂可與彼清單中之用於特定疾病病況之任何療法組合。下文提供一些實例。抗PGE₂可與一或多種用於治療類風濕性關節炎及青少年類風濕性關節炎之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)下文列出之藥劑，例如在減少異常滑膜組織(視於關節內部之組織)生長的同時減輕疼痛及發炎之藥物。此等藥物包括甲胺喋呤及低劑量皮質類固醇(諸如普賴蘇或皮質酮)。在某些人當中，此等藥物亦減少關節

損壞。用於治療類風濕性關節炎之其他藥物包括：抗瘧疾藥物(諸如羥基氯化奎寧)、金、柳氮磺胺吡啶、青黴胺、環磷醯胺、環孢素及二甲胺四環素。此外，可開立一種以上藥物的處方。目前可獲得阻斷特異性發炎因子(細胞激素)之作用的較新穎生物劑。英利昔單抗、依那西普及阿達木單抗阻斷細胞激素 $TNF\alpha$ 、阿巴西普阻斷T細胞共刺激、利妥昔單抗消耗B細胞、阿那白滯素阻斷細胞激素介白素-1，且其他新穎生物劑靶向IL-6、IL-6R、IL-17、IL-18、IL-23、B7.1/B7.2。抗 PGE_2 可與一或多種用於治療關節黏連性脊椎炎之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)皮質類固醇、細胞毒性藥物及最近使用之抗 $TNF\alpha$ 劑。抗 PGE_2 可與一或多種用於治療多發性硬化症之藥劑組合。此等藥劑之實例包括(但不限於)阿凡尼西、咪唑硫嘌呤、硫唑嘌呤、倍泰龍、布比普瑞、克帕松、扣托隆、格拉默、移護寧、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b溶液、凱普瑞、凱普瑞SP、米托蒽醌、那他珠單抗、那凡曲隆、奧拉普德、奧拉普德ODT、培地普德、普瑞傑特50、普瑞達闊50、普瑞達龍50、普瑞德特50、潑尼龍、普瑞隆、利比及泰沙比瑞。抗 PGE_2 可與一或多種www.drugs.com列出用於治療疼痛之藥劑或治療程序組合。抗 PGE_2 可與一或多種www.drugs.com列出用於治療克隆氏病之藥劑或治療程序組合。抗 PGE_2 可與一或多種www.drugs.com列出用於治療各種人類癌症及惡性疾病之藥劑或治療程序組合。

D. 醫藥組合物

本發明亦提供包含本發明之抗體或其抗原結合部分及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。包含本發明抗體之醫藥組合物係用於(但不限於)診斷、偵測或監測病症；預防、治療、控制或改善病症或其一或多種症狀；及/或研究。在一特定實施例中，醫藥組合物包含一或多種本發明抗體。在另一實施例中，醫藥組合物包含一或多種本發明抗體及除本發明抗體以外的一或多種用於治療PGE₂活性有害之病症的預防劑或治療劑。較佳地，已知預防劑或治療劑適用於或已用於或目前正用於預防、治療、控制或改善病症或其一或多種症狀。根據此等實施例，組合物可進一步包含載劑、稀釋劑或賦形劑。

本發明之抗體及抗體部分可併入適於向個體投與之醫藥組合物中。通常，醫藥組合物包含本發明之抗體或抗體部分及醫藥學上可接受之載劑。如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括在生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑及其類似物。醫藥學上可接受之載劑的實例包括水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物中之一或多者以及其組合。在許多狀況下，較佳在組合物中包括等張劑，例如糖、諸如甘露糖醇或山梨糖醇之多元醇，或氯化鈉。醫藥學上可接受之載劑可進一步包含少量輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其增強抗體或抗體部分之存放期或有效性。

各種傳遞系統為已知的且可用於投與一或多種本發明抗

體或一或多種本發明抗體與適用於預防、控制、治療或改善病症或其一或多種症狀之預防劑或治療劑之組合，例如囊封於脂質體、微粒、微膠囊中；能夠表現抗體或抗體片段之重組細胞；受體介導之胞飲作用(例如參見Wu及Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987))；構築作為反轉錄病毒或其他載體之部分之核酸等。投與本發明之預防劑或治療劑的方法包括(但不限於)非經腸投與(例如皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內及皮下)、硬膜外投與、腫瘤內投與及黏膜投與(例如鼻內及經口途徑)。此外，可例如藉由使用吸入器或噴霧器及具有氣霧劑之調配物採用肺部投藥。例如參見美國專利第6,019,968號；第5,985,320號；第5,985,309號；第5,934,272號；第5,874,064號；第5,855,913號；第5,290,540號及第4,880,078號；及PCT公開案第WO 92/19244號；第WO 97/32572號；第WO 97/44013號；第WO 98/31346號及第WO 99/66903號。在一實施例中，使用Alkermes AIR®肺部藥物傳遞技術(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)投與本發明之抗體、組合療法或本發明之組合物。在一特定實施例中，肌肉內、靜脈內、腫瘤內、經口、鼻內、肺部或皮下投與本發明之預防劑或治療劑。可藉由任何便利途徑，例如藉由輸注或快速注射、藉由經上皮或皮膚黏膜內層(例如口腔黏膜、直腸及腸黏膜等)吸收投與預防劑或治療劑且其可與其他生物活性劑一起投與。投藥可為全身性或局部投藥。

在一特定實施例中，可能需要向需要治療之區域局部投

與本發明之預防劑或治療劑。此可藉由例如局部輸注、注射或藉助於植入物(該植入物為多孔或非多孔材料，包括膜及基質，諸如橡膠膜(sialastic)、聚合物、纖維基質(例如 Tissuel®)或膠原蛋白基質)實現。在一實施例中，向個體之受影響區域局部投與有效量之一或多種本發明抗體以預防、治療、控制及/或改善病症或其症狀。在另一實施例中，向個體之受影響區域局部投與有效量之一或多種本發明抗體以及有效量之一或多種除本發明抗體以外的療法(例如一或多種預防劑或治療劑)以預防、治療、控制及/或改善病症或其一或多種症狀。

在另一實施例中，本發明之預防劑或治療劑可以控制釋放或持續釋放系統傳遞。在一實施例中，可使用泵來實現控制釋放或持續釋放(參見 Langer，同上文；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20；Buchwald等人，1980, Surgery 88:507；Saudek等人，1989, N. Engl. J. Med. 321:574)。在另一實施例中，可使用聚合材料來實現本發明療法之控制釋放或持續釋放(例如參見 Medical Applications of Controlled Release, Langer及 Wise(編)，CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen及 Ball(編)，Wiley, New York (1984)；Ranger及 Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61；亦參見 Levy等人，1985, Science 228:190；During等人，1989, Ann. Neurol. 25:351；Howard等人，1989, J.

Neurosurg. 7 1:105；美國專利第5,679,377號；美國專利第5,916,597號；美國專利第5,912,015號；美國專利第5,989,463號；美國專利第5,128,326號；PCT公開案第WO 99/15154號；及PCT公開案第WO 99/20253號)。持續釋放調配物中使用之聚合物的實例包括(但不限於)聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯基吡咯啉酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)及聚原酸酯。在一較佳實施例中，持續釋放調配物中使用之聚合物為惰性的、不含可浸出雜質、儲存穩定、無菌且生物可降解。在另一實施例中，控制或持續釋放系統可鄰近預防或治療目標放置，因此僅需要全身劑量之一部分(例如參見 Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 同上文，第2卷，第115-138頁(1984))。

控制釋放系統論述於 Langer 之回顧 (1990, Science 249:1527-1533) 中。可使用熟習此項技術者已知之任何技術製備包含一或多種本發明治療劑之持續釋放調配物。例如參見美國專利第4,526,938號、PCT公開案WO 91/05548、PCT公開案WO 96/20698、Ning等人，1996, 「Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel,」 Radiotherapy & Oncology 39:179-189、Song等人，1995,

「Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions,」 PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397、Cleek 等人，1997, 「Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application,」 Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 及 Lam 等人，1997, 「Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,」 Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760。

在一本發明組合物為編碼預防劑或治療劑之核酸的特定實施例中，可藉由將核酸構築為適當核酸表現載體之部分，且例如藉由使用逆轉錄病毒載體(參見美國專利第4,980,286號)或藉由直接注射或藉由使用微粒轟擊(例如基因槍；Biolistic, Dupont)或以脂質或細胞表面受體或轉染劑包覆，或藉由將其與已知進入核之同源盒樣肽連接投與(例如參見Joliot等人，1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)將其投與以使其變為在細胞內，來活體內投與核酸以促進其所編碼之預防劑或治療劑表現。或者，可將核酸引入胞內且藉由同源重組使其併入宿主細胞DNA中以供表現。

調配本發明之醫藥組合物使其與預定投藥途徑相容。投藥途徑之實例包括(但不限於)非經腸，例如靜脈內、皮內、皮下、經口、鼻內(例如吸入)、經皮(例如局部)、經黏膜；及直腸投藥。在一特定實施例中，組合物係根據常

規程序調配為適於靜脈內、皮下、肌肉內、經口、鼻內或局部投與人類之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之組合物為於無菌等張水性緩衝液中之溶液。需要時，組合物亦可包括增溶劑及局部麻醉劑(諸如利多卡因(lignocaine))以減輕注射部位之疼痛。

若欲局部投與本發明組合物，則組合物可調配為軟膏、乳膏、經皮貼片、洗劑、凝膠、洗髮精、噴霧劑、氣霧劑、溶液、乳液之形式或熟習此項技術者已知之其他形式。例如參見 Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms，第19版，Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。對於不可噴霧之局部劑型而言，通常採用包含與局部施用相容之載劑或一或多種賦形劑且動力黏度較佳大於水之黏稠至半固體或固體形式。合適調配物包括(但不限於)溶液、懸浮液、乳液、乳膏、軟膏、散劑、擦劑、油膏及其類似物，必要時將其滅菌或與影響諸如滲透壓之各種特性之助劑(例如防腐劑、穩定劑、濕潤劑、緩衝劑或鹽)混合。其他合適的局部劑型包括可噴霧之氣霧劑製劑，其中活性成分較佳與固體或液體惰性載劑組合，且以與加壓揮發性物質(例如氣體推進劑，諸如氟利昂(freon))之混合物形式封裝或封裝於塑料擠瓶(squeeze bottle)中。必要時，亦可向醫藥組合物及劑型中添加增濕劑或保濕劑。該等其他成分之實例為此項技術中所熟知。

若本發明方法包含鼻內投與組合物，則組合物可調配成

氣霧劑形式、噴霧劑、薄霧或滴劑形式。詳言之，根據本發明使用之預防劑或治療劑可使用合適推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合適氣體)以來自加壓包裝或噴霧器之氣霧劑噴霧呈現形式方便地傳遞。在加壓氣霧劑之狀況下，劑量單位可藉由提供閥門以傳遞計量之量來確定。可調配合含有化合物與諸如乳糖或澱粉之合適粉末基劑之粉末混合物的膠囊及藥筒(由例如明膠構成)用於吸入器或吹入器。

若本發明方法包含經口投藥，則組合物可調配為錠劑、膠囊、扁膠劑、凝膠藥丸(gelcap)、溶液、懸浮液及其類似物之形式。錠劑或膠囊可藉由習知方式用醫藥學上可接受之賦形劑製備，該等賦形劑諸如黏合劑(例如預膠凝化玉米澱粉、聚乙烯吡咯啶酮或羥丙基甲基纖維素)；填充劑(例如乳糖、微晶纖維素或磷酸氫鈣)；潤滑劑(例如硬脂酸鎂、滑石或矽石)；崩解劑(例如馬鈴薯澱粉或乙醇酸澱粉鈉)；或濕潤劑(例如十二烷基硫酸鈉)。錠劑可藉由此項技術中熟知之方法塗覆。用於經口投藥之液體製劑可為例如(但不限於)溶液、糖漿或懸浮液形式，或其可以在使用前以水或其他合適媒劑復原之無水產物形式提供。該等液體製劑可藉由習知方式用醫藥學上可接受之添加劑來製備，該等添加劑諸如懸浮劑(例如山梨糖醇糖漿、纖維素衍生物或氫化可食用脂肪)；乳化劑(例如卵磷脂或阿拉伯膠)；非水性媒劑(例如杏仁油、油性酯、乙醇或經分餾之植物油)；及防腐劑(例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲

酸丙酯或山梨酸)。適當時製劑亦可含有緩衝鹽、調味劑、著色劑及甜味劑。經口投與之製劑可經適當調配以供緩慢釋放、控制釋放或持續釋放預防劑或治療劑。

本發明方法可包含例如藉由使用吸入器或噴霧器肺部投與與氣霧劑一起調配之組合物。例如參見美國專利第 6,019,968 號；第 5,985,320 號；第 5,985,309 號；第 5,934,272 號；第 5,874,064 號；第 5,855,913 號；第 5,290,540 號及第 4,880,078 號；及 PCT 公開案第 WO 92/19244 號；第 WO 97/32572 號；第 WO 97/44013 號；第 WO 98/31346 號及第 WO 99/66903 號。在一特定實施例中，使用 Alkermes AIR® 肺部藥物傳遞技術(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)投與本發明抗體、組合療法及/或本發明組合物。

本發明方法可包含藉由注射(例如藉由快速注射或連續輸注)投與經調配用於非經腸投與之組合物。用於注射之調配物可以添加有防腐劑之單位劑型(例如於安瓿中或於多劑量容器中)提供。組合物可採用諸如於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。或者，活性成分可為在使用前以合適媒劑(例如無菌無熱原質水)復原之粉末形式。

本發明方法可另外包含投與調配為儲槽式製劑之組合物。該等長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內)或藉由肌肉內注射來投與。因此，例如，組合物可以合適聚合或疏水性物質(例如調配為可接受之油中之乳液)或離子交

換樹脂或微溶衍生物(例如調配為微溶鹽)調配。

本發明方法涵蓋投與調配為中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽包括與陰離子形成之鹽，諸如衍生自鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等之鹽；及與陽離子形成之鹽，諸如衍生自氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因等之鹽。

一般而言，組合物之成分單獨或以混合在一起之單位劑型(例如以乾燥凍乾粉末或無水濃縮物形式)於指示活性劑之量之密封容器(諸如安瓿或藥囊)中提供。當投藥模式為輸注時，組合物可以含有無菌醫藥級水或鹽水之輸液瓶分配。當投藥模式為注射時，可提供注射用無菌水或鹽水之安瓿以便可在投藥之前混合成分。

詳言之，本發明亦規定本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物封裝於指示藥劑之量之密封容器(諸如安瓿或藥囊)中。在一實施例中，本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物係以乾燥無菌凍乾粉末或無水濃縮物形式於密封容器中提供且其可復原(例如用水或鹽水)成適當濃度以向個體投與。較佳地，本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物係以密封容器中之乾燥無菌凍乾粉末形式提供，其單位劑量為至少 5 mg，更佳至少 10 mg、至少 15 mg、至少 25 mg、至少 35 mg、至少 45 mg、至少 50 mg、至少 75 mg 或至少 100 mg。本發明之凍乾預防劑或治療劑或醫藥組合物應在其初始容器中於 2°C 與 8°C 之

間儲存，且本發明之預防劑或治療劑或醫藥組合物應在復原後1週內，較佳5天內、72小時內、48小時內、24小時內、12小時內、6小時內、5小時內、3小時內或1小時內投與。在一替代性實施例中，本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物係以液體形式於指示藥劑之量及濃度的密封容器中提供。較佳地，所投與組合物之液體形式係以至少0.25 mg/ml，更佳至少0.5 mg/ml、至少1 mg/ml、至少2.5 mg/ml、至少5 mg/ml、至少8 mg/ml、至少10 mg/ml、至少15 mg/kg、至少25 mg/ml、至少50 mg/ml、至少75 mg/ml或至少100 mg/ml於密封容器中提供。液體形式應在2°C與8°C之間於其初始容器中儲存。

本發明之抗體及抗體部分可併入適於非經腸投藥之醫藥組合物中。抗體或抗體部分較佳將製備為含有0.1-250 mg/ml抗體之可注射溶液。可注射溶液可由燧石或琥珀色小瓶、安瓿或預填充注射器中之液體或凍乾劑型構成。緩衝劑可為L-組胺酸(1-50 mM)，最佳5-10 mM，pH值為5.0至7.0(最佳為pH 6.0)。其他合適緩衝劑包括(但不限於)丁二酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀。可使用濃度為0-300 mM之氯化鈉來調節溶液毒性(對於液體劑型而言最佳為150 mM)。對於凍乾劑型而言可包括低溫保護劑，主要為0-10%蔗糖(最佳為0.5%-1.0%)。其他合適低溫保護劑包括海藻糖及乳糖。對於凍乾劑型而言可包括增積劑，主要為1%-10%甘露糖醇(最佳為2%-4%)。液體與凍乾劑型中均可使用穩定劑，主要為1-50 mM L-甲硫胺酸(最佳為5-10

mM)。其他合適增積劑包括甘胺酸、精胺酸，其可以0-0.05%聚山梨醇酯-80(最佳為0.005%-0.01%)之形式包括。其他界面活性劑包括(但不限於)聚山梨醇酯20及BRIJ界面活性劑。製備成用於非經腸投藥之可注射溶液的包含本發明之抗體及抗體部分的醫藥組合物可進一步包含適用作佐劑之藥劑，諸如用於增加治療性蛋白質(例如抗體)之吸收或分散的藥劑。尤其適用之佐劑為玻尿酸酶，諸如Hylenex®(重組人類玻尿酸酶)。在可注射溶液中添加玻尿酸酶在非經腸投藥後，尤其皮下投藥後提高人類生物可用性。其亦允許較高注射部位體積(亦即大於1 ml)以及較少疼痛及不適，及最低注射部位反應發生率(參見WO 2004078140及US 2006104968)。

本發明組合物可呈多種形式。此等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射溶液及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體及栓劑。較佳形式視投藥及治療應用之預定模式而定。典型較佳組合物為可注射或可輸注溶液形式，諸如類似於彼等用於以其他抗體被動免疫人類之組合物的組合物。較佳投藥模式為非經腸(例如靜脈內、皮下、腹膜內、肌肉內)模式。在一較佳實施例中，藉由靜脈內輸注或注射來投與抗體。在另一較佳實施例中，抗體係藉由肌肉內或皮下注射投與。

治療組合物在製造及儲存條件下通常須無菌且穩定。組合物可調配為溶液、微乳液、分散液、脂質體或適於高藥

物濃度之其他有序結構。可藉由將所要量之活性化合物(亦即抗體或抗體部分)連同上文列舉之成分中之一者或該等成分之組合併入適當溶劑中，接著根據需要過濾滅菌，來製備無菌可注射溶液。一般而言，藉由將活性化合物併入含有基礎分散介質及來自上文所列舉之成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在使用無菌凍乾粉末製備無菌可注射溶液之狀況下，較佳製備方法為真空乾燥及噴霧乾燥，其產生活性成分加來自其先前無菌過濾之溶液的任何其他所要成分之粉末。可例如藉由使用諸如卵磷脂之衣料，藉由保持所需粒徑(在分散液狀況下)，及藉由使用界面活性劑來保持溶液之適當流動性。可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中包括延緩吸收之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來達成。

可藉由此項技術中已知之多種方法投與本發明之抗體及抗體部分，不過對於許多治療應用而言，較佳投藥途徑/模式為皮下注射、靜脈內注射或輸注。如熟習此項技術者所應瞭解，投藥途徑及/或模式將視所要結果而變化。在某些實施例中，可用防止化合物快速釋放之載劑來製備活性化合物，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微膠囊傳遞系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法均已取得專利權或通常為熟習技術者所已知。例如參見 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R.

Robinson編，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

在某些實施例中，本發明之抗體或抗體部分可例如與惰性稀釋劑或可同化之可食用載劑一同經口投與。化合物(必要時連同其他成分)亦可囊封於硬質或軟質明膠膠囊中，壓製為錠劑或直接併入至個體飲食中。對於經口治療性投與而言，化合物可併有賦形劑且以如下形式使用：可攝入錠劑、經頰錠劑、糖衣錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑(wafer)及其類似形式。為了藉由非經腸投藥之外的方式投與本發明化合物，可能需要將化合物以防止其失活之材料塗覆或將化合物與防止其失活之材料共同投與。

補充活性化合物亦可併入組合物中。在某些實施例中，將本發明之抗體或抗體部分與一或多種適用於治療PGE₂活性有害之病症的其他治療劑共調配及/或共投與。舉例而言，可將本發明之抗PGE₂抗體或抗體部分與一或多種結合其他目標之其他抗體(例如結合其他細胞激素或結合細胞表面分子之抗體)共調配及/或共投與。此外，本發明之一或多種抗體可與兩種或兩種以上上述治療劑組合使用。該等組合療法可有利地利用較低劑量之所投與治療劑，因此避免與各種單一療法相關之可能毒性或併發症。

在某些實施例中，將針對PGE₂之抗體或其片段與此項技術中已知的延長半衰期之媒介連接。該等媒介包括(但不限於)Fc域、聚乙二醇及聚葡萄糖。該等媒介描述於例如美國申請案第09/428,082號及公開之PCT申請案第WO

99/25044號中。

在一特定實施例中，藉助於基因療法投與包含編碼本發明抗體或本發明之另一預防劑或治療劑的核苷酸序列之核酸序列以治療、預防、控制或改善病症或其一或多種症狀。基因療法係指藉由向個體投與已表現或可表現之核酸執行之療法。在本發明之此實施例中，核酸產生介導預防或治療作用之其所編碼之本發明之抗體或預防劑或治療劑。

可根據本發明使用此項技術中可利用之用於基因療法的任何方法。基因療法之方法的一般回顧參見 Goldspiel 等人，1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505；Wu及Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95；Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596；Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993)；及Morgan及Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217；May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215。重組DNA技術之所屬領域中通常已知的可使用之方法描述於Ausubel等人(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993)；及Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)中。基因療法之各種方法的詳細描述揭示於US 20050042664 A1中。

在另一態樣中，本申請案特徵為在個體中治療(例如治療、抑制、改善、延遲或預防發作或預防重現或復發)或預防PGE₂相關病症之方法。該方法包括：以足以治療或預

防PGE₂相關病症之量向個體投與PGE₂結合劑(尤其拮抗劑)，例如如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段。PGE₂拮抗劑(例如抗PGE₂抗體或其片段)可如本文所述單獨或與其他治療方式組合向個體投與。

本發明提供治療個體之發炎性病症及免疫病症之方法，該等病症特徵為過量PGE₂生物合成，該等方法包含向個體投與有效量之對PGE₂具特異性的抗體。可藉由本發明方法治療之病症包括涉及過量PGE₂合成的自體免疫及發炎性疾病及腫瘤。該等病症包括：(a)類風濕性及過敏性關節炎；(b)某些由病毒誘發之疾病，諸如格-巴二氏症候群、感染性單核白血球增多症、其他病毒性淋巴腺病及疱疹病毒感染；(c)多發性硬化症及其他脫髓鞘疾病；(d)血液病，諸如溶血性貧血及血小板減少症；(e)內分泌病症，諸如糖尿病、艾迪森氏病、特發性副甲狀腺低能症及慢性淋巴細胞性甲狀腺炎；(f)膠原蛋白病變，諸如全身性紅斑狼瘡症；及(g)生殖病症，諸如閉經、不孕症、反覆性流產及驚厥；及(h)腫瘤，諸如頭頸部腫瘤、肺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌等，及(i)皮膚、胃腸器官之發炎及/或自體免疫病狀(例如發炎性腸病(IBD)，諸如潰瘍性結腸炎及/或克隆氏病)；及(j)與骨關節炎及其他病症相關之疼痛；及(k)眼病，諸如年齡相關之黃斑變性(AMD)。因此，揭示內容包括PGE₂結合劑(諸如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段)用於本文所述之治療的用途及PGE₂結合劑(諸如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段)用於製備用以本文所述之治療的藥物

的用途。

PGE₂相關病症之實例包括(但不限於)選自由以下組成之群的病症：關節炎、類風濕性關節炎、骨關節炎、青少年慢性關節炎、膿毒性關節炎、萊姆關節炎、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑狼瘡症、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、發炎性腸病、胰島素依賴性糖尿病、甲狀腺炎、哮喘、過敏性疾病、牛皮癬、皮膚炎性硬皮病、異位性皮膚炎、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反應、與器官移植有關之急性或慢性免疫疾病、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、散播性血管內凝血、川崎氏病、格雷夫氏病、腎病症候群、慢性疲勞症候群、華格納氏肉芽病、亨諾-絲奇恩賴紫癍、腎臟之微觀脈管炎、慢性活動型肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、中毒性休克症候群、膿毒病症候群、惡病質、感染性疾病、寄生蟲病、後天免疫缺乏症候群、急性橫貫性脊髓炎、亨廷頓氏舞蹈病、帕金森氏病、阿茲海默氏病、中風、原發性膽汁性肝硬化、溶血性貧血、惡性疾病、心臟衰竭、心肌梗塞、艾迪森氏病、偶發性I型多腺低減及II型多腺低減、史密特氏症候群、成人(急性)呼吸窘迫症候群、禿頭症、斑禿、血清陰性關節病、關節病、萊特爾氏病、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸炎性關節病、腸病性滑膜炎、披衣菌、耶氏桿菌及沙門氏菌相關之關節病、脊椎關節病、動脈粥樣化病/動脈硬化症、特異體質過敏症、自體免疫性水皰病、尋常天庖瘡、落葉狀天庖瘡、類天庖瘡、線狀IgA病、自體免疫

性溶血性貧血、庫氏試驗陽性溶血性貧血、後天惡性貧血、青少年惡性貧血、肌痛性腦炎/皇家自由病、慢性皮膚黏膜念珠菌病、巨細胞動脈炎、原發性硬化性肝炎、隱源性自體免疫性肝炎、後天免疫缺乏疾病症候群、後天免疫缺乏相關疾病、B型肝炎、C型肝炎、普通易變型免疫缺乏(普通易變型低丙球蛋白血症)、擴張性心肌病、女子不孕症、卵巢功能衰竭、卵巢早衰、纖維化肺病、隱源性致纖維性肺泡炎、發炎後間質性肺病、間質性肺炎、結締組織病相關之間質性肺病、混合結締組織病相關之肺病、全身性硬化症相關之間質性肺病、類風濕性關節炎相關之間質性肺病、全身性紅斑狼瘡症相關之肺病、皮膚炎/多肌炎相關之肺病、休格連氏病相關之肺病、關節黏連性脊椎炎相關之肺病、脈管炎性彌漫性肺病、血黃素沈積症相關之肺病、藥物誘發之間質性肺病、纖維化、放射性纖維化、閉塞性細支氣管炎、慢性嗜伊紅血球性肺炎、淋巴細胞浸潤性肺病、感染後間質性肺病、痛風性關節炎、自體免疫性肝炎、1型自體免疫性肝炎(經典自體免疫或類狼瘡性肝炎)、2型自體免疫性肝炎(抗LKM抗體肝炎)、自體免疫介導之低血糖症、B型胰島素抗性伴發黑色棘皮病、副甲狀腺低能症、與器官移植有關之急性免疫疾病、與器官移植有關之慢性免疫疾病、非炎性骨關節病、原發性硬化性膽管炎、1型牛皮癬、2型牛皮癬、特發性白血球減少病、自體免疫性嗜中性球減少症、腎病NOS、腎小球腎炎、腎臟之微觀脈管炎、萊姆病、盤狀紅斑狼瘡、特發性

男性不孕症或NOS、精子自體免疫、多發性硬化症(所有次型)、交感性眼炎、結締組織病繼發之肺性高血壓、古巴士德氏症候群、結節性多動脈炎之肺部表現、急性風濕熱、類風濕性脊椎炎、斯蒂爾病、全身性硬化症、休格連氏症候群、高安氏病/動脈炎、自體免疫性血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進症、甲狀腺腫性自體免疫性甲狀腺低能症(橋本氏病)、萎縮性自體免疫性甲狀腺低能症、原發性黏液水腫、晶狀體源性葡萄膜炎、原發性脈管炎、白斑病急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精誘發之肝損傷、膽汁淤積、特質性肝病、藥物誘發之肝炎、非酒精性脂肪變性肝炎、過敏症及哮喘、B族鏈球菌(GBS)感染、精神障礙(例如抑鬱症及精神分裂症)、Th2型及Th1型介導之疾病、急性及慢性疼痛(不同形式之疼痛)及癌症，諸如肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌及直腸癌及造血系統惡性疾病(白血病及淋巴瘤)、無 β 脂蛋白血症、手足發紺、急性及慢性寄生或感染過程、急性白血病、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、急性或慢性細菌感染、急性胰腺炎、急性腎衰竭、腺癌、心房異位搏動、AIDS癡呆複合症、酒精誘發之肝炎、過敏性結膜炎、過敏性接觸性皮膚炎、過敏性鼻炎、同種異體移植排斥反應、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、肌肉萎縮性側索硬化、貧血、心絞痛、前角細胞退化、抗cd3療法、抗磷脂症候群、抗受體過敏反應、主動脈及周圍動

脈瘤、主動脈剝離、動脈性高血壓、動脈硬化症、動靜脈
痛、共濟失調、心房微顫(持續性或陣發性)、心房撲動、
房室傳導阻滯、B細胞淋巴瘤、骨移植物排斥反應、骨髓
移植(BMT)排斥反應、束枝傳導阻滯、伯基特淋巴瘤、燒
傷、心律不整、心臟頓抑症候群、心臟腫瘤、心肌病、心
肺分流發炎反應、軟骨移植排斥反應、小腦皮質退化、小
腦病症、紊亂性或多源性房性心動過速、與化學療法有關
之病症、慢性髓細胞白血病(CML)、慢性酒精中毒、慢性
發炎性病變、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性阻塞性
肺病(COPD)、慢性水楊酸中毒、結腸直腸癌、充血性心
臟衰竭、結膜炎、接觸性皮膚炎、肺原性心臟病、冠狀動
脈疾病、庫賈氏病、培養物陰性敗血症、囊腫性纖維化、
細胞激素療法相關之病症、拳擊員癡呆、脫髓鞘疾病、登
革出血熱、皮膚炎、皮膚病病狀、糖尿病、糖尿病性動脈
硬化病、泛發性路易體疾病、擴張型充血性心肌病、基底
神經節病症、中年唐氏症候群、由阻斷CNS多巴胺受體之
藥物誘發的藥物誘發之運動障礙、藥物敏感、濕疹、腦脊
髓炎、心內膜炎、內分泌病、會厭炎、EB病毒感染、肢端
紅痛症、錐體外及小腦病症、家族性噬血性淋巴組織細胞
增生症、胚胎胸腺移植排斥反應、弗立特里希氏共濟失
調、功能性周圍動脈病症、真菌性敗血症、氣性壞疽、胃
潰瘍、腎小球腎炎、任何器官或組織的移植物排斥反應、
革蘭氏陰性敗血症、革蘭氏陽性敗血症、胞內生物體引起
之肉芽腫、毛細胞白血病、哈勒沃登-施帕茨病、喬本氏

甲狀腺炎、花粉熱、心臟移植排斥反應、血色素沈著症、血液透析、溶血性尿毒癥候群/溶栓性血小板減少性紫癍、出血、肝炎(A)、希氏束心律不整、HIV感染/HIV神經病、霍奇金病、運動過度病症、過敏反應、過敏性肺炎、高血壓、運動功能減退病症、下丘腦-垂體-腎上腺軸評估、特發性艾迪森氏病、特發性肺纖維化、抗體介導之細胞毒性、無力、嬰兒脊髓性肌萎縮症、主動脈發炎、a型流感、電離輻射曝露、虹膜睫狀體炎/葡萄膜炎/視神經炎、缺血再灌注損傷、缺血性中風、青少年類風濕性關節炎、青少年脊髓性肌萎縮症、卡波西氏肉瘤、腎臟移植排斥反應、退伍軍人桿菌、利什曼體病、麻風病、皮質脊髓系統病變、脂性水腫、肝移植排斥反應、淋巴水腫、瘧疾、惡性淋巴瘤、惡性組織球病、惡性黑素瘤、腦膜炎、腦膜炎球菌血症、代謝性/特發性偏頭痛、粒線體複合系統病症、混合結締組織病、單株球蛋白症、多發性骨髓瘤、多系統退化(Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager and Machado-Joseph)、重症肌無力、胞內鳥型分枝桿菌、結核分枝桿菌、骨髓發育不良症候群、心肌梗塞、心肌缺血病症、鼻咽癌、新生兒慢性肺病、腎炎、腎病、神經退化性疾病、I型神經性肌肉萎縮、中性白血球減少性發熱、非霍奇金淋巴瘤、腹主動脈及其分支堵塞、阻塞性動脈病症、okt3療法、睪丸炎/副睪丸炎、睪丸炎/輸精管切除逆轉程序、內臟增大、骨質疏鬆症、胰腺移植排斥反應、胰腺癌、腫瘤相關症候群/惡性高血鈣症、副甲狀腺移植排

斥反應、盆腔發炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、周圍動脈粥樣硬化疾病、周圍血管疾病、腹膜炎、惡性貧血、卡氏肺囊蟲肺炎、肺炎、POEMS症候群(多發性神經病、內臟增大、內分泌病、單株球蛋白症及換膚症候群)、灌注後症候群、泵後症候群、MI心切開術後症候群、先兆驚厥、進行性核上性麻痺、原發性肺性高血壓、放射療法、雷諾現象及疾病、雷諾病、雷夫蘇姆氏病、規則狹窄QRS心動過速、腎血管性高血壓、再灌注損傷、限制型心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、路易體型老年癡呆、血清陰性關節病、休克、鐮形細胞性貧血、皮膚同種異體移植排斥反應、換膚症候群、小腸移植排斥反應、實體腫瘤、特異性心律不整、脊髓性共濟失調、脊髓小腦退化、鏈球菌肌炎、小腦結構病變、亞急性硬化泛腦炎、昏厥、心血管系統梅毒、全身性過敏、全身性發炎反應症候群、全身發作型青少年類風濕性關節炎、T細胞或FAB ALL、毛細管擴張、血栓閉塞性血管炎、血小板減少症、中毒、移植、外傷/出血、III型過敏反應、IV型過敏、不穩定型心絞痛、尿毒癥、尿膿毒病、蕁麻疹、心臟瓣膜病、靜脈曲張、脈管炎、靜脈疾病、靜脈栓塞、心室纖維性顫動、病毒及真菌感染、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎、病毒相關之噬血症候群、韋尼克-科爾薩科夫症候群、威爾遜氏病、任何器官或組織的異種移植物排斥反應、急性冠狀動脈症候群、急性特發性多發性神經炎、急性發炎性脫髓鞘性多神經根神經病、急性缺血、成人斯蒂爾病、斑禿、過

敏症、磷脂抗磷脂抗體症候群、再生不全性貧血、動脈硬化症、特應性濕疹、異位性皮膚炎、自體免疫性皮膚炎、與鏈球菌感染有關之自體免疫病症、自體免疫性腸病、自體免疫性聽力損失、自身免疫性淋巴增生性症候群(ALPS)、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢早衰、睪丸炎、支氣管擴張、大皰性類天疱瘡、心血管疾病、磷脂炎、難性抗磷脂症候群、乳糜瀉、頸椎關節黏連、慢性缺血、癍痕性類天疱瘡、具有多發性硬化症風險之臨床孤立症候群(CIS)、結膜炎、兒童期初發型精神異常、慢性阻塞性肺病(COPD)、淚囊炎、皮膚炎、糖尿病性視網膜病變、糖尿病、椎間盤突出症、盤脫垂、藥物誘發之免疫性溶血性貧血、心內膜炎、子宮內膜異位、眼內炎、上鞏膜炎、多形性紅斑、重症多形性紅斑、妊娠期類天疱瘡、格-巴二氏症候群(GBS)、花粉熱、休斯症候群、特發性帕金森氏病、特發性間質性肺炎、IgE介導之過敏症、免疫性溶血性貧血、包涵體肌炎、感染性眼部發炎疾病、發炎性脫髓鞘疾病、發炎性心臟病、發炎性腎病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、乾眼症、庫斯病或庫斯-麥爾病、蘭德里麻痺、朗格漢氏細胞組織球病、網狀青斑、黃斑變性、顯微性多血管炎、白赫鐵列夫症、運動神經元病症、黏膜類天疱瘡、多器官衰竭、重症肌無力、骨髓發育不良症候群、心肌炎、神經根病症、神經病、非A非B型肝炎、視神經炎、骨質溶解、少關節型青少年類風濕性關節炎、周圍動脈閉塞性疾病(PAOD)、周圍血管疾病(PVD)、周圍動脈疾

病(PAD)、靜脈炎、結節性多動脈炎(或結節性動脈周圍炎)、多軟骨炎、風濕性多肌痛、白髮症、多關節型JRA、多發性內分泌缺乏症候群、多發性肌炎、風濕性多肌痛(PMR)、泵後症候群、原發性帕金森氏症、前列腺炎、純紅細胞發育不全、原發性腎上腺機能不全、復發性視神經脊髓炎、再狹窄、風濕性心臟病、SAPHO(滑膜炎、瘰癧、膿皰病、骨肥厚及骨炎)、硬皮病、繼發性澱粉樣變性病、休克肺、鞏膜炎、坐骨神經痛、繼發性腎上腺機能不全、聚矽氧相關之結締組織疾病、角層下膿皰性皮膚病、關節黏連性脊椎炎、帝文生氏-強生症候群(SJS)、全身性發炎反應症候群、顛動脈炎、弓形蟲性視網膜炎、中毒性表皮壞死溶解、橫貫性脊髓炎、TRAPS(腫瘤壞死因子受體、I型過敏反應、II型糖尿病、蕁麻疹、尋常性間質肺炎(UIP)、脈管炎、春季結膜炎、病毒性視網膜炎、沃格特-小柳-原田症候群(VKH症候群)、濕式黃斑變性及傷口癒合。

在另一態樣中，本發明之結合蛋白適用於治療選自由以下組成之群的病症：急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓白血病、腎上腺皮質癌、肛門癌、闌尾癌、小腦星形細胞瘤、大腦星形細胞瘤、基底細胞癌、膽管癌、肝外癌、膀胱癌、骨癌、骨肉瘤/惡性纖維組織細胞瘤腦幹神經膠質瘤、腦瘤、腦幹神經膠質瘤、大腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、幕上原始神經外胚層瘤、視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、乳癌、支氣管腺瘤/

類癌、類癌瘤、類癌瘤、原發灶不明之胃腸道癌、中樞神經系統淋巴瘤、原發性小腦星形細胞瘤、子宮頸癌、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病慢性骨髓增生性病變、結腸癌、結腸直腸癌、皮膚T細胞淋巴瘤、子宮內膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文家族腫瘤、顱外生殖細胞腫瘤、性腺外生殖細胞腫瘤、肝外膽管癌、眼癌、眼內黑素瘤視網膜母細胞瘤、膽囊癌、胃癌、胃腸道類癌瘤、胃腸道基質瘤(GIST)、顱外生殖細胞腫瘤、性腺外生殖細胞腫瘤、卵巢生殖細胞腫瘤、妊娠滋養層細胞腫瘤、神經膠質瘤、腦幹神經膠質瘤、大腦星形細胞瘤神經膠質瘤、兒童視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、毛細胞白血病、頭頸癌、肝細胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下嚥癌、眼內黑素瘤、胰島細胞癌(內分泌胰腺)、卡波西肉瘤、腎(腎細胞)癌、喉癌、急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、毛細胞白血病、唇及口腔癌、肝癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、AIDS相關性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤淋巴瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤,瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、骨骼惡性纖維組織細胞瘤/骨肉瘤、神經管胚細胞瘤、黑素瘤、眼內(眼)黑素瘤、梅克爾細胞癌、惡性間皮瘤、原發灶隱匿之轉移性鱗狀頸癌、口癌、多發性內分泌瘤症候群、多發性骨髓瘤/漿細胞贅瘤、蕈樣肉芽腫、骨髓發育不良症候群、骨髓發育不良/骨髓增生性疾病、骨髓性白血病、慢性骨髓白血病、

多發性骨髓瘤、骨髓增生性病變、鼻腔及鼻竇癌、鼻咽癌、神經母細胞瘤、口腔癌、唇及口咽癌、骨肉瘤/骨骼惡性纖維組織細胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖細胞腫瘤、卵巢低度惡性潛在腫瘤、胰腺癌、胰島細胞胰腺癌、鼻竇及鼻腔癌、副甲狀腺癌、陰莖癌、咽癌、嗜鉻細胞瘤、松果體母細胞瘤及幕上原始神經外胚層瘤、垂體瘤、漿細胞贅瘤/多發性骨髓瘤、胸膜肺母細胞瘤、前列腺癌、直腸癌、腎細胞(腎)癌、腎盂及輸尿管癌、移行細胞癌、視網膜母細胞瘤、唾液腺癌、肉瘤、尤文家族腫瘤、卡波西肉瘤、軟組織肉瘤、子宮肉瘤、塞紮萊症候群、皮膚癌(非黑素瘤)、皮膚癌(黑素瘤)、梅克爾細胞皮膚癌、小腸癌、鱗狀細胞癌、原發灶隱匿之轉移性鱗狀頸癌、胃癌、幕上原始神經外胚層瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、睪丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤及胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂及輸尿管移行細胞癌、妊娠滋養層細胞腫瘤、輸尿管及腎盂癌、移行細胞癌、尿道癌、子宮癌、子宮內膜子宮肉瘤、陰道癌、視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、陰門癌、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症及威爾姆氏瘤。

在另一態樣中，本發明提供偵測活體外樣本(例如生物學樣本，諸如血清、血漿、組織、活組織檢查)中PGE₂之存在的方法。標的方法可用於診斷例如免疫細胞相關病症之病症。該方法包括：(i)使樣本或對照樣本與如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段接觸；及(ii)偵測抗PGE₂抗體或其片段與樣本或對照樣本之間複合物的形成，其中樣本相對

於對照樣本中之複合物形成中之統計學上顯著的變化指示樣本中存在PGE₂。

在另一態樣中，本申請案提供活體內偵測PGE₂存在之方法(例如在個體中活體內成像)。標的方法可用於診斷例如PGE₂相關病症之病症。該方法包括：(i)在允許抗體或片段與PGE₂結合之條件下向個體或對照個體投與如本文所述之抗PGE₂抗體或其片段；及(ii)偵測抗體或片段與PGE₂之間複合物的形成，其中個體相對於對照個體中複合物形成中之統計學上顯著的變化指示存在PGE₂。

本發明抗體或其抗原結合部分可單獨或組合用於治療該等疾病。應瞭解，本發明抗體或其抗原結合部分可單獨使用或與額外藥劑(例如治療劑)組合使用，該額外藥劑係由熟習此項技術者出於其預定目的選擇。舉例而言，該額外藥劑可為業內公認為適用於治療由本發明抗體治療之疾病或病狀之治療劑。該額外藥劑亦可為賦予治療組合物有益屬性的藥劑，例如影響組合物黏度之藥劑。

應進一步瞭解，欲包括於本發明內之組合為適於其預定目的之彼等組合。下文陳述之藥劑係出於說明性目的且不欲具有限制性。作為本發明之一部分的組合可為本發明抗體及至少一種選自以下清單之額外藥劑。若組合使得所形成之組合物可執行其預定功能，則組合亦可包括一種以上額外藥劑，例如兩種或三種額外藥劑。

如本發明進一步描述，組合療法可包括與一或多種額外治療劑共調配及/或共投與之一或多種PGE₂拮抗劑(例如抗

PGE₂抗體或其片段)，該一或多種額外治療劑例如一或多種細胞激素及生長因子抑制劑、免疫抑制劑、消炎劑(例如全身性消炎劑)、抗纖維變性劑、代謝抑制劑、酶抑制劑及/或細胞毒性劑及或細胞生長抑制劑。可與一或多種PGE₂拮抗劑(例如抗PGE₂抗體或其片段)共投與及/或共調配之較佳額外治療劑的實例包括(但不限於)以下一或多者：吸入類固醇；β促效劑，例如短效或長效β促效劑；白三烯或白三烯受體之拮抗劑；組合藥物，諸如ADVAIR；IgE抑制劑，例如抗IgE抗體(例如XOLAIR)；磷酸二酯酶抑制劑(例如PDE4抑制劑)；黃嘌呤；抗膽鹼藥物；肥大細胞穩定劑，諸如色甘酸；IL-4抑制劑；IL-5抑制劑；嗜酸性粒細胞趨化因子/CCR3抑制劑；組織胺或其受體(包括，H1、H2、H3及H4)之拮抗劑，及前列腺素D或其受體(DP1及CRTH2)之拮抗劑。該等組合可用於治療哮喘及其他呼吸障礙。可與一或多種抗PGE₂抗體或其片段共投與及/或共調配之治療劑的其他實例尤其包括以下一或多者：TNF拮抗劑(例如TNF受體之可溶性片段，例如p55或p75人類TNF受體或其衍生物，例如75 kD TNFR-IgG(75 kD TNF受體-IgG融合蛋白質，ENBREL))；TNF酶拮抗劑，例如TNF轉化酶(TACE)抑制劑；葷毒鹼受體拮抗劑；TGF-β拮抗劑；干擾素γ；佩福尼酮；化學治療劑，例如甲胺喋呤、來氟米特或西羅莫司(雷帕黴素)或其類似物，例如CCI-779；COX2及cPLA2抑制劑；NSAID；免疫調節劑；p38抑制劑，TPL-2、MK-2及NFκB抑制劑。其他組合為細胞激

素抑制性消炎藥(CSAID)；針對其他人類細胞激素或生長因子(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-31、干擾素、EMAP-II、GM-CSF、FGF、EGF、PDGF及內皮素-1以及此等細胞激素及生長因子之受體)之抗體或拮抗劑。本發明抗體或其抗原結合部分可與針對細胞表面分子之抗體組合，該等分子諸如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90、CTLA或其配位體，包括CD154(gp39或CD40L)。

治療劑之較佳組合可干擾發炎級聯的不同點。較佳實例包括TNF拮抗劑樣嵌合人類化或人類TNF抗體、D2E7(PCT公開案第WO 97/29131號)、CA2(Remicade™)、CDP 571及可溶性p55或p75 TNF受體、其衍生物(p75TNFR1Gg(Enbrel™)或p55TNFR1gG(Lenercept))，以及TNF轉化酶(TACE)抑制劑；類似地，IL-1抑制劑(介白素-1轉化酶抑制劑、IL-1RA等)可能由於相同原因而為有效的。

本發明醫藥組合物可包括「治療有效量」或「預防有效量」之本發明抗體或抗體部分。「治療有效量」係指在必需劑量下且歷時必需時段有效達成所要治療效果之量。抗體或抗體部分之治療有效量可由熟習此項技術者確定且可視諸如疾病病況、個體之年齡、性別及體重以及抗體或抗體部分在個體中引起所要反應之能力的因素而變化。治療有效量亦為抗體或抗體部分之治療有益作用超過任何毒性

或有害作用的量。「預防有效量」係指在必需劑量下且歷時必需時段有效達成所要預防效果之量。通常，因為在疾病早期階段之前或在疾病早期階段時對個體使用預防劑量，所以預防有效量將小於治療有效量。

可調節給藥方案以提供最佳所要反應(例如治療或預防反應)。舉例而言，可投與單次大丸劑，可隨時間投與若干分次劑量，或依治療情況之緊急需要所指示，可按比例減少或增加劑量。將非經腸組合物調配為易於投與且劑量均一之單位劑型尤其有利。如本文所用之單位劑型係指適合作為單一劑量用於待治療哺乳動物個體的物理不連續單元；各單元含有經計算以產生所要治療作用之預定量的活性化合物以及所需醫藥載劑。本發明之劑量單位形式的規格由以下因素規定且直接取決於以下因素：(a)活性化合物之獨特特徵及欲達成之特定治療或預防作用；及(b)混配該活性化合物以達成個體中之治療靈敏度之技術中所固有之限制。

本發明之抗體或抗體部分的治療或預防有效量之一例示性非限制範圍為0.1-20 mg/kg，更佳為1-10 mg/kg。應注意劑量值可能隨待緩解之病狀的類型及嚴重程度而變化。應進一步瞭解，對於任何特定個體而言，特定劑量方案應根據個體需要及投與或監督組合物投與之個人的專業判斷隨時間而加以調整，且本文所述之劑量範圍僅供例示，而並非意欲限制所主張之組合物的範疇或實施。

對於熟習此項技術者而言將顯而易見，本文中所述之本

發明方法的其他合適修改及改適為明顯的且可使用不悖離本發明之範疇的合適等效物或本文所揭示之實施例進行。現已詳細描述本發明，參考以下實例將更清楚理解本發明，該等實例僅出於說明之目的包括在內且不欲限制本發明。

實例

實例 1：產生及分離抗前列腺素 E₂ 單株抗體

實例 1.1：鑑別抗人類前列腺素 E₂ 抗體之檢定

除非另外說明，否則使用以下檢定鑑別及表徵抗前列腺素 E₂ 抗體。

實例 1.1.A：ELISA

根據以下兩種方法中之至少一者進行篩選結合前列腺素 E₂ 之抗體的酶聯免疫吸附檢定。

方法 1

以 50 μ l 於 PBS (Invitrogen Carlsbad, CA) 中的 2 μ g/ml 抗宿主 Fc IgG (Sigma, St. Louis, MO) 塗覆 ELISA 培養盤 (Costar 3369, Corning, NY)。在 4°C 下培育隔夜後，以 PBS 洗滌且將培養盤以 200 μ l Superblock (Pierce #37535, Rockford, IL) 阻斷。將含有 IgG 之樣本在檢定緩衝液 (含有 0.05% Surfactamp (Pierce #37535, Rockford, IL) 之 PBS 中的 10% Superblock) 中稀釋至 1 μ g/ml 且向各孔中每孔添加 50 μ l 且在室溫下培育 1 小時。將培養盤以 Tween-Tris 緩衝之溶液 (TTBS) 洗滌 4 次。將 PGE₂-生物素醯胺 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) 稀釋至 30 nM 且在檢定緩衝液中以 1:3 連續

稀釋。向各IgG樣本中以每孔50 μ l添加滴定曲線樣本且在室溫下培育1小時。如先前所述洗滌培養盤且向各孔中添加50 μ l 抗生蛋白鏈菌素 polyhrp40(Fitzgerald Industries, Concord, MA)於檢定緩衝液中之1:5000倍稀釋液且在室溫下培育45分鐘。進行最終洗滌步驟且使用單步驟TMB系統(Sigma #T8665, St. Louis, MO)及每孔100 μ l 2N H₂SO₄將培養盤顯色。在450 nm下在Molecular Devices Spectramax培養盤讀取器(Sunnyvale, CA)上讀取培養盤。使用GraphPad Prism 5(GraphPad軟體, La Jolla, CA)測定EC₅₀。

方法2

或者，使用³H-PGE₂ ELISA測定前列腺素結合。以PBS中之5 μ g/ml山羊抗人類IgG(Fc)(Thermo Scientific # 31170, Hudson, NH)或山羊抗小鼠IgG(Fc)(Thermo Scientific # 31125, Hudson, NH)以每孔50 μ L塗覆培養盤且在4°C下培育隔夜。第二天，輕敲培養盤且吸乾(blotted dry)。將培養盤在室溫下以每孔200 μ L Superblock(Thermo Scientific # 37515, Hudson, NH)阻斷1小時。輕敲培養盤且吸乾。將單株抗體在具有Tween 20(PBST)(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)及10% Superblock之磷酸鹽緩衝液中稀釋至0.04 μ g/ml且向預阻斷之ELISA培養盤的各孔中以每孔2 ng添加50 μ L各抗體且在室溫下培育1小時。將各孔以PBS+0.1% Tween-20洗滌3次。在PBST/10% Superblock中製備³H-PGE₂(Perkin Elmer # NET-428, Waltham, MA)的連續3倍滴定液。向培養盤各孔中添加50

μl $^3\text{H-PGE}_2$ 溶液且在室溫下培育1小時。將各孔以 PBST/10% Superblock 手動洗滌6次且向各孔中添加50 μL 閃爍液 (Perkin Elmer # 6013621, Waltham, MA)。使用 TopCount 讀取器 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 以5分鐘計數延遲讀取培養盤。使用 GraphPad Prism 5 (GraphPad 軟體, La Jolla, CA) 測定 EC_{50} 值。

實例 1.1.B : PGE_2 競爭 ELISA

根據以下兩種方法中之至少一者進行競爭酶聯免疫吸附檢定以測定前列腺素對結合前列腺素 E_2 之抗體的結合特異性。

方法 1

以每孔 50 μl 於 PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中之 2 $\mu\text{g/ml}$ 抗宿主 Fc IgG (Sigma, St. Louis, MO) 塗覆 ELISA 培養盤 (Costar 3369, Corning, NY)。在 4°C 下培育隔夜後，以 200 μl Superblock (Pierce #37535, Rockford, IL) 阻斷培養盤。將 IgG 樣本在檢定緩衝液 (含有 0.05% Surfactants (Pierce #37535, Rockford, IL) 之 PBS 中的 10% Superblock) 中稀釋至 6 $\mu\text{g/ml}$ 。將 PGE_2 -生物素醯胺在檢定緩衝液中稀釋至 3 nM。在 300 nM 開始藉由 1:10 倍連續稀釋製備前列腺素 PGA_2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)、 PGD_2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) 及 PGE_2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) 的檢定緩衝液中之滴定曲線。以每試管 50 μl 體積向試管中添加各試劑且在室溫下預培育 1 小時。在預培育後，將混合物轉移至經阻斷培養盤中且

在室溫下培育1小時。隨後，將培養盤以Tween 20-Tris緩衝之溶液(TTBS)洗滌4次。接著向各孔中添加以1:5000倍稀釋於檢定緩衝液(Fitzgerald Industries, Concord, MA)中之抗生蛋白鏈菌素polyhrp40且在室溫下培育45分鐘。進行最終洗滌步驟且使用單步驟TMB系統(Sigma #T8665, Sigma, St. Louis, MO)及每孔100 μ l 2N H₂SO₄將培養盤顯色。在450 nm下在Molecular Devices Spectramax培養盤讀取器(Sunnyvale, CA)上讀取培養盤。未標記之前列腺素與PGE₂-生物素醯胺競爭結合之孔中的信號降低。使用GraphPad Prism 5(GraphPad軟體, La Jolla, CA)測定IC₅₀值。接著藉由PGE₂之IC₅₀/其他前列腺素之IC₅₀計算交叉反應性指數。

方法2

或者，使用³H-PGE₂競爭ELISA測定前列腺素選擇性。以PBS中之5 μ g/ml山羊抗人類IgG(Fc)(Thermo Scientific # 31170, Hudson, NH)或山羊抗小鼠IgG(Fc)(Thermo Scientific # 31125, Hudson, NH)以每孔50 μ L塗覆培養盤且在4°C下培育隔夜。第二天，輕敲培養盤且吸乾。將培養盤在室溫下以每孔200 μ L Superblock(Thermo Scientific # 37515, Hudson, NH)阻斷1小時。輕敲培養盤且吸乾。將單株抗體在PBST(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)/10% Superblock中稀釋至0.04 μ g/ml且向預阻斷之ELISA培養盤各孔中添加各50 μ L(每孔2 ng)且在室溫下培育1小時。各孔以PBS/0.1% Tween-20洗滌3次。將³H-

PGE₂(Perkin Elmer # NET-428, Waltham, MA)在PBST/ 10% Superblock中稀釋至6 nM(2倍儲備液)。在PBST+10% Superblock中以2000 μM(2倍儲備液)至0.00004 μM(2×)範圍內的各種濃度製備各前列腺素(Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)。混合等體積之³H-PGE₂溶液與各前列腺素稀釋液。接著向培養盤各孔中添加50 μl此混合物且在室溫下培育1小時。將各孔以PBST/10% Superblock手動洗滌6次且向各孔中添加50 μL閃爍液(Perkin Elmer # 6013621, Waltham, MA)。使用TopCount讀取器(Perkin Elmer, Waltham, MA)以5分鐘計數延遲讀取培養盤。使用GraphPad Prism 5(GraphPad軟體, La Jolla, CA)測定IC₅₀值。接著藉由PGE₂之IC₅₀/其他前列腺素之IC₅₀計算交叉反應性指數。

實例 1.1.C：量測抗前列腺素 E₂ 抗體之功能活性

為了檢驗本發明抗PGE₂抗體之功能活性，在以下量測抗體抑制PGE₂活性之能力的活體外及活體內檢定中使用該等抗體。

實例 1.1.C.1：EP4生物檢定

在Ca⁺⁺通量檢定中在以人類EP4受體穩定轉染之HEK293 Gα16細胞(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)中測定抗PGE₂抗體活體外抑制PGE₂之細胞反應之能力。簡言之，將編碼四種人類PGE₂受體中之一者EP4的表現質體與編碼Gα16之表現質體共轉染至人類胚胎腎細胞株293細胞(ATCC# CRL1573, Manassas, Virginia)中。使用標準方法

(Joseph Sambrook及David W. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Publisher. 由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版，2001)選擇共表現人類EP4及G α 16蛋白之穩定純系且用於EP4生物檢定。

將HEK293 G α 16細胞塗鋪於黑色/透明聚-D-離胺酸培養盤(Corning #3667, Corning, NY)中且與Ca⁺⁺敏感染料(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)一起培育90分鐘。以FLIPR緩衝液[含有1 \times HBSS(Invitrogen Carlsbad, CA)、20 mM HEPES(Invitrogen Carlsbad, CA)、0.1% BSA(Sigma, St. Louis, MO)及2.5 mM丙磺舒(probenecid)(Sigma, St. Louis, MO)]稀釋儲備PGE₂(於200標準強度乙醇中)。亦在FLIPR緩衝液中預稀釋抗PGE₂抗體或同型匹配對照抗體。向經細胞預塗鋪之各孔中添加25 μ l PGE₂或預培育之PGE₂/抗體混合物。在連續滴定PGE₂時且使用FLIPR1或Tetra(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)測定PGE₂之劑量反應且使用GraphPad Prism 5(GraphPad軟體, La Jolla, CA)測定EC₅₀。為了測試抗體，將EC₅₀濃度之PGE₂與不同濃度之測試抗體或同型匹配抗體(陰性對照)(ABC)一起培育20分鐘，且添加至HEK293 G α 16細胞中之負載染料的人類EP4中。使用FLIPR1監測Ca⁺⁺通量且使用GraphPad Prism 5(GraphPad軟體, La Jolla, CA)分析資料。

實例1.1.C.2：使用³H-PGE₂測定抗前列腺素E₂抗體對PGE₂與PGE₂受體之結合的競爭抑制

使用基於細胞或基於膜之受體結合檢定使用³H-PGE₂(前

列腺素 E2 , [5,6,8,11,12,14,15-3H(N)] , Perkin Elmer, Waltham, MA. 目錄號 NET428250UC) 測定抗 PGE₂ 抗體對 PGE₂ 與 PGE₂ 受體 (例如 EP4 或 EP3) 之結合的競爭抑制。

使內源表現或穩定過度表現 EP4 受體之細胞 (亦即用於 EP4 生物檢定之 HEK293-EP4 細胞或 HEK293-EP4-Gα16 細胞) (每毫升 10⁵ 個細胞) 在 24 孔培養盤中在 DMEM 培養基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) / 10% FCS (Sigma #T8665, Sigma, St. Louis, MO) 中生長隔夜。移除培養基且添加 100 μl 結合緩衝液 (無 FCS 之培養基)。將培養盤置於冰上歷時 10 分鐘。與示蹤劑 (40 pM ³H-PGE₂) 一起以 100 μl 體積添加非放射性 PGE₂ (0-1 μM)。在 4°C 下進行平衡受體結合歷時 90 分鐘。移除培養基且將細胞以 200 μl 冷培養基洗滌 4 次。藉由添加 20 μl 0.5 M NaOH 採集細胞。將溶胞物轉移至液體閃爍培養盤中。向各孔中添加 100 μl Aquasafe 500 (Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany) 加 LSC 混合液 (Lumac LSC, Groningen, The Netherlands) 且混合。藉由液體閃爍計數測定細胞結合放射性。對於多數促效劑-受體相互作用而言, 假定促效劑 (PGE₂) 之受體結合抑制遵循單位點模型。使用 GraphPad Prism 5 (GraphPad 軟體, La Jolla, CA) 計算 EC₅₀、K_i 及 K_d 值。

在 ³H-PGE₂ (前列腺素 E2 , [5,6,8,11,12,14,15-3H(N)] , Perkin Elmer, Waltham, MA. 目錄號 NET428250UC) 與 EP3 受體結合時使用來自過度表現 EP3 受體之細胞的膜製劑 (Millipore, Billerica, MA) 進行對抗 PGE₂ 抗體之抑制。在結

合檢定之前，向 Unifilter-96 GF/B 濾板 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 中添加每孔 50 μ l 0.3% 聚乙烯亞胺 (PEI) (Sigma, St. Louis, MO) 且在 4°C 下放置 1 小時直至準備使用。在結合緩衝液 (50 mM HEPES pH 7.0、10 mM $MgCl_2$ 、1 mM EDTA、0.2% BSA) 中以 2 倍濃度製備抗體之 1:3 倍稀釋液。在結合緩衝液中以 2 倍濃度製備 3H -PGE₂。接著向含有 50 μ l 200 pM 3H -PGE₂ 之各孔中添加抗體的 50 μ l 連續 3 倍稀釋液，充分混合且將其於室溫下放置 10 分鐘。將冷凍膜解凍且再懸浮於結合緩衝液中。向各孔中添加 5 μ g 膜。將混合物在室溫下培育 60 分鐘，隨後使用 Packard 96 孔採集器過濾至預處理之 GF/B 濾板上。接著將培養盤乾燥 1 小時，隨後添加 MicroscintTM20 (Perkin Elmer, Waltham, MA)。接著密封培養盤且在 TopCount 讀取器 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 上計數。在 100 μ M 冷 PGE₂ 存在下測定非特異性結合。使用 Graphpad Prism (GraphPad 軟體, La Jolla, CA) 使用所測得之放射性 (cpm) 測定 IC₅₀ 值。

實例 1.1.C.3：使用基於細胞之 FACS 檢定測定抗前列腺素 E₂ 抗體對 PGE₂ 與 PGE₂ 受體之結合的競爭抑制

可使用基於細胞之 FACS 檢定使用 PGE₂-生物素醯亞胺 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan. 目錄號 10006987) 及 抗 生 蛋 白 鏈 菌 素 -R- 藻 紅 素 (SA-RPE; Invitrogen, Carlsbad, CA, 目錄號 15-4301) 測定抗 PGE₂ 抗體對 PGE₂ 與 PGE₂ 受體 (例如 EP4) 之結合的競爭抑制。將內源表現或穩定過度表現 EP4 受體之細胞 (1×10^6) (亦即用於 EP4 生物檢定

之 HEK293-EP4 細胞 或 HEK293-EP4-G α 16 細胞) 在 DMEM 培養基 (Invitrogen, Carlsbad, CA)/10% FCS(Sigma #T8665, Sigma, St. Louis, MO) 中培養。採集細胞且以 500 μ l 洗滌緩衝液 (PBS/1% BSA) 洗滌若干次。將細胞再懸浮於 500 μ l FACS 結合緩衝液 (無 FCS 之培養基) 中。向細胞懸浮液中添加 20 μ l PGE₂-生物素醯亞胺且在 4°C 下培育 1 小時。將細胞以洗滌緩衝液洗滌 3 次。將細胞再懸浮於 500 μ l FACS 結合緩衝液中且向細胞中添加 20 μ l SA-RPE 且在 4°C 下培育 30 分鐘。接著將細胞再懸浮於 500 μ l FACS 結合緩衝液中且藉由流動式細胞量測術分析細胞表面上之 PGE₂ 結合。可藉由在以 PGE₂-生物素醯亞胺及 SA-RPE 培育之前預培育細胞同時滴定抗 PGE₂ 抗體來測定抗 PGE₂ 抗體之抑制。

實例 1.2：藉由融合瘤法產生抗前列腺素 E₂ 單株抗體

如下獲得抗前列腺素 E₂ 小鼠單株抗體：

實例 1.2.A：以前列腺素 E₂-甲狀腺球蛋白結合物免疫小鼠

在第 1 天將與完全弗氏佐劑 (Pierce, Rockford, IL) 或 Immunoeasy 佐劑 (Qiagen, Valencia, CA) 混合之 20 微克 PGE₂/甲狀腺球蛋白結合物皮下注射至 5 隻 6-8 週大 Balb/C 小鼠、5 隻 C57B/6 小鼠及 5 隻 AJ 小鼠中。在第 24 天、第 38 天及第 49 天將與不完全弗氏佐劑或 Immunoeasy 佐劑混合之 25 μ g PGE₂/甲狀腺球蛋白結合物皮下注射至同一小鼠中。在第 84 天、第 112 天或第 144 天，對小鼠靜脈內注射 1 μ g PGE₂/甲狀腺球蛋白結合物。

實例 1.2.B：產生融合瘤

根據Kohler, G.及Milstein, Nature, 256:495 (1975)所述之既定方法使自實例1.2.A中所述之經免疫小鼠獲得之脾細胞與SP2/O-Ag-14細胞以5:1比率融合以產生融合瘤。以每孔 2.5×10^6 個脾細胞的密度將融合產物塗鋪於96孔培養盤中含有偶氮絲胺酸(Pierce, Rockford, IL)及次黃嘌呤(Pierce, Rockford, IL)之選擇培養基中。融合7至10天後，觀察到肉眼可見融合瘤純系。藉由ELISA(如實例1.1.A中所述)測試來自含有融合瘤純系之各孔的上清液中針對PGE₂之抗體的存在。

使PGE₂與包括牛甲狀腺球蛋白、匙孔螺血藍蛋白、牛血清白蛋白及卵白蛋白之若干種不同載體蛋白結合。(Amiram等人, Eur. J. Biochem. 53:145-150 (1975))。如實例1.2.A中所述以此等結合PGE₂-蛋白質複合物中之一者免疫小鼠。接著融合來自經免疫小鼠之脾細胞以產生如實例1.2.B所述之融合瘤。分離產生對PGE₂具特異性之抗體的融合瘤且使用如實例1.1.A所述之經生物素標記PGE₂ ELISA表徵抗體。

實例1.2.C：鑑別及表徵抗前列腺素E₂單株抗體

藉由有限稀釋按比例擴大及選殖根據實例1.2.B產生之產生結合PGE₂之抗體的融合瘤。

分離對PGE₂具特異性之若干種抗體，稱為19C9、4F10及15F10。如實例1.1.A所述藉由ELISA使用經生物素標記之PGE₂測定此等抗體之親和力(圖1及2)。EC₅₀資料如下：

	IgG1	15F10.3C9	1F7.1D5
EC50	~ 10.50	0.004732	15.03

	IgG1	19C9.4B10	4F10.3B9
EC50	~ 10.50	0.02297	0.01400

。如實例 1.1.B 所述藉由使用各種前列腺素之競爭 ELISA 進一步測定此等抗體對 PGE₂ 之特異性(表 2)。

表 2：19C9、4F10、15F10 及 2B5 抗體之親和力及交叉反應性

	19C9	4F10	15F10	2B5
EC50(nM)	16	6	2	0.048
	23	14	5	0.033
交叉反應性指數	PGE1: <5.6% PGA2: ~0.1% PGD2: <0.01%	PGE1: <3.2% PGA2: ~0.1% PGD2: <0.01%	PGE1: <2.9% PGA2: <0.1% PGD2: <0.01%	PGE1: ~20% PGA2: ~0.6% PGD2: <0.01%

實例 2：藉由活體外呈現技術產生人類抗前列腺素 E₂ 抗體

實例 2.1：藉由活體外呈現技術自非免疫人類抗體文庫選擇人類抗前列腺素 E₂ 抗體

使用 PROfusionTM mRNA 呈現，藉由活體外呈現技術以單鏈 Fv(scFv) 型式自非免疫人類抗體文庫選擇人類抗 PGE₂ 抗體。使用抗生蛋白鏈菌素或中性鏈親和素磁性珠粒收集編碼結合經生物素標記之 PGE₂ 之 scFv 蛋白的抗體胺基酸序列且藉由多輪選擇自文庫進一步富集。將大量產出 scFv 核酸序列次選殖入適於細菌傳播的質體 DNA 中且挑選個別細菌純系用於 scFv 序列分析且藉由文庫選擇中所用之相同抗原結合檢定確認其 PGE₂ 結合。接著將 PGE₂ 結合 scFv 純系之 VH 及 VL DNA 單獨次選殖入相應人類 IgG 表現重鏈及輕鏈載體中，且轉染至 COS7 細胞中以供 IgG 表現。接著藉由 ELISA 如實例 1.1.A 中所述使用含有人類 IgG 之 COS7 培養基

確認 PGE₂ 結合 (表 3)。

表 3：PROfusion 文庫來源之 PGE₂ 抗體與 PGE₂-生物素醯胺的結合 (OD₄₅₀)

生物素-PGE ₂ (μM)	抗體							
	K1B	K7H	K3A	L11	L12A	L21	L20	對照組
45	0.88	0.24	0.58	0.07	0.26	0.46	0.12	0.07
15	0.82	0.29	0.78	0.07	0.22	0.41	0.09	0.05
5	0.67	0.13	0.67	0.07	0.18	0.31	0.07	0.05
2	0.27	0.10	0.61	0.07	0.13	0.32	0.06	0.08
1	0.29	0.06	0.51	0.05	0.09	0.25	0.06	0.05
0.3	0.21	0.04	0.34	0.04	0.09	0.16	0.05	0.03
0.1	0.13	0.03	0.22	0.04	0.07	0.10	0.06	0.04
0	0.07	0.04	0.11	0.04	0.08	0.08	0.07	0.03

表 4 提供來源於 PROfusion™ mRNA 呈現文庫之人類抗 PGE₂ 抗體的 VH 及 VL 區之胺基酸序列的清單。

表 4 VH 及 VL 區之胺基酸序列的清單

SEQ ID No.	蛋白質區域		序列
			123456789012345678901234567890
5	VH PGE2LNK1B		EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKTSGYTFT NYDINWVRLAPGQGLEWMGCMNPTTGKTGY AQKFQGRVTMTRDTTIATAYMELSRITSED TAVYYCARGRGYSPGYGVAYADYWGQGLTV TVSS
6	VH PGE2LNK1B CDR-H1	SEQ ID NO.:5之殘 基31-35	NYDIN
7	VH PGE2LNK1B CDR-H2	SEQ ID NO.:5之殘 基50-66	CMNPTTGKTGYAQKFQG
8	VH PGE2LNK1B CDR-H3	SEQ ID NO.:5之殘 基99-113	GRGYSPGYGVAYADY
			123456789012345678901234567890
9	VL PGE2LNK1B		DIQLTQSPSSLPASVGDVITICRASQSSIS TYLNWYQQTPGKAPSLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ SYSPPTFGGGTKVEIKR
10	VL PGE2LNK1B CDR-L1	SEQ ID NO.:9之殘 基24-34	RASQSSISTYLN
11	VL PGE2LNK1B CDR-L2	SEQ ID NO.:9之殘 基50-56	AASSLQS
12	VL PGE2LNK1B CDR-L3	SEQ ID NO.:9之殘 基89-97	QQSYSPPT
			123456789012345678901234567890

13	VH PGE2LNK3A		EVQLVQSGAETKKPGASVEVSCASGYSFT EYGISWVRQAPGQGPPEWMGCISPYNGLHY AQEFQGRVTMTTGTSTNTAYMELGSLRSD TAVYYCARGGFSFYDSSGYYYYVTDHWGQGT LVTVSS
14	VH PGE2LNK3A CDR-H1	SEQ ID NO.:13之 残基31-35	EYGIS
15	VH PGE2LNK3A CDR-H2	SEQ ID NO.:13之 残基50-66	CISPYNGLHYAQEFQG
16	VH PGE2LNK3A CDR-H3	SEQ ID NO.:13之 残基99-115	GGFSFYDSSGYYYYVDH
			123456789012345678901234567890
17	VL PGE2LNK3A		DIRLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIG SYLNWYQQKSGKAPKLLIYAASKLQSGVPS RFGSGFGTDFTLTISLQPEDSATYYCQQ SDTTPFTFGQGTKLEIKR
18	VL PGE2LNK3A CDR-L1	SEQ ID NO.:17之 残基24-34	RASQSIGSYLN
19	VL PGE2LNK3A CDR-L2	SEQ ID NO.:17之 残基50-56	AASKLQS
20	VL PGE2LNK3A CDR-L3	SEQ ID NO.:17之 残基89-97	QQSDTTPFT
			123456789012345678901234567890
21	VH PGE2LNK7H		EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYSFT EYGISWVRQAPGQGPPEWMGCISPYNGLHY AQKFLGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLKSD TAVYYCARGGFSYDSSGYYYYVTDHWGQGT LVTVSS
14	VH PGE2LNK7H CDR-H1	SEQ ID NO.:21之 残基31-35	EYGIS
22	VH PGE2LNK7H CDR-H2	SEQ ID NO.:21之 残基50-66	CISPYNGLHYAQKFLG
23	VH PGE2LNK7H CDR-H3	SEQ ID NO.:21之 残基99-115	GGFSSYDSSGYYYYVTDH
			123456789012345678901234567890
24	VL PGE2LNK7H		DIRLTQSPSSLPASVGDRTITCRASQSIG TYLNWYQQTPGKAPSLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSPPPTFGGKVEIKR
10	VL PGE2LNK7H CDR-L1	SEQ ID NO.:24之 残基24-34	RASQISITYLN
11	VL PGE2LNK7H CDR-L2	SEQ ID NO.:24之 残基50-56	AASSLQS
12	VL PGE2LNK7H CDR-L3	SEQ ID NO.:24之 残基89-97	QQSYSPPPT
			123456789012345678901234567890
25	VH PGE2LNL11		EVQLVQSGPELKKPGTSTVSKASGYTLT TYAMNWRQAPGQGLEWMGWIDTSTGNPTY APGFLGRFVFLDTSLSLTYLQISSLKPDD TAVYYCARSSHTRPGDFWQGT LVTVSS
26	VH PGE2LNL11 CDR-H1	SEQ ID NO.:25之 残基31-35	TYAMN
27	VH PGE2LNL11 CDR-H2	SEQ ID NO.:25之 残基50-66	WIDTSTGNPTYAPGFLG
28	VH PGE2LNL11 CDR-H3	SEQ ID NO.:25之 残基99-113	SSHTRPGDF
			123456789012345678901234567890

29	VL PGE2LNL11		QSGLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSESNVG TNSVNWYQQLPGAAPRLLIRGNSDRPSGVP DRFSASKSGTSASLAISRLOSEDEADYFCG ACDGRLSGLYVFGTGKVTVL
30	VL PGE2LNL11 CDR-L1	SEQ ID NO.:29之 殘基23-35	SGSESNVGTNSVN
31	VL PGE2LNL11 CDR-L2	SEQ ID NO.:29之 殘基51-56	GNSDRP
32	VL PGE2LNL11 CDR-L3	SEQ ID NO.:29之 殘基90-101	GACDGRLSGLYV
			123456789012345678901234567890
33	VH PGE2LNL21		EVQLVQSGSELKKPGTQSVKVSCKASGYTLT TYAMNWVRQAPGQGLEWMGWIGTSTGNPTY AQGFTGRFVFLDTSVNTAHLQIYSLKAED TALYYCARSSLTRPADYWGQGLTVTVSS
26	VH PGE2LNL21 CDR-H1	SEQ ID NO.:33之 殘基31-35	TYAMN
34	VH PGE2LNL21 CDR-H2	SEQ ID NO.:33之 殘基50-66	WIGTSTGNPTYAQGFTG
35	VH PGE2LNL21 CDR-H3	SEQ ID NO.:33之 殘基99-107	SSLTRPADY
			123456789012345678901234567890
36	VL PGE2LNL21		QSGLTQPPSVSGAPGQRVTISCFGSSSNIG AGYDVHWYQQLPGAAPKLLIFGNNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC QSCDSSLGAVFGTGKVTVL
37	VL PGE2LNL21 CDR-L1	SEQ ID NO.:36之 殘基23-36	FGSSSNIGAGYDVH
38	VL PGE2LNL21 CDR-L2	SEQ ID NO.:36之 殘基52-57	GNNRNP
39	VL PGE2LNL21 CDR-L3	SEQ ID NO.:36之 殘基91-101	QSCDSSLGAV

實例 3：藉由埃德曼定序 (Edman Sequencing)、質譜分析及 BLAST 之組合根據經解答蛋白質序列產生及表徵重組抗前列腺素 E₂ 抗體

藉由使用埃德曼降解 (Edman degradation)、質譜分析與 BLAST (基礎局部比對搜尋工具 (Basic Local Alignment Search Tool), NCBI, NIH, Bethesda, MD) 之組合如先前所述 (Pham, V. 等人, *Analyt. Biochem.* 352:77-86 (2006)) 分析胺基酸序列來產生對 PGE₂ 具特異性之來源於融合瘤之小鼠抗體的蛋白質序列。以 100 mM DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) 將 0.45 mg 抗 PGE₂ 抗體還原成輕鏈與重鏈。藉由在具有

Vydac C-18逆相管柱(H-P Separations Group, Hesperia, CA)之 Shimadzu HPLC系統(Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD)上進行逆相HPLC來分離抗PGE₂抗體之輕鏈及重鏈。在Applied Biosystems API QSTAR Pulsar i質譜儀(Applied Biosystems, Foster City, CA)及Agilent Q-TOF質譜儀(Agilent, Palo Alto, CA)上量測輕鏈與重鏈之分子量。在PE Applied Biosystems 494/785A/140C/610A 蛋白質-肽定序儀(Applied Biosystems, Foster City, CA)上在溶液中進行輕鏈之N端定序。將45 μL抗PGE₂ 2B5抗體輕鏈加載至過濾器中心且進行42輪。將抗PGE₂抗體重鏈之N端以焦麩胺酸阻斷且其不可直接藉由埃德曼降解定序。在重鏈N端埃德曼定序之前，使用焦麩胺酸胺肽酶(pyroglutamate aminopeptidase)(Sigma, St. Louis, MO)使重鏈N端去阻斷(de-blocked)。在37°C下以50 mM DTT還原80 μg抗PGE₂抗體歷時30分鐘。向經還原樣本中添加0.42 μl 0.5 M EDTA(pH 7.5)(Invitrogen, Carlsbad, CA)直至最終EDTA濃度為1 mM。向樣本中添加50 μl經復原重組嗜熱古細菌(*pyrococcus furiosus*)焦麩胺酸胺肽酶(Sigma, St. Louis, MO)。在40°C下培育樣本溶液15小時後，使溫度增至60°C再歷時2小時。再添加10 μl經復原嗜熱古細菌焦麩胺酸胺肽酶且將樣本在60°C下再培育1小時。在15小時、17小時及18小時時點使用4 μl樣本進行LC/MS分析以監測去阻斷處理之程度。當去阻斷反應完成時，藉由速度-真空機(speed-vacuum)(Eppendorf, Westbury, NY)將溶液濃縮至約

100 μ l。藉由 SDS-PAGE 使去阻斷重鏈與輕鏈分離且接著轉移至 PVDF 膜 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以供進行埃德曼定序 (Niall, HD, Methods Enzymol. 27:942-1010 (1973))。

為了獲得抗 PGE₂ 抗體之內部肽序列，在進行或不進行烷基化處理之狀況下以多種蛋白酶消化抗體。首先以 DTT 還原樣本。以蛋白酶直接消化經還原樣本或將其以碘乙醯胺 (Sigma, St. Louis, MO) 烷基化且隨後消化。此研究中使用之蛋白酶包括胰蛋白酶、glu-C、asp-N 及胰凝乳蛋白酶 (Sigma, St. Louis, MO)。藉由 HPLC 分離經蛋白酶消化之肽的分離部分且在單獨 eppendorf 管中收集各分離部分以供 MS 或埃德曼定序。對於 LC/MS/MS 分析而言，使用 MALDI-MS (Applied Biosystems, Foster City, CA)、具有任一 LCQ-deca 之 nano-LC/ESI-MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA)、API QStar Pulsar (Applied Biosystems, Foster City, CA) 及 Agilent Q-TOF (Agilent, Palo Alto, CA)。HPLC 條件為移動相 A=0.1% 甲酸；移動相 B=80% ACN/20% 0.1% 甲酸。應用 1-3 小時梯度 (5-50% B)。對於埃德曼定序而言，藉由 ProSorb 濾筒 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 將含有由蛋白酶消化產生之肽的分離部分轉移至 PVDF 膜。將各分離部分稀釋成 100 μ l 0.1% TFA 溶液 (Sigma, St. Louis, MO)。在以 10 μ l 甲醇 (Sigma, St. Louis, MO) 濕潤儲集器中之 PVDF 膜 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 之後，向儲集器中添加樣本。自儲集器移除樣本且將 PVDF 膜風乾。將 PVDF 膜穿孔，添加 5 μ l 10% Biobrene 稀

溶液 (Sigma, St. Louis, MO) 且使膜完全乾燥。以 15 μ l 0.1% TFA 洗滌 PVDF 膜 15 秒之後，以濾紙擦拭表面。向 PVDF 膜添加 4 μ l 甲醇且澈底乾燥。將經乾燥 PVDF 膜用於埃德曼定序。

藉由比對根據上文之方法解答之重鏈與輕鏈的可變區與小鼠生殖系序列之 VH 及 VL 資料庫 (Ig-BLAST, NCBI, NIH, Bethesda, MD) 測定抗 PGE₂ 抗體之 VH 及 VL 的生殖系序列。對於未經 MS 及埃德曼序列解答之區域而言，指派最接近生殖系序列。手動鑑別可能之熱點突變以分別匹配藉由 MS 測定之抗 PGE₂ 抗體的重鏈及輕鏈之實驗分子量。使用上述方法解答抗 PGE₂ 抗體之蛋白質序列。

基於此經解答蛋白質序列構築若干型式之各自在幾個未經解答之位置具有不同殘基的重組抗 PGE₂ 抗體 (2B5-7.0、2B5-8.0 及 2B5-9.0) (表 5)。實例 4 中描述此等重組抗體之測試。儘管抗體 CDR 之胺基酸序列對抗體之結合特異性、效力及親和力而言至關重要，但構架及甚至 CDR 中幾個殘基的取代、改變、缺失或添加仍在很大程度上保持抗體之結合特異性、效力及親和力。具有至少一個或幾個該(等)取代、改變、缺失或添加之抗體型式仍在本發明範疇內。圖 8 中顯示抗 PGE₂ 抗體 (2B5-7.0、2B5-8.0 及 2B5-9.0) 之 VH 及 VL 區的比對。

表5：小鼠抗PGE₂抗體之經解答蛋白質序列的若干型式

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		123456789012345678901234567890
40	VH 2B5-7.0	QVQLQQSGPELVLRPGSSVKISCKASGYTFTK YWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGYDYTHYNE KFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YFCARSDGSSTYWGQGLVTVSA
41	VL 2B5-7.0	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVH SNGNTYLEWYLQRPGQSPKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTVFTLKISRVEAEDLGVYYC FQVSHVPYTFGGGTKLEIKR
42	VH 2B5-8.0	QVQLQQSGPELVLRPGSSVKISCKASGYTFTK YWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGYDYTHYNE KFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAI YYCARSDGSSTYWGQGLVTVSA
43	VL 2B5-8.0	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVH SNGNTYLEWYLQRPGQSPKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTVFTLKISRVEAEDLGVYYC FQVSHVPYTFGGGTKLEIKR
44	VH 2B5-9.0	QVQLQQSGPELVLRPGSSVKISCKASGYTFTK YWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGYDYTHYNE KFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YFCARSDGSSTYWGQGLVTVSA
45	VL 2B5-9.0	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVH SNGNTYLEWYLQRPGQSPKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTVFTLKISRVEAEDLGVYYC FQVSHVPYTFGGGTKLEIKR

實例4：重組抗前列腺素E₂抗體實例4.1：重組抗前列腺素E₂抗體之構築及表現

藉由在細菌中同源重組使編碼小鼠抗PGE₂抗體2B5-7.0、2B5-8.0或2B5-9.0之重鏈可變區的DNA與編碼人類IgG1恆定區、小鼠IgG1恆定區或小鼠IgG2a恆定區之cDNA片段融合。(Zhang, Y等人, Nature Biotechnol. 18(12):1314-7 (2000))。使編碼2B5-7.0、2B5-8.0或2B5-9.0

之輕鏈可變區的DNA與人類 κ 恆定區或小鼠 κ 恆定區融合。同上。藉由共轉染連接至pTT3表現質體中之重鏈及輕鏈cDNA使全長抗體於293細胞中短暫表現。(Durocher, Y等人, *Nucleic Acids Res.* 30(2):E9 (2002))。藉由蛋白質A瓊脂糖層析法純化含有重組嵌合抗體之細胞上清液且藉由添加酸性緩衝液溶離已結合抗體。中和抗體且透析至PBS中。(Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. Gary C. Howard及Matthew R. Kaser編。CRC出版(2006))。

接著在ELISA檢定中如實例1.1.A所述測試經純化嵌合抗PGE₂單株抗體2B5-7.0、2B5-8.0及2B5-9.0與PGE₂結合之能力(表6)，且在競爭ELISA中如實例1.1.B所述測試其選擇性(表6)。所有三種重組抗PGE₂單株抗體2B5-7.0、2B5-8.0及2B5-9.0以相似的對PGE₂之特異性有效結合PGE₂。2B5-8.0顯示對PGE₂之結合能力最高，且選擇其用於在EP4生物檢定中進一步表徵以表徵其中和PGE₂生物活性之能力，且在使用整組前列腺素之³H-PGE₂競爭ELISA中表徵其前列腺素選擇性。2B5-8.0在如實例1.1.C所述之EP4生物檢定中有效抑制PGE₂誘發之鈣流入(表6)。IC₅₀及EC₅₀資料如下：

IC50					
2B5	32 nM				
2B5-8.0	13 pM				
		EC50	0.03668	0.08904	0.07894
			2b5.5	2b5.6	2b5.7
					2b5.8
					0.08696
			2b5.1	2b5.2	2b5.3
			0.06323	0.05538	0.05911
					2b5.4
					0.05722

表 6：經工程改造之抗 PGE₂ Mab 的 PGE₂ 結合、前列腺素結合選擇性及 PGE₂ 中和效力的表徵

抗 PGE ₂ mAb		2B5	2B5-7.0	2B5-8.0	2B5-9.0
生物素-PGE ₂ ELISA 中之 PGE ₂ 結合 (EC50, nM)		2.99	2.46	1.03	3.04
生物素-PGE ₂ 競爭 ELISA 中之 PG 選擇性 (CRI%)	PGE ₁	41	27	28	23
	PGA ₂	0.29	0.11	0.21	0.24
	PGD ₂	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
³ H-PGE ₂ ELISA 中之 PGE ₂ 結合 (EC50, pM)		315		253	
³ H-PGE ₂ 競爭 ELISA 中之 PG 選擇性 (CRI%)	PGE ₂	100		100	
	PGE ₁	12		3.6	
	PGA ₂	0.17		0.04	
	PGD ₂	0.04		<1X10 ⁻⁴	
	PGF ₂ α	0.25		0.05	
	PGI ₂	NA		0.16	
	艾羅斯特 (Iloprost)	NA		0.01	
	卡柏羅斯特素 (Carbaprostacyclin)	NA		0.18	
	松節烷 TXA ₂	NA		0.00033	
	15R-松節烷 TXA ₂	NA		0.00043	
	碳環 TXA ₂	NA		0.0005	
	TXB ₂	<0.01		<0.01	
	6-酮基 PGF ₁ α	0.4		0.64	
	PGB ₂	0.03		0.00038	
	8-異 PGF ₂ α	0.02		0.092	
	13,14-二羥基-15-酮基 PGE ₂	<0.01		0.012	
	2,3-二降-6-酮基-PGF ₁ α	NA		0.019	
	15-酮基 PGE ₂	<0.01		0.013	
	19R-羥基 PGE ₂	<0.01		0.09	
	LTE ₄	<0.01		0.012	
5(S)-HETE	<0.01		<0.01		
花生四烯酸	<0.01		<0.01		
細胞 EP4 檢定中之 PGE ₂ 中和效力 (IC50, pM)		38		44	

實例 4.2：構築及表現人類化抗前列腺素 E₂ 抗體

實例 4.2.1：選擇人類抗體構架

基於胺基酸序列同源性、CDR聚類分析、所表現人類抗體之使用頻率及關於人類抗體之晶體結構的可獲得資訊進行人類化。考慮對抗體結合、VH-VL配對及其他因素的可能影響，在鼠類與人類構架殘基不同之情況下，使鼠類殘基突變成人類殘基，但有少數例外。基於對與鼠類抗體可變區的實際胺基酸序列具有高度同源性(亦即序列相似性)的人類生殖系抗體序列或其子組之分析來設計其他人類化策略。

使用同源性模擬來鑑別預計對抗體CDR結構至關重要的鼠類抗體序列獨有之殘基。使用與所關注目標蛋白質共有序列相似性且三維座標已知之參考蛋白質來獲得初始座標及其進一步改進之指南。比對參考蛋白質與目標蛋白質的一級序列以使得兩種蛋白質之相同部分的座標得以比對。自通用結構模板構築例如由殘基突變、插入或缺失產生之兩種蛋白質之錯配部分的座標且改進能量以確保與已比對模型座標的一致性。此計算蛋白質結構可經進一步改進或直接用於模擬研究。

使用 Vector NTI 軟體單獨比對 2B5-8.0 之鼠類可變重鏈及可變輕鏈基因序列與 44 人類免疫球蛋白生殖系可變重鏈或 46 生殖系可變輕鏈序列(來源於 NCBI Ig BLAST 網站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>)。使用 BLAST 搜尋與目測之組合鑑別合適參考結構。認為參考胺基酸序列與目標胺基酸序列之間 25% 的序列一致性為嘗

試同源性模擬運用所必需之最低值。手動構築序列比對且以程式Jackal(Petrey, D.等人, Proteins 53 (增刊6):430-435 (2003))產生模型座標。對基於針對人類V及J區段序列之同源性搜尋進行2B5-8.0人類化而言,選擇VH區段VH1-18及J區段JH4提供2B5-8.0之人類化重鏈可變區之構架。對於2B5-8.0輕鏈可變區而言,使用VL區段01及J區段JK4(參見表7及8)。2B5-8.0 VH與受體人類VH1-18及JH4區段之間的構架胺基酸一致性為80.2%,而2B5-8.0 VL與受體人類01及JK4區段之間的一致性為90.3%。儘管選擇較佳人類構架受體VH/JH及VL/JK之特定對作為人類化2B5-8.0之受體,但此項技術中已知與小鼠構架具有至少25%序列一致性的其他人類構架受體亦可用於2B5-8.0之人類化且因此在本發明範疇內。

表7：2B5-8.0人類化之重鏈受體序列

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		12345678901234567890123456789012
46	VH1-18&JH4 FR1	QVQLQQSGPELVPRGSSVKISCKAS
47	VH1-18&JH4 FR2	WVKQRPGHGLEWIG
48	VH1-18&JH4 FR3	KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCAR
49	VH1-18&JH4 FR4	WGQGLVTVSA

表8：2B5-8.0人類化之輕鏈受體序列

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		12345678901234567890123456789012
50	01&JK4 FR1	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC
51	01&JK4 FR2	WYLQRPGQSPKLLIY
52	01&JK4 FR3	VPDRFSGSGSGTVFTLKISRVEAEDLGVYYC
53	01&JK4 FR4	FGGGTKLEIKR

所選抗體之鼠類及人類構架區之一級序列共有顯著一致

性。不同之殘基位置為將鼠類殘基納入人類化序列中以保持鼠類抗體的所觀測結合效力的候選者。關鍵殘基處之該等構架區胺基酸取代(回復突變成小鼠殘基之人類殘基)稱為構架回復突變，其中關鍵殘基係選自由以下組成之群：與CDR相鄰之殘基；糖基化位點殘基；稀有殘基；能夠與PGE₂相互作用之殘基；能夠與CDR相互作用之殘基；典型殘基；重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基；Vernier區內之殘基；及在Chothia界定之可變重鏈CDR1與Kabat界定之第一重鏈構架之間重疊之區域中的殘基。在一實施例中，人類受體構架包含至少一個構架區胺基酸取代，其中該構架之胺基酸序列與該人類受體構架之序列至少65%一致且包含至少70個與該人類受體構架一致之胺基酸殘基。對2B5-8.0人類化而言，關鍵殘基處之構架區胺基酸取代係選自由以下組成之群：在重鏈可變區中位置48之M(人類)取代為I(小鼠)，位置68之V(人類)取代為A(小鼠)，位置70之M(人類)取代為L(小鼠)，且位置72之T(人類)取代為V(小鼠)；及在輕鏈可變區中位置2之I(人類)取代為V(小鼠)及位置3之V(人類)取代為L(小鼠)。

指定構架殘基影響抗體之結合特性的可能性視其與CDR殘基之接近性而定。因此，使用模型結構，鼠類序列與人類序列之間不同的殘基根據其與可能接觸PGE₂之CDR中之任何原子的距離分級。處於任何CDR原子4.5 Å之內的彼等殘基視為最重要殘基且認為其係保持人類化抗體中之鼠類殘基(亦即構架回復突變)之候選者。

對於2B5-8.0抗體可變區之人類化而言，本發明提供之一般方法如下。首先，藉助於電腦程式ABMOD及ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983))構築2B5-8.0抗體可變區之分子模型。隨後，基於針對人類V及J區段序列的同源性搜尋，選擇VH區段VH1-18(The Immunoglobulin Facts Book. 2001，由Marie-Paule Lefranc及Gerald Lefranc編著，Academic Press出版)及J區段JH4(同上)提供用於2B5-8.0人類化重鏈可變區之構架。對於2B5-8.0輕鏈可變區而言，使用VL區段01(同上)及J區段JK4(同上)。2B5-8.0 VH與受體人類VH1-18及JH4區段之間的構架胺基酸一致性為80.2%，而2B5-8.0 VL與受體人類01及JK4區段之間的一致性為90.3%。電腦模型未鑑別出任何具有需要回復突變之CDR的顯著接觸殘基。未進行進一步置換。

設計9種不同型式之人類化2B5-8.0，稱為HU2B5.1、HU2B5.2、HU2B5.3、HU2B5.4、HU2B5.5、HU2B5.6、HU2B5.7、HU2B5.8及HU2B5.9。九種抗體不同之處在於上文所述重鏈可變區之位置48、68、70及72及輕鏈可變區之位置2及3處的構架回復突變。

表9：小鼠抗PGE₂抗體2B5-8.0之CDR

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		123456789012345678901234567890
54	CDR H1	GYTFTKYWLG
55	CDR-H2	DIYPGYDYTHYNEKFKD
56	CDR-H3	SDGSSTY
57	CDR-L1	TSSQNIVHSNGNTYLE
58	CDR-L2	KVSNRFSG
59	CDR-L3	FQVSHVPYT

表 10：具有 2B5-8.0 之 CDR 的九種人類化抗 PGE₂ 抗體

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		123456789012345678901234567890
60	VH Hu2B5.1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGYDYTHY NEKFKDRATLTVDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS
61	VL HU2B5.1	DVVMQTPLSLPVTPEGEPASISCTSSQNI HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV YYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
62	VH HU2B5.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGYDYTHY NEKFKDRATLTVDTSTSTAYMELSSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS
63	VL HU2B5.2	DVVMQTPLSLPVTPEGEPASISCTSSQNI HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV YYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
64	VH HU2B5.3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGYDYTHY NEKFKDRATLTVDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS
65	VL HU2B5.3	DVLMQTPLSLPVTPEGEPASISCTSSQNI HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV YYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
66	VH HU2B5.4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGYDYTHY NEKFKDRATLTVDTSTSTAYMELSSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS
67	VL HU2B5.4	DVLMQTPLSLPVTPEGEPASISCTSSQNI HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV YYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
68	VH HU2B5.5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYDYTHY NEKFKDRVTLTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS
69	VL HU2B5.5	DVVMQTPLSLPVTPEGEPASISCTSSQNI HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV YYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
70	VH HU2B5.6	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYDYTHY NEKFKDRVTLTDTSTSTAYMELSSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS
71	VL HU2B5.6	DVVMQTPLSLPVTPEGEPASISCTSSQNI HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV YYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
72	VH HU2B5.7	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYDYTHY NEKFKDRVTLTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLVTVSS

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		123456789012345678901234567890
73	VL HU2B5.7	DVLMQTPLSLPVTTPGEPASISCTSSQNIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQVSHVPTYFGGGTKVEIKR
74	VH HU2B5.8	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYDYTHY NEKFKDRVTLTDTSTSTAYMELSSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLTVTVSS
75	VL HU2B5.8	DVLMQTPLSLPVTTPGEPASISCTSSQNIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQVSHVPTYFGGGTKVEIKR
76	VH HU2B5.9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYDYTHY NEKFKDRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARSDGSSTYWGQGLTVTVSS
77	VL HU2B5.9	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCTSSQNIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQVSHVPTYFGGGTKVEIKR

實例 4.2.2：人類化抗體之構築

使用寡核苷酸重新構築實例 4.2.1 中所述之電腦設計之人類化抗體。對於各可變區 cDNA 而言，設計 6 種各自具有 60-80 個核苷酸之寡核苷酸以在各寡核苷酸之 5' 及 / 或 3' 端彼此重疊 20 個核苷酸。在黏接反應中，組合所有 6 種寡核苷酸 (oligos)，煮沸且在 dNTP 存在下黏接。添加 DNA 聚合酶 I (大 (Klenow) 片段 (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.)) 以填充重疊寡核苷酸之間的約 40 bp 間隙。接著進行 PCR 以使用兩個含有與經修飾 pTT3 載體中之多選殖位點互補之懸垂序列的最外引子擴增整個可變區基因。在瓊脂糖凝膠上分離自各 cDNA 裝配產生之 PCR 產物且切除及純化對應於所預測可變區 cDNA 尺寸之色帶。在細菌中藉由同源重組將重鏈可變區同框插入至編碼野生型人類 IgG1 恆定區或含有 2 個鉸鏈區胺基酸突變之人類 IgG1 恆定區的 cDNA

片段中。(Zhang, Y等人, Nature Biotechnol. 18(12):1314-7 (2000))。突變為位置234(EU編號)處之白胺酸改變為丙胺酸且位置235處之白胺酸改變為丙胺酸(Lund等人, J. Immunol., 147:2657 (1991))。藉由同源重組將輕鏈可變區同框插入至人類 κ 恆定區中。分離細菌群落, 提取質體DNA且對cDNA插入物整體定序。將含有對應於各抗體之恰當人類化重鏈及輕鏈的pTT3載體共轉染至HEK293細胞中以短暫產生全長人類化抗PGE₂抗體。藉由蛋白質A瓊脂糖層析法純化含有重組嵌合抗體之細胞上清液且藉由添加0.1 N乙酸/0.15 M NaCl(pH 3.0)溶離經結合抗體。中和抗體且透析至PBS中。

實例 4.2.3：人類化抗 PGE₂ 抗體之替代構築

此實例描述抗PGE₂抗體之人類化。基本上根據Queen, C.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989)之程序進行鼠類單株抗體2B5-8.0之人類化。首先, 鑑別出與2B5-8.0 VH或VL胺基酸序列具有高度同源性之人類V區段。隨後, 將對保持互補決定區(CDR)之結構而言重要的CDR序列以及構架胺基酸移植入所選人類構架序列中。此外, 將發現在相應V區子組中稀有之人類構架胺基酸經共同胺基酸取代以降低潛在免疫原性。

對於2B5-8.0可變區之人類化而言, 本發明提供之一般方法如下。首先, 藉助於電腦程式ABMOD及ENCAD(Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983))構築2B5-8.0可變區之分子模型。隨後, 基於針對人類V及J區段序列之

同源性搜尋，選擇 VH 區段 MUC1-1'CL(Griffiths, A.D. 等人，EMBO J. 12: 725-734 (1993))及 J 區段 JH4(Ravetch, J.V. 等人，Cell 27: 583-591 (1981))以提供 Hu2B5-8.0 重鏈可變區之構架。對於 Hu2B5-8.0 輕鏈可變區而言，使用 VL 區段 TR1.37'CL(Portolano, S. 等人，J. Immunol. 151: 2839-2851 (1993))及 J 區段 JK2(Hieter, P.A. 等人，J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982))。2B5-8.0 VH 與受體人類 MUC1-1'CL 及 JH4 區段之間的構架胺基酸一致性為 76%，而 2B5-8.0 VL 與受體人類 TR1.37'CL 及 JK2 區段之間的一致性為 84%。

在電腦模型表明與 CDR 顯著接觸之構架位置，以來自小鼠 V 區之胺基酸取代初始人類構架胺基酸。對 2B5-8.0 人類化而言，關鍵殘基處之構架區胺基酸取代係選自由以下組成之群：在重鏈可變區中位置 48 之 M(人類)取代為 I(小鼠)，位置 67 之 R(人類)取代為 K(小鼠)，位置 68 之 V(人類)取代為 A(小鼠)，位置 70 之 I(人類)取代為 L(小鼠)且位置 72 之 R(人類)取代為 V(小鼠)；及在輕鏈可變區中位置 75 之 D(人類)取代為 V(小鼠)。此外，一些胺基酸已改變為同一人類可變域子組中之共同胺基酸以消除潛在免疫原性，其包括重鏈可變區中位置 76 之 A 取代為 T，及輕鏈可變區中位置 1 之 E 取代為 D 及位置 2 之 L 取代為 I。

下文提供基於此人類化分析之 CDR 移植可變域 (Hu2B5.P1 之 VH 及 VL) 及併有所有回復突變及共同取代之可變域 (Hu2B5.P2 之 VH 及 VL) 的蛋白質序列。一般而言應

瞭解，具有一個或數個該等回復突變及共同取代之任何人類化型式在本發明範疇內。抗體E包含VH Hu2B5.P2及VL Hu2B5.P2；抗體F包含VH Hu2B5.P2及VL Hu2B5.P1；抗體G包含VH Hu2B5.P1及VL Hu2B5.P2；且抗體I包含VH Hu2B5.P1及VL Hu2B5.P1。

表 11：具有 2B5-8.0 之 CDR 的人類化抗 PGE₂ 抗體

SEQ ID No.	蛋白質區域	序列
		1234567890123456789012345678901234567890
78	VH Hu2B5.P1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTKYWLGWVRQA PGQGLEWMDIYPGYDYTHYNEKFKDRVTITRDTSASTAY MELSSLRSEDTAVYYCARSDGSSTYWGQGLTVTVSS
79	VL HU2B5.P1	ELVMTQSPLSLPVTPGEPASISCTSSQNIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGTKLEIK
80	VH HU2B5.P2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTKYWLGWVRQA PGQGLEWIGDIYPGYDYTHYNEKFKDKATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARSDGSSTYWGQGLTVTVSS
81	VL HU2B5.P2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCTSSQNIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTVFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGTKLEIK

實例 4.2.4：人類化抗 PGE₂ 抗體之表徵

如實例 1.1.A 所述藉由生物素-PGE₂ ELISA 或 ³H-PGE₂ 放射免疫檢定測定經純化人類化抗 PGE₂ 抗體結合 PGE₂ 之能力，如實例 1.1.B 所述藉由競爭性生物素-PGE₂ ELISA 或 ³H-PGE₂ 放射免疫檢定測定人類化抗 PGE₂ 抗體之交叉反應性。如實例 1.1.C 所述使用 EP4 生物檢定測定人類化抗 PGE₂ 抗體對 PGE₂ 活性之抑制。

在生物素-PGE₂ ELISA 中所有人類化抗 PGE₂ 抗體能夠結合 PGE₂ (圖 6 及 7；表 12)。在 EP4 FLIPR 檢定中人類化抗

PGE₂抗體能夠中和及阻斷PGE₂介導之鈣流入。在³H-PGE₂ ELISA中替代設計之人類化抗PGE₂抗體E、F、G及I亦能夠與PGE₂結合(表13)。在³H-PGE₂競爭ELISA中選擇Hu2B5.7以供進一步表徵前列腺素結合特異性且顯示對PGE₂之特異性(表13)。

表12：人類化抗體的表徵

人類化抗體	Ch2B 5-8.0	Hu2B5.1	Hu2B5.2	Hu2B5.3	Hu2B5.4	Hu2B5.5	Hu2B5.6	Hu2B5.7	Hu2B5.8	Hu2B5.9	
EC50(pM) ELISA	41-60	63	55	59	57	37	89	79	87	NT	
EP4檢定中PEG ₂ 25 pm細胞效力下之IC50(pM)	55	55	55	47	40	47	52	78	78	125	
交叉反應性指數	PGE1	12	16	14	14	14	11	11	9.3	8.5	NT
	PGA2	0.17	0.21	0.18	0.18	0.22	0.18	0.15	0.15	0.20	NT
	PGD2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	NT

表13：人類化抗PGE₂抗體的表徵(續)

人類化抗體ID	A	E	F	G	I
VH/VL	Hu2B5.9	VH Hu2B5.P2/ VL Hu2B5.P2	VH Hu2B5.P2/ VL Hu2B5.P1	VH Hu2B5.P1/ VL Hu2B5.P2	VH Hu2B5.P2/ VL Hu2B5.P2
³ H-PGE ₂ ELISA 中之PGE ₂ 結合 (IC ₅₀ , nM)	0.704	0.416	0.955	0.574	1.299

表14：人類化抗PGE₂抗體Hu2B5.7之前列腺素選擇性的表徵

抗PGE ₂ mAb	2B5	Hu2B5-7.0	
³ H-PGE ₂ 競爭ELISA 中之PG選擇性 (CRI %)	PGE2	100	100
	PGE1	12	5.6
	PGA2	0.17	0.02
	PGD2	0.04	<1X10 ⁻⁴
	PGF2α	0.25	0.06
	PGI2	NA	0.12
	艾羅斯特	NA	0.006
	卡柏羅斯特素	NA	0.16
	松節烷TXA2	NA	0.00016
	15R-松節烷TXA2	NA	0.0029
	破環TXA2	NA	0.00011
	TXB2	<0.01	<0.01
	6-酮基PGF1α	0.4	0.47
	PGB2	0.03	0.0004
	8-異PGF2α	0.02	0.06
	13,14-二羥基-15-酮 基PGE2	<0.01	0.0092

	2,3-二降-6-酮基 PGF1 α	NA	0.19
	15-酮基PGE2	<0.01	0.011
	19R-羥基PGE2	<0.01	0.07
	LTE4	<0.01	0.01
	5(S)-HETE	<0.01	<0.01
	花生四烯酸	<0.01	<0.01

實例 4.2.4.a：人類化抗 PGE₂ 抗體阻斷 PGE₂ 與 PGE₂ 受體之結合

可藉由如實例 1.1.D 所述之使用 ³H-PGE₂ 的基於細胞或基於膜之受體結合檢定及如實例 1.1.E 所述之基於細胞之 FACS 檢定測定抗 PGE₂ 抗體對 PGE₂ 與 PGE₂ 受體 (例如 EP4) 之結合的競爭性抑制。

對於在人體中血清半衰期介於 10 與 20 天之間的治療性 mAb 而言，每週或每兩週靜脈內或皮下 3 mpk 或 3 mpk 以下之給藥方案的血清濃度通常介於 5-15 μ g/ml 之間。基於此計算，在單株抗體的習知給藥方案下，作為治療性 mAb 之 hu2B5.1-Hu2B5.9 在 100 nM (或 15 μ g/ml) 之血清濃度下可能完全 (100%) 活體內阻斷 PGE₂ 與 EP4 之結合。

實例 4.2.5：人類化抗 PGE₂ 抗體之生物物理-化學表徵

所測試標準在諸如指示固有穩定性 (差示掃描熱量測定或 DSC) 與一般物理及化學穩定性 (例如藉由 SEC 監測之包括破碎及凝集的純度) 之參數的一般藥物樣特性參數範圍內。

用於生物物理-化學表徵之分析方法：

實例 4.2.5.1：尺寸排阻層析 (SEC)

使用尺寸排阻層析基於尺寸分離蛋白質。蛋白質係於水

性移動相中載運且穿過封裝於管柱中之多孔固定相樹脂。管柱中之滯留時間為蛋白質之流體動力尺寸與封裝樹脂床中之微孔尺寸的函數。較小分子可穿透至樹脂中之較小微孔中且保持比較大分子長的時間。在自管柱溶離時，藉由UV吸收偵測蛋白質。SEC方法使用TSK凝膠防護(TOSOH Biosciences, Montgomeryville, PA, 目錄號08543)及TSK凝膠G3000SWxL(TOSOH Biosciences, Montgomeryville, PA, 目錄號08541)。移動相為100 mM Na_2HPO_4 、200 mM Na_2SO_4 ，pH 7.0。流動速率為0.3 mL/min。注入體積為20 μL 1 mg/mL樣本。管柱溫度為室溫。自動取樣器溫度為2-8°C。總運作時間為50分鐘。偵測係基於214 nm波長下之UV吸收，帶寬設定為8 nm，使用參考波長360 nm，帶寬100 nm。

實例4.2.5.1：差示掃描熱量測定(DSC)

使用DSC儀器評估抗PGE₂抗體之熱穩定性。所用DSC儀器為具有毛細管吸收池之自動VP-DSC設備(Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, UK)。應用1°C/min掃描速率經25°C-95°C溫度範圍對1 mg/mL之樣本研究分子伸展。所應用之其他量測參數為16秒之匹配期，10分鐘之預掃描等待時間，且以無反饋模式進行量測。每次個別量測時，將420 μL 樣本/空白填充至DSC量測樣本固持器中，其中盤填充流程如下文提供。使所獲得之熱分析圖擬合為非兩態模型以獲得不同轉變之中點溫度及焓。

成功生物學研究候選物之另一要求為蛋白質保持其天然

狀態及構形。水溶液中之蛋白質在天然(摺疊)構形與其變性(伸展)構形之間達成平衡。天然狀態之穩定性係基於系統之吉布士自由能(Gibbs free energy, DG)的量值及焓(DH)與熵值(DS)變化之間的熱力學關係。正DG表明天然狀態比變性狀態更穩定-DG正值愈大,穩定性愈高。為使蛋白質伸展,需要打破穩定力。構形熵值克服穩定力使得蛋白質在熵值佔優勢的溫度下伸展。DSC量測由於熱變性導致伸展之蛋白質的DH。作為一般規則,其可表述為轉變中點(Tm)愈高,蛋白質在低溫下愈穩定。在同一實驗過程中,DSC亦量測蛋白質變性之熱容量(DCp)的變化。與蛋白質伸展相關之熱容量變化主要係由於在天然狀態下包埋,但在暴露於變性狀態下溶解之側鏈的水合作用的變化。已顯示DSC為蛋白質及其他生物大分子之液體調配物穩定性的有價值預測方式(Remmele, R.L. Jr., Gombotz, W.R., BioPharm 13, 36-46, 2000及Remmele, R.L. Jr., Nightlinger, N.S., Srinivasen, S., Gombotz, W.R., Pharm. Res. 15, 200-208, 1998)。

實例 4.2.6：人類化抗 PGE₂ 抗體 Hu2B5.7 在純系選擇過程期間的穩定性

實例 4.2.6.A：使用 DSC 及 SEC 測定之人類化抗 PGE₂ 抗體 Hu2B5.7 的穩定性

藉由使用利用 DSC 進行之固有熱力學純系穩定性測定(0.79 mg/mL 純系濃度, 在 pH 6 下在 10 mM 檸檬酸鹽、10 mM 磷酸鹽緩衝液中調配)及藉由以 SEC 監測純系穩定性之

加速穩定性篩選(0.79 mg/mL純系濃度，在pH 6下在10 mM檸檬酸鹽、10 mM磷酸鹽緩衝液中調配，在50°C下歷時7天)評估一系列親本抗PGE₂抗體之純系(亦即抗PGE₂抗體)之穩定性(表15)。

表15：如SEC所測定之Hu2B5人類化抗體變異體Hu2B5.1-Hu2B5.9純系樣本中凝集物及片段的形成(穩定性研究之開始)

純系	凝集物(%)	單體(%)	片段(%)
Hu2B5.1	1.8071	93.7885	4.4044
Hu2B5.2	1.846	94.8516	3.3025
Hu2B5.3	2.116	94.1987	3.6853
Hu2B5.4	2.234	94.5513	3.2146
Hu2B5.5	1.5906	95.1406	3.2688
Hu2B5.6	1.8265	95.446	2.7275
Hu2B5.7	1.9668	95.5818	2.4514
Hu2B5.8	2.1126	94.5969	3.2904
Hu2B5.9	1.8559	95.6031	2.541

表16：如SEC所測定之Hu2B5人類化抗體變異體Hu2B5.1-Hu2B5.9純系樣本中凝集物及片段之形成(在50°C下儲存7天)

純系	凝集物(%)	單體(%)	片段(%)
Hu2B5.1	2.5611	91.0715	6.3675
Hu2B5.2	2.1753	93.1491	4.6755
Hu2B5.3	2.6042	92.3518	5.044
Hu2B5.4	2.1689	91.2889	6.5423
Hu2B5.5	1.901	93.7376	4.3614
Hu2B5.6	2.1577	93.817	4.0253
Hu2B5.7	2.205	93.905	3.89
Hu2B5.8	2.5144	93.3016	4.184
Hu2B5.9	1.9559	94.6313	3.4127

表15及16提供人類化抗-PGE₂抗體儲存高達7天之SEC測試的結果，顯示加速穩定性篩選開始及結束時的單體含量。Hu2B5.7及Hu2B5.9在7天加速穩定性篩選後顯示最高

單體含量。表 17 中所示之結果表明 hu2B5.7 相較於該組其他純系 (例如 Hu2B5.4) 亦具有極佳固有穩定性概況 (DSC 資料)。

IgG 抗體通常顯示三種伸展轉變 (Tm)：完整抗體之伸展與 Fc 片段中 CH2 域之熔融、Fc 片段中 CH3 域之熔融及 Fab 片段之熔融有關。為了選擇具有所要藥物樣特性之抗 PGE₂ 抗體，選擇具有高 Tm 值及高固有穩定性之純系 (諸如 Hu2B5.7) (表 17)。

表 17：經由 DSC 對人類化抗 PGE₂ 抗體純系進行的固有熱力學純系穩定性測定 (0.79 mg/mL 純系抗體濃度，在 pH 6 下在 10 mM 檸檬酸鹽、10 mM 磷酸鹽緩衝液中調配)

純系	Tm1(°C)	Tm2(°C)	Tm3(°C)
Hu2B5.1	72.835	75.02	82.785
Hu2B5.2	72.845	75.08	82.67
Hu2B5.3	72.67	72.96	82.67
Hu2B5.4	71.095	72.41	82.58
Hu2B5.5	73.31	75.755	82.97
Hu2B5.6	73.035	75.585	82.95
Hu2B5.7	72.67	75.445	82.795
Hu2B5.8	72.96	75.33	82.83
Hu2B5.9	73.235	75.965	83.04

實例 4.2.6.B：Hu2B5.1-Hu2B5.9 之毛細管區帶電泳

毛細管區帶電泳為毛細管填充有緩衝液且分離機制係基於分析物穿過緩衝液之電泳遷移率差異之毛細管電泳方法。分子之電泳遷移率與電荷尺寸比有關。使用 Beckman-Coulter ProteomeLab PA 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 進行 CZE 分析。使用中性毛細管 (eCAP 中性，56 cm 總長度，50 μm I. D. Beckman-Coulter, P/N 477441，

Fullerton, CA)。該方法使用30.2 cm毛細管，其在距離樣本引入口20.2 cm處具有偵測窗口。電泳緩衝液為100 mM EACA(6-胺基己酸，Sigma A7824-100 G, St. Louis, MO)，具有0.1% MC(來自1%甲基纖維素溶液，Convergent Bioscience，目錄號101876，Toronto, ON, Canada)，pH 5.5。

結果顯示Hu2B5.1、Hu2B5.3、Hu2B5.5、Hu2B5.7、Hu2B5.9比Hu2B5.2、Hu2B5.4、Hu2B5.6、Hu2B5.8遷移更偏鹼性(例如其具有較短遷移時間)。此可能係由於Hu2B5.1、Hu2B5.3、Hu2B5.5、Hu2B5.7、Hu2B5.9在重鏈第84號胺基酸處均具有R，而其他四個樣本在同一位置具有S。所有9個樣本顯示主峰及微酸性及鹼性種類，但在不同種類分布中差異不太大。

實例 4.3：與PGE₂複合之Hu2B5.7的結晶化

如下使Hu2B5.7之Fab部分與PGE₂複合且產生複合物之晶體。

實例 4.3.1：製備及純化Hu2B5.7 Fab片段

為了製備Hu2B5.7 Fab片段，首先使用Ultrafree-15 Biomax 10 kDa分子量截斷(MWCO)離心過濾裝置(Millipore)將0.15 M PBS緩衝液中之Hu2B5.7 IgG濃縮至2 mg/ml。預先洗滌木瓜蛋白酶凝膠漿液(Pierce)且以1:1體積比與緩衝液A(20 mM Na₂HPO₄、10 mM EDTA、20 mM半胱胺酸)一起裝入2-3次。接著將濃縮抗體與50%木瓜蛋白酶凝膠漿液混合且在37°C下在劇烈振盪下培育24小時。離

心分離(Beckman 6KR)抗體/漿液混合物且將上清液裝載至經PBS預平衡之Superdex 75上。溶離主峰且彙集蛋白質。藉由以100 mL PBS洗滌來製備25 mL蛋白質A瓊脂糖4快速流動親和力管柱(Amersham Pharmacia)。向親和力管柱(2 mL/min 流動速率)施加彙集之抗體片段。在flow-thru中收集含有Hu2B5.7 Fab片段之溶離份(以280 nm下之UV吸收監測)。彙集Hu2B5.7 Fab片段濃度大於0.3 mg/mL之(以280 nm下之UV吸收測定)之溶離份且在-80°C下冷凍。以SDS-PAGE評估樣本純度。

實例 4.3.2：PGE2/Hu2B5.7 Fab複合物製備

以1:1莫耳比混合PGE2及Hu2b5.7 Fab蛋白質且在4°C下培育1小時。以0.5 ml/min將複合物樣本裝載至預平衡(20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl)Superdex 200管柱上。彙集複合物且使用Ultrafree-15 Biomax 10 kDa分子量截斷(MWCO)離心過濾裝置(Millipore)濃縮至24 mg/mL且在-80°C下冷凍。以SDS-PAGE評估樣本純度。

實例 4.3.3：PGE2/Hu2B5.7 Fab複合物之結晶化

在冰上解凍冷凍之PGE2/Hu2B5.7複合物儲備液(約24 mg/mL)。混合複合物(1.0 μ L)與1.0 μ L儲集器溶液(1.75 M 硫酸銨, 100 mM MES pH 6.5, 10 mM CaCl_2)。在儲集器上在約18°C下在沈滴井(sitting drop well)(CrysChem沈滴盤)中混合所得液滴。一般在一週內出現鑽石樣晶體。

實例 4.3.4：PGE2/Hu2B5.7 Fab複合物晶體之低溫保護及急驟冷卻

使用纖維迴路 (fiber loop) 在母液 +20% 甘油中採集 PGE2/Hu2B5.7 Fab 複合物晶體。隨後藉由浸入液氮中急驟冷卻晶體。

實例 4.3.5：PGE2/Hu2B5.7 Fab 複合物之 X 射線繞射資料收集

在 IMCA 束線下在 Argonne, IL 之先進光子源 (Advanced Photon Source) 收集 PGE2/Hu2B5.7 Fab 晶體之 X 射線繞射資料。在資料收集期間以 Oxford Cryosystems Cryostream 冷卻器將晶體保持於 100 K 之溫度下。在 1.0° 之振盪範圍下收集總計 180 個框架。以 HKL2000 程式組 (Qtwinowski 及 Minor, 1997) 處理資料。在測定晶體取向之後，以 DENZO 整合資料且以 SCALEPACK 分級及合併，且置於絕對標度上且以 TRUNCATE 還原為結構因子振幅 (French 及 Wilson, 1978)。以隨機方式將 5% 獨特反射分配為「自由」組以計算自由 R 因子 ($R_{\text{自由}}$) (Brünger, 1992)；剩餘 95% 反射構成「工作」組以供計算 R 因子 (R)。

實例 4.3.6：PGE2/Hu2B5.7 Fab 複合物晶體結構之分子置換解決方案及改進

使用程式 PHASER (Read, 2001) 測定最大可能分子置換解決方案。以 3.0 \AA 解析度適當空間群解答總計 6 個 PGE2/Hu2B5.7 單體。研究模型為先前報導之 Fab 的晶體結構 (Protein Data Bank entry 1BJ1; Muller 等人, 1998)。基於分子置換解決方案產生座標。

PGE2/Hu2B5.7 Fab 複合物晶體結構之改進在適當空間群

中以上文所述之分子置換解決方案座標開始。使用剛體改進藉由 CCP4 程式組中可獲得之程式 REFMAC 開始改進 (Murshudov 等人, 1997, Collaborative Computational Project, 1994)。觀測重新 PGE2 電子密度。藉由公開 PGE2 NMR 結構 1IJZ (Moy 等人, 2001) 使用分子圖形程式 O (Jones 等人, 1991) 及 2Fo-Fc 與 Fo-Fc 電子密度圖之檢驗指導 6 個 PEG2 單體的手動建構。將改進程式 REFMAC (Murshudov 等人, 1997) 用於多輪迭代限制改進, 產生以下統計結果: R 為 25.8% (R 自由 30.5%)。

實例 5.0: 藥物動力學分析

實例 5.1: 重組小鼠抗 PGE₂ 抗體之藥物動力學分析

在 Sprague Dawley 大鼠及 Balb/C 小鼠中進行小鼠 mAb 2B5.8.0 之藥物動力學研究。以單一劑量 4 mg/kg 2B5.8.0 對雄性及雌性大鼠及小鼠進行靜脈內或腹膜內 (僅小鼠) 給藥, 且使用基於抗原捕獲之化學發光 MSD (Meso Scale Discovery) 方法 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) 分析血清樣本。藉由使用 WinNonlin 進行非隔室模型分析 (non-compartmental analysis) 計算藥物動力學參數。

實例 5.1.1: 用於定量 PK 血清樣本中之 2B5.8.0 的檢定

使用以下 MSD 檢定量測大鼠及小鼠血清中之抗體濃度。以含有 0.05% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) 之磷酸鹽緩衝鹽水洗滌 MSD 抗生蛋白鏈菌素培養盤 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)。以每孔 250 μ L 阻斷溶液

(MSD Block, Meso Scale Discovery, 在PBS中稀釋至3%最終濃度)阻斷培養盤1小時，覆蓋，同時在室溫下振盪(600 rpm)。洗滌後，向各孔中添加70 μ L經生物素標記之PGE₂(前列腺素E2-生物素醯胺，Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan，目錄號10006987，批號190831-191028，檢定緩衝液中0.01 μ g/mL)。覆蓋培養盤且在室溫下在振盪(600 rpm)下培育1小時。

在分析之前，在冰上解凍大鼠及小鼠血清樣本，溫和混合且在eppendorf離心機中在4°C下在14,000 rpm下離心分離3分鐘。在大鼠及小鼠血清中製備標準曲線及對照樣本。在保持1%最終血清濃度恆定下，使用Tecan Evo自動液體處理站將標準曲線、高、中及低對照，及血清樣本稀釋於檢定緩衝液中。再次洗滌MSD培養盤且添加研究樣本、標準曲線樣本及空白，以及高、中及低對照(每孔70 μ L)。覆蓋培養盤，且在室溫下在振盪(600 rpm)下培育1小時。

培育後，洗滌MSD培養盤，且向各孔中添加70 μ L磺酸基標記之山羊抗小鼠IgG(Meso Scale Discovery；在檢定緩衝液中稀釋至1 μ g/mL)。覆蓋MSD培養盤，且在室溫下在振盪(600 rpm)下培育1小時，接著洗滌培養盤且以2倍讀取緩衝液(Meso Scale Discovery)顯色。在10分鐘內在MSD Sector Imager 6000上量測化學發光。

使用四參數邏輯擬合分析標準曲線且藉由XLfit4軟體第2.2.1版Build 16(Microsoft Corporation, Redmond, WA)計算

樣本濃度。使用 Winonlin 軟體第 5.0.1 版 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) 藉由非隔室模型分析計算各動物之藥物動力學參數。

實例 5.1.2：在 SD 大鼠及 Balb/C 小鼠中進行 2B5.8.0 之藥物動力學研究

經手術改變(頸靜脈插管, JVC)及常規雄性及雌性 Sprague-Dawley 大鼠(約 7 週大, 體重 240-390 公克)係購自 Charles River Laboratories(Wilmington, MA)。在保持於恆定溫度及濕度且處於 12 小時光/暗循環下的室內圈養動物, 以正常齧齒動物飲食飼養且允許隨意取用食物及水。每日監測動物之水合及臨床狀態。

雄性及雌性 Balb/c 小鼠(體重約 0.025 kg)係購自 Charles River Laboratories(Wilmington, MA)。允許動物隨意取用食物及水。在不同時間點(各時間點 5 隻小鼠)收集血液樣本(0.2 mL, 對大鼠而言來自尾靜脈且對小鼠而言藉由心臟穿刺獲得), 使其在室溫下凝結 30 分鐘, 在 13,200 rpm 下離心分離 3 分鐘, 將血清轉移至 eppendorf 管且在 -80°C 下冷凍儲存。

在大鼠中靜脈內投藥後, 2B5.8.0 展現抗體典型的雙指數衰變。2B5.8.0 清除率及分布體積低(表 18), 且半衰期長, $T_{1/2}$: 9.1 及 8.9 天(分別對雄性及雌性而言)。雌性大鼠中存在高動物間可變性, 然而雄性大鼠中不存在。

在 Balb/C 小鼠中靜脈內投藥之後, 2B5.8.0 顯示極長半衰期(對雄性及雌性而言分別為 26.3 及 16.2 天), 而清除率及

分布體積低(表18)。在小鼠中腹膜內投藥後，在早期時間點在雌性中觀測到高動物間可變性。吸收低，1-2天達到37-49 $\mu\text{g/ml}$ 之高 C_{max} 。半衰期長(13.8-16.1天)且生物可用性良好(65.8-72.0%)。

表 18：2B5.8.0 在 Sprague-Dawley 大鼠及 Balb/C 小鼠中之主要藥物動力學參數

IV							
物種/劑量		$T_{1/2}$ (天數)	CL (mL/hr/kg)	V_z (mL/kg)	V_{ss} (mL/kg)	AUC_{0-} (mg•hr/mL)	MRT (天數)
大鼠(4 mg/kg)	M(N=5)	9.1±1.3	0.41±0.03	127±18.9	122±18.5	9.9±0.7	12.6±1.6
	F(N=3)	8.5±2.2	0.37±0.13	101±13.1	88±6.2	12.0±4.6	10.8±3.5
小鼠(4 mg/kg)	M	26.3	0.15	135	134	26.9	37.5
	F	16.2	0.16	92	89	24.5	22.8
IP							
物種/劑量		C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	T_{max} (天數)	$T_{1/2}$ (天數)	MRT (天數)	AUC_{0-} (mg•hr/mL)	F (%)
小鼠(4 mg/kg)	M	37.3	2	16.1	23.4	19.4	72
	F	49.4	1	13.8	19.3	16.1	65.8

實例 5.1.3：重組人類化抗 PGE₂ hu2B5.7 及 hu2B5.4 之藥物動力學分析

在 Sprague Dawley 大鼠中進行 hu2B5.7 及 hu2B5.4 的藥物動力學研究。以單一劑量 4 mg/kg hu2B5.7 及 hu2B5.4 對雄性大鼠靜脈內給藥且使用基於抗原捕獲之化學發光 MSD (Meso Scale Discovery) 方法分析血清樣本。藉由使用 WinNonlin 進行非隔室模型分析計算藥物動力學參數。

實例 5.1.3.1：用於定量 PK 血清樣本中之 Hu2b5.7 的檢定

使用以下 MSD 檢定量測大鼠血清中之 hu2B5.7 及 hu2B5.4 濃度。

以含有 0.05% Tween-20 之磷酸鹽緩衝鹽水(自 10X PBS 稀釋，Abbott Bioresearch Center, Media Room, Worcester,

MA及Tween-20, Sigma, St. Louis, MO)洗滌MSD抗生蛋白鏈菌素培養盤(Meso Scale Discovery)。以每孔250 μL 阻斷溶液(MSD Block, Meso Scale Discovery, 在PBS中稀釋至3%最終濃度)阻斷培養盤1小時，覆蓋，同時在室溫下振盪(600 rpm)。洗滌後，向各孔中添加70 μL 經生物素標記之 PGE_2 (前列腺素E2-生物素醯胺, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, 目錄號10006987, 批號190831-191028; 檢定緩衝液中0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。覆蓋培養盤且在室溫下在振盪(600 rpm)下培育1小時。

在分析之前，在冰上解凍大鼠血清樣本，溫和混合且在eppendorf離心機中在4 $^{\circ}\text{C}$ 下在14,000 rpm下離心分離3分鐘。在大鼠血清中製備標準曲線及對照樣本。使用Tecan Evo自動液體處理站將標準曲線、高、中及低對照，及血清樣本稀釋於檢定緩衝液中，保持1%最終血清濃度恆定。再次洗滌MSD培養盤且添加研究樣本、標準曲線樣本及空白，以及高、中及低對照(每孔70 μL)。覆蓋培養盤，且在室溫下在振盪(600 rpm)下培育1小時。

培育後，洗滌MSD培養盤，且向各孔中添加70 μL 磺酸基標記之山羊抗人類IgG(Meso Scale Discovery; 在檢定緩衝液中稀釋至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。覆蓋MSD培養盤，且在室溫下在振盪(600 rpm)下培育1小時，接著洗滌培養盤且以2倍讀取緩衝液(Meso Scale Discovery)顯色。在10分鐘內在MSD Sector Imager 6000上量測化學發光。

使用四參數邏輯擬合分析標準曲線且藉由XLfit4軟體第

2.2.1版 Build 16(Microsoft Corporation, Redmond, WA)計算樣本濃度。使用 Winonlin 軟體第 5.0.1 版 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA)藉由非隔室模型分析計算各動物之藥物動力學參數。

實例 5.1.3.2：在 Sprague-Dawley 大鼠中進行之藥物動力學研究

經手術改變(頸靜脈插管, JVC)之雄性 Sprague-Dawley 大鼠(約 7 週大, 體重 240-390 公克)係購自 Charles River Laboratories(Wilmington, MA)。在保持於恆定溫度及濕度且處於 12 小時光/暗循環下的室內圈養動物, 以正常齧齒動物飲食飼養且允許隨意取用食物及水。每日監測動物之水合及臨床狀態。

在不同時間點自大鼠收集 0.2 mL 血液樣本, 使其在室溫下凝結 30 分鐘, 在 13,200 rpm 下離心分離 3 分鐘, 將血清轉移至 eppendorf 管且在 -80°C 下冷凍儲存。

靜脈內投藥後, hu2B5.7 及 hu2B5.4 血清濃度雙指數衰減(通常抗體所見)。Hu2B5.7 及 hu2B5.4 清除率及分布體積低且半衰期長; $T_{1/2}$: 兩種抗體皆為 12.4 天(表 19)。約 10-14 天之後, 若干動物展現血清 hu2B5.7 濃度意外降低。此等突然降低可能係由於產生抗藥物抗體(ADA); 然而, 此未經確認。最終藥物動力學計算省略具有可能 ADA 反應之動物。

表 19: 4 mg/kg 靜脈內給藥後 hu2B5.7 及 hu2B5.4 在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中的主要藥物動力學參數

IV							
Ab/劑量		T _{1/2} (天數)	CL (mL/hr/kg)	V _z (mL/kg)	V _{ss} (mL/kg)	AUC _{0-∞} (mg·hr/mL)	MRT (天數)
hu2B5.7/4 mg/kg	(N=3)	12.4±0.6	0.41±0.07	176±30.8	165±19.8	9.9±1.8	16.8±1.0
hu2B5.4/4 mg/kg	(N=4)	12.4±5.1	0.35±0.07	143±40.2	145±31.8	11.8±2.0	18.0±6.0

實例 4.4：重組小鼠及人類化 PGE₂ 抗體的活體內功效

如下評估抗 PGE₂ 抗體之活體內功效。

實例 4.4.1：小鼠及人類化抗 PGE₂ 抗體在角叉菜膠誘發之足墊水腫模型中的活體內功效

角叉菜膠誘發之足墊水腫為先天免疫功能之急性齧齒動物模型。在角叉菜膠誘發之爪水腫模型中評估小鼠抗 PGE₂ 抗體 2B5-8.0 之活體內功效。如先前所述類似地以角叉菜膠誘發爪部發炎 (Joseph P. Portanova 等人, J. Exp. Med. 184: 883-891 (1996))。皮內 (ID) 注射發炎劑引起迅速流入嗜中性白血球及水腫 (在約 4 小時達到峰值)，隨後引起流入巨噬細胞及單核細胞 (在約 48 小時達到峰值)。將 C57.BL/6 小鼠 (8-10 週大, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 在後足墊以 5.0 mg/mL (每隻小鼠 150 µg) 之濃度皮內注射 30 µL PBS (左) 或 PBS 中之 λ-角叉菜膠 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (右)。藉由第 310-119 型 Dyer spring 測徑規在基線 (時間=0) 及角叉菜膠挑戰後 4 小時量測後足墊厚度。藉由在學生雙尾 t 測試 (Student's two-tailed t-test) 中比較各處理組與媒劑組之平均爪腫脹來測定足厚度之顯著差異。在角叉菜膠挑戰前 18 小時向小鼠腹膜內給予抗 PGE₂ 抗體 (2B5-8.0) 劑量滴定，或在挑戰前 2 小時經口給予

吲哚美辛。所量測之終點為處理後4小時右爪與左爪之間的爪腫脹(水腫)差異。抗PGE2抗體以劑量依賴性方式抑制爪水腫，且在10 mg/kg下提供最大40-50%爪腫脹抑制，與吲哚美辛實現之最大抑制相當(表20)。

表20：Ab處理後小鼠角叉菜膠誘發之足墊水腫中之爪腫脹

	媒劑 (PBS)	抗PGE2 (10 mg/kg, i.p.)	吲哚美辛 (3 mg/kg, p.o.)
Δ爪腫脹(mm)	0.857±0.06	0.529±0.04	0.486±0.03
抑制%	NA	38±4.6	57±3.5

實例 4.4.2：小鼠及人類化抗PGE2抗體在角叉菜膠誘發之痛覺過敏模型中的活體內功效

藉由測定角叉菜膠誘發之痛覺過敏評估小鼠抗PGE2抗體2B5-8.0及人類化抗PGE2抗體Hu2B5.7之活體內功效。如先前所述以角叉菜膠誘發爪部發炎(Joseph P. Portanova等人, J. Exp. Med. 184: 883-891 (1996))。藉由將0.1 ml的於無菌鹽水中之0.1%角叉菜膠溶液(FMC Corp., Rockland, ME)注射至200公克雄性Sprague Dawley大鼠(Charles River Laboratories, Portage, ME)的後足墊誘發痛覺過敏。在相同動物中藉由Hargreaves等人, Pain. 32:77-88 (1988)之方法測定對熱刺激之痛覺過敏反應。在注射後的選定時間使後足暴露於高強度投影燈泡發射之輻射熱。各後爪保持與熱源接觸之時間量量測至最接近0.1秒。痛覺過敏反應表示為各動物之角叉菜膠及鹽水注射之爪部之間的潛伏退縮期差異。在某些實驗中，在投與角叉菜膠之前1小時，藉由經口管飼法向大鼠投與0.5%甲基纖維素/0.025% Tween

80(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)中之吲哚美辛。在角叉菜膠注射之前18小時，向其他大鼠腹膜內注射小鼠抗PGE₂ mAb、2B5-8.0或人類化抗PGE₂抗體、Hu2B5.7或同型匹配抗體。

實例 4.4.2：小鼠抗PGE₂抗體在膠原蛋白誘發之關節炎中的活體內功效

自猶他州立大學(University of Utah)(Salt Lake City, UT)獲得II型牛膠原蛋白(凍乾)。將雄性DBA/J小鼠(8-10週大，Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)在尾根部以100 µL含有溶解於0.1 N乙酸中之100 µg II型牛膠原蛋白及100 µg熱滅活結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra之乳液(完全弗氏佐劑，Difco, Laurence, KS)皮內免疫。以膠原蛋白免疫之後21天，將小鼠以1 mg酵母聚糖A(Zymosan A)(Sigma, St. Louis, MO)IP增強。增強後，每日監測小鼠的關節炎。藉由以下標準對各爪計分：0=正常；1=在一個部位(足或踝)腫脹；2=在足及踝處腫脹；及3=關節僵硬。總結各動物之計分，且各組中所有動物之總平均值表示為MAS。除臨床計分之外，亦使用第310-119型之Dyer spring測徑規評估小鼠之爪水腫。在第24天與第28天之間在疾病之第一臨床徵兆時登記研究之小鼠。在實驗結束時，自各組採集六隻爪且儲存於10%中性緩衝之福馬林(formalin)中用於微CT及組織學檢查。

在Scanco µCT-40單元(Scanco Medical AG)上在60 kVp下在160 µA下進行微電腦斷層攝影術。後爪(儲存於70%乙醇

中)固定於成像管中且在18 μm 解析度下自脛骨根部至跗骨/蹠骨關節量測小鼠踝關節的1.8 mm區段之跗骨體積。接著使用Scanco AG μCT 評估程式分析足部微電腦斷層攝影術影像。

對於組織病理學分析而言，將福馬林固定之爪分段且以Gills 3蘇木精(Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI)及具有玫瑰紅之曙紅(Newcomer Supply, Middleton, MI)染色。使用以下標準組織學評估疾病嚴重程度：0=正常；1=最小變化；2=輕微變化；3=中等變化；及4=嚴重變化。總結各動物之計分，且總數表示為各組中所有動物的平均值。

在小鼠(雄性DBA/1J)膠原蛋白誘發之關節炎(人類類風濕性關節炎的標準臨床前模型)中評估單獨抗PGE₂之治療效果。在小鼠以牛II型膠原蛋白免疫後產生關節炎疾病徵兆之後開始藥物處理。目測計分小鼠之關節炎臨床徵兆且結果記錄為平均關節炎計分(MAS)。隨時間監測之爪腫脹及MAS亦表示為曲線下面積(AUC)(表21)。在疾病發作後，以抗PGE₂ mAb 2B5處理將MAS之AUC降低22%。

表 21：抗 PGE₂ 2B5-8.0 處理之後小鼠 CIA 中之疾病計分、腫脹及骨骼體積

	媒劑 (PBS)	抗PGE ₂ (8 mg/kg, 2×/週, i.p.)
MAS(AUC) (計分#天數)	74±7.3	57.4±6.7
爪腫脹(AUC) (mm#天數)	14.3±1.6	8.4±1.3
骨骼體積(mm ³)	1.2±0.2	1.6±0.1

實例 4.4.2：小鼠抗 PGE₂ 抗體在佐劑誘發之關節炎中的活體內功效

在佐劑誘發之關節炎模型中評估小鼠抗 PGE₂ 抗體 2B5-8.0 之活體內功效。如先前所述藉由足墊注射礦物油中之乳酪分枝桿菌 (*Mycobacterium butyricum*) (Difco Laboratories, Detroit, MI) 在雄性 Lewis 大鼠 (Harlan, Indianapolis, IN) 中誘發關節炎。將地塞米松 (dexamethasone) 及吲哚美辛 (Sigma Chemical Co.) 懸浮於甲基纖維素/Tween 中且藉由管飼法分別以 0.1 及 2 mg/kg 之劑量每日投藥兩次。2B5-8.0 及同型對照藉由腹膜內注射以 10 mg/kg 之劑量每日投與。在佐劑注射後第 15 天開始處理且繼續處理直至在第 21 天最終評估未經注射之對側爪的爪體積。每週兩次小心檢查小鼠的周圍關節中之關節炎的目測外觀，且確定疾病活動性之計分。

藉由引用的方式併入

本申請案全文可引用之所有引用參考文獻之內容(包括文獻參考案、專利、專利申請案及網站)係如其中所引用之參考文獻一般藉由全文引用的方式明確併入本文中。除非另外說明，否則本發明之實施將採用此項技術中熟知的免疫學、分子生物學及細胞生物學之習知技術。

相等物

本發明可在不悖離其精神或基本特徵之情況下以其他特定形式實施。前述實施例因此在所有態樣中說明而非限制本文所述之本發明。本發明之範疇因此由隨附申請專利範

圍而非前述描述指定，且因此意欲本文涵蓋屬於申請專利範圍相等物之含義及範圍內的所有變化。

【圖式簡單說明】

圖1提供在實例1.1.A中所述之ELISA中兩種融合瘤來源之mAb 15F10.3C9及1F7.1D5與生物素-PGE₂之結合的量測結果；

圖2提供在實例1.1.A中所述之ELISA中兩種融合瘤來源之mAb 19C9.4B10及4F10.3B9與生物素-PGE₂之結合的量測結果；

圖3提供在實例1.1.A中所述之ELISA中PROfusion™來源之mAb K1B、K7H、K3A、L11及L21與生物素-PGE₂之結合的量測結果；

圖4提供在實例1.1.A中所述之ELISA中重組抗PGE₂ mAb 2B5-7.0、2B5-8.0及2B5-9.0與生物素PGE₂之結合。融合瘤來源之抗體2B5在此檢定中為陽性對照；

圖5提供如實例1.1.C 1中所述藉由FLIPR所量測之抗PGE₂ mAb 2B5-8.0中和EP4轉染之HEK293 Gα16穩定細胞株中的PGE₂(25 pM)誘發之Ca⁺⁺流入。融合瘤來源之抗體2B5在此檢定中為陽性對照；

圖6提供如實例1.1.C 1中所述藉由FLIPR所量測之人類化抗PGE₂ mAb 2B5.5、2B5.6、2B5.7及2B5.8中和EP4轉染之HEK293 Gα16穩定細胞株中的PGE₂誘發之Ca⁺⁺流入；

圖7提供如實例1.1.C 1中所述藉由FLIPR所量測之人類化抗PGE₂ mAb 2B5.1、2B5.2、2B5.3及2B5.4中和EP4轉染之

HEK293 Gα16穩定細胞株中的PGE₂誘發之Ca⁺⁺流入；

圖8提供如實例3中所述之抗PGE₂抗體2B5.7、2B5.8及2B5.9之VH區與VL區的比對；及

圖9提供藉由MAS所量測之抗PGE₂抗體、抗鼠類TNF抗體及其組合在膠原蛋白誘發之關節炎模型中之功效(平均關節炎計分)。

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：98123109

※申請日：98.7.8

※IPC 分類：~~C07K~~, A61K ^{39/395} (2006.01)

C07K ^{16/28} (2006.01)

C12N ^{15/11} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

前列腺素E2結合蛋白及其用途

PROSTAGLANDIN E2 BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明涵蓋前列腺素E₂(PGE₂)結合蛋白。本發明係關於為野生型、嵌合、CDR移植及人類化抗體之抗體。較佳抗體對前列腺素E₂具有高親和力且可中和前列腺素E₂之活體外及活體內活性。本發明抗體可為全長抗體或其抗原結合部分。本發明亦提供本發明抗體之製備方法及使用方法。本發明抗體或抗原結合部分適用於偵測前列腺素E₂及例如在罹患前列腺素E₂活性有害之病症的人類個體中抑制前列腺素E₂活性。

三、英文發明摘要：

The present invention encompasses prostaglandin E₂ (PGE₂) binding proteins. The invention relates to antibodies that are wild-type, chimeric, CDR grafted and humanized. Preferred antibodies have high affinity for prostaglandin E₂ and neutralize prostaglandin E₂ activity *in vitro* and *in vivo*. An antibody of the invention can be a full-length antibody, or an antigen-binding portion thereof. Methods of making and methods of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antigen-binding portions, of the invention are useful for detecting prostaglandin E₂ and for inhibiting prostaglandin E₂ activity, *e.g.*, in a human subject suffering from a disorder in which prostaglandin E₂ activity is detrimental.

七、申請專利範圍：

1. 一種包含抗原結合域之CDR移植結合蛋白或其片段，該結合蛋白能夠結合PGE₂，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的CDR：
GYTFTKYWLG(SEQ ID NO: 54)、DIYPGYDYTHYNEKFKD (SEQ ID NO: 55)、SDGSSTY(SEQ ID NO: 56)、TSSQNIVHSNGNTYLE(SEQ ID NO: 57)、KVSNRFSG (SEQ ID NO: 58)、FQVSHVPYT(SEQ ID NO: 59)。
2. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段能夠調節前列腺素E₂之生物功能。
3. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段能夠中和前列腺素E₂。
4. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段能夠防止前列腺素E₂與前列腺素E₂受體EP1結合。
5. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段能夠防止前列腺素E₂與至少一種選自由EP1、EP2、EP3及EP4組成之群的前列腺素E₂受體結合。
6. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段結合前列腺素E₂，利用ELISA分析，具有選自由約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} M組成之群的EC₅₀。
7. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段抑制由於前列腺素E₂作用於前列腺素E₂受體EP4後所誘發之

鈣流入，以EP4受體介導之FLIPR分析，具有選自由約 1×10^{-6} 至約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-9} M、約 10^{-9} 至約 10^{-10} M、約 1×10^{-10} 至約 1×10^{-11} M及約 10^{-11} 至約 10^{-12} M組成之群的 IC_{50} 。

8. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白或其片段業經親和力熟化。
9. 一種包含抗原結合域之結合蛋白或其片段，該結合蛋白能夠結合前列腺素 E_2 ，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的CDR：SEQ ID NO: 6、7、8、10、11、12、14、15、16、18、19、20、22、23、26、27、28、30、31、32、34、35、37、38、39、54、55、56、57、58及59。
10. 一種包含抗原結合域之結合蛋白或其片段，該結合蛋白能夠結合前列腺素 E_2 ，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VH區：SEQ ID NO: 5、13、21、25、33、40、42及44。
11. 一種包含抗原結合域之結合蛋白或其片段，該結合蛋白能夠結合前列腺素 E_2 ，該抗原結合域包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VL區：SEQ ID NO: 9、17、24、29、36、41、43及45。
12. 一種包含抗原結合域之人類化結合蛋白或其片段，該結合蛋白能夠結合前列腺素 E_2 ，該抗原結合域包含至少一個包含選自由SEQ ID NO: 54-59組成之群之胺基酸序列的CDR區。

13. 如請求項9之結合蛋白，其中該結合蛋白包含至少3個 CDR。
14. 如請求項13之結合蛋白，其中該至少3個 CDR係選自由以下組成之群中選出的 VH CDR組：SEQ ID NO: 6、7及8；SEQ ID NO: 14、15及16；SEQ ID NO: 14、22及23；SEQ ID NO: 26、27及28；SEQ ID NO: 26、34及35；及SEQ ID NO: 54、55及56。
15. 如請求項13之結合蛋白，其中該至少3個 CDR係選自由以下組成之群中選出的 VL CDR組：SEQ ID NO: 10、11及12；SEQ ID NO: 18、19及20；SEQ ID NO: 30、31及32；SEQ ID NO: 37、38及39；SEQ ID NO: 57、58、59。
16. 如請求項13之結合蛋白，其中該至少3個 CDR包含具有SEQ ID NO: 54、55及56之胺基酸序列的 VH CDR組及/或具有SEQ ID NO: 57、58及59之胺基酸序列的 VL CDR組。
17. 如請求項9之結合蛋白，其中該結合蛋白包含至少兩個可變域 CDR組。
18. 如請求項17之結合蛋白，其中該至少兩個可變域 CDR組係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 6、7、8及SEQ ID NO: 10、11、12；SEQ ID NO: 14、15、16及SEQ ID NO: 18、19、20；SEQ ID NO: 14、22、23及SEQ ID NO: 10、11、12；SEQ ID NO: 26、27、28及SEQ ID NO: 30、31、32；SEQ ID NO: 26、34、35及SEQ ID

NO: 37、38、39；及SEQ ID NO: 54、55、56及SEQ ID NO: 57、58、59。

19. 一種與前列腺素E₂結合之人類化抗體或其片段，該人類化抗體包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VH區：SEQ ID NO: 60、62、64、66、68、70、72、74、76、78及80。
20. 一種與前列腺素E₂結合之人類化抗體或其片段，該人類化抗體包含至少一個包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的VL區：SEQ ID NO: 61、63、65、67、69、71、73、75、77、79及81。
21. 如請求項1之結合蛋白，其進一步包含人類受體構架。
22. 如請求項21之結合蛋白，其中該人類受體構架包含至少一個選自由SEQ ID NO: 46、47、48、49、50、51、52及53組成之群的胺基酸序列。
23. 如請求項21或22之人類化抗體，其中該人類受體構架包含至少一個選自由以下組成之群的構架區胺基酸取代：在重鏈可變區中位置48之M(人類)取代為I(小鼠)，位置68之V(人類)取代為A(小鼠)，位置70之M(人類)取代為L(小鼠)，及位置72之T(人類)取代為V(小鼠)；及在輕鏈可變區中位置2之I(人類)取代為V(小鼠)及位置3之V(人類)取代為L(小鼠)。
24. 如請求項19或20之人類化抗體，其中該至少一個VH區或至少一個VL區包含含有至少一個胺基酸取代之人類受體構架序列，其中該構架序列之胺基酸序列與該人類受體

構架序列之序列至少65%一致。

25. 如請求項23之人類化抗體，其中該人類受體構架在關鍵殘基處包含至少一個構架胺基酸取代，該關鍵殘基係選自由以下組成之群：與CDR相鄰之殘基、糖基化位點殘基、稀有殘基、能夠與前列腺素E₂相互作用之殘基、能夠與CDR相互作用之殘基、典型殘基、重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基、Vernier區內之殘基，及位於Chothia界定之可變重鏈CDR1與Kabat界定之第一重鏈構架之間重疊區域中的殘基。
26. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白包含兩個可變域，其中該兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:9；SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:17；SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:24；SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:29；SEQ ID NO:33及SEQ ID NO:36；SEQ ID NO:40及SEQ ID NO:41；SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43；及SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45。
27. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白包含兩個可變域，其中該兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:60及SEQ ID NO:61；SEQ ID NO:62及SEQ ID NO:63；SEQ ID NO:64及SEQ ID NO:65；SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67；SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69；SEQ ID NO:70及SEQ ID NO:71；SEQ ID NO:72及SEQ ID NO:73；SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75；SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77；SEQ ID NO:78及SEQ ID

NO:79；及SEQ ID NO:80及SEQ ID NO:81。

28. 一種包含如請求項1之結合蛋白之抗體構築體，該抗體構築體進一步包含連接子多肽或免疫球蛋白恆定域。
29. 如請求項28之抗體構築體，其中該結合蛋白係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、經雙硫鍵連接之Fv、單株抗體、scFv、嵌合抗體、單域抗體、CDR移植抗體、雙功能抗體、人類化抗體、多特異性抗體、Fab、雙重特異性抗體、Fab'、雙特異性抗體、F(ab')₂及Fv。
30. 如請求項28之抗體構築體，其中該結合蛋白包含選自由以下組成之群的重鏈免疫球蛋白恆定域：人類IgM恆定域、人類IgG4恆定域、人類IgG1恆定域、人類IgE恆定域、人類IgG2恆定域，及人類IgG3恆定域，及人類IgA恆定域。
31. 如請求項28之抗體構築體，其中該構築體包含具有選自由SEQ ID NO 1-4組成之群之胺基酸序列的免疫球蛋白恆定域。
32. 如請求項28之抗體構築體，其中該結合蛋白具有人類糖基化型態。
33. 如請求項28之抗體構築體，其中該抗體構築體為結晶化抗體構築體。
34. 如請求項33之抗體構築體，其中該結晶化抗體構築體為無載劑之醫藥控制釋放結晶化抗體構築體。
35. 如請求項34之抗體構築體，其中該抗體構築體相較該抗體構築體可溶性對應物在活體內具有較長之半衰期。

36. 如請求項34之抗體構築體，其中該抗體構築體保留生物活性。
37. 一種包含如請求項28之抗體構築體之抗體結合物，該抗體結合物進一步包含選自由免疫黏附分子、顯影劑、治療劑及細胞毒性劑組成之群的藥劑。
38. 如請求項37之抗體結合物，其中該藥劑為選自由放射性標記、酵素、螢光標記、冷光標記、生物冷光標記、磁性標記及生物素組成之群的顯影劑。
39. 如請求項37之抗體結合物，其中該顯影劑為選自由 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 及 ^{153}Sm 組成之群的放射性標記。
40. 如請求項37之抗體結合物，其中該藥劑為選自由抗代謝物、烷基化劑、抗生素、生長因子、細胞激素、抗血管生成劑、抗有絲分裂劑、蔥環黴素(anthracycline)、毒素及細胞凋亡劑組成之群的治療劑或細胞毒性劑。
41. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白為結晶化結合蛋白。
42. 如請求項41之結合蛋白，其中該結晶化結合蛋白為無載劑之醫藥控制釋放結晶化抗體。
43. 一種經分離核酸，其編碼如請求項1之結合蛋白。
44. 一種經分離核酸，其編碼如請求項28之抗體構築體。
45. 一種載體，其包含如請求項43或44之經分離核酸。
46. 如請求項45之載體，其中該載體係選自由pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pBJ及pA2組成之

群。

47. 一種宿主細胞，其包含如請求項45之載體。
48. 如請求項47之宿主細胞，其中該宿主細胞為原核細胞。
49. 如請求項48之宿主細胞，其中該宿主細胞為大腸桿菌(*E. coli*)。
50. 如請求項47之宿主細胞，其中該宿主細胞為真核細胞。
51. 如請求項50之宿主細胞，其中該真核細胞係選自由原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及真菌細胞組成之群。
52. 如請求項50之宿主細胞，其中該真核細胞為選自由哺乳動物細胞、禽類細胞及昆蟲細胞組成之群的動物細胞。
53. 如請求項50之宿主細胞，其中該宿主細胞為CHO細胞。
54. 如請求項50之宿主細胞，其中該宿主細胞為COS或HEK293。
55. 如請求項50之宿主細胞，其中該宿主細胞為酵母細胞。
56. 如請求項55之宿主細胞，其中該酵母細胞為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。
57. 如請求項47之宿主細胞，其中該宿主細胞為昆蟲Sf9細胞。
58. 一種產生能夠結合前列腺素E₂之蛋白質的方法，該方法包含在足以產生能夠結合前列腺素E₂之結合蛋白之條件下，在培養基中培養如請求項47之宿主細胞的步驟。
59. 一種蛋白質，其係根據如請求項58之方法產生。
60. 一種釋放結合蛋白之組合物，該組合物包含：
 - (a) 調配物，其中該調配物包含如請求項41之結晶化結

合蛋白，

(b) 成分；及

(c) 至少一種聚合載劑。

61. 如請求項60之組合物，其中該聚合載劑為選自由以下組成之群的聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酞)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)、聚(乙二醇)、聚((羥丙基)甲基丙烯酸醯胺)、聚[(有機)磷氮烯]、聚(原酸酯)、聚(乙醇醇)、聚(乙烯吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、氧化異丙烯多元醇類、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡糖、甘胺基聚糖、硫酸多糖，及其摻合物及/或共聚物。
62. 如請求項60之組合物，其中該成分係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。
63. 一種如請求項60之組合物之用途，其係用於製造治療患有前列腺素E₂活性有害之病症之哺乳動物的藥物。
64. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1之結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑。
65. 如請求項64之醫藥組合物，其中該醫藥學上可接受之載劑具有作為用於增加該結合蛋白之吸收或分散的佐劑之功能。

66. 如請求項65之醫藥組合物，其中該佐劑為玻尿酸酶。
67. 如請求項64之醫藥組合物，其進一步包含至少一種用於治療前列腺素E₂活性有害之病症的額外治療劑。
68. 如請求項67之醫藥組合物，其中該額外藥劑係選自由以下組成之群：治療劑、顯影劑、細胞毒性劑、血管生成抑制劑、激酶抑制劑、共刺激分子阻斷劑、黏附分子阻斷劑、抗細胞激素抗體或其功能片段、甲胺喋呤(methotrexate)、環孢黴素(cyclosporine)、雷帕黴素(rapamycin)、FK506、可偵測標記或報導體、TNF拮抗劑、抗風濕藥、肌肉鬆弛劑、麻醉藥、非類固醇消炎藥(NSAID)、止痛劑、麻醉劑、鎮靜劑、局部麻醉劑、神經肌肉阻斷劑、抗微生物劑、抗牛皮癬藥、皮質類固醇、同化類固醇、紅血球生成素、免疫劑、免疫球蛋白、免疫抑制劑、生長激素、激素替代藥物、放射性藥品、抗抑鬱劑、抗精神病藥物、興奮劑、哮喘藥物、β促效劑、吸入類固醇、口服類固醇、腎上腺素或其類似物、細胞激素及細胞激素拮抗劑。
69. 一種降低前列腺素E₂活性之活體外方法，該方法包含使前列腺素E₂與如請求項1之結合蛋白接觸，以使得前列腺素E₂活性降低之步驟。
70. 一種如請求項1之結合蛋白之用途，其係用於製造降低罹患前列腺素E₂活性有害之病症之人類個體中前列腺素E₂活性的藥物。
71. 一種如請求項1之結合蛋白之用途，其係用於製造治療

個體之至少一種前列腺素E₂活性有害之疾病或病症的藥物。

72. 如請求項71之用途，其中該病症係選自由以下組成之群：自體免疫疾病、發炎性疾病、腫瘤、類風濕性關節炎、過敏性關節炎、格-巴氏症候群(Guillain Barre syndrome)、感染性單核白血球增多症、病毒性淋巴腺病、疱疹病毒感染、多發性硬化症、脫髓鞘疾病、血液病、溶血性貧血、血小板減少症、內分泌病症、糖尿病、艾迪森氏病(Addison's disease)、特發性副甲狀腺低能症、慢性淋巴細胞性甲狀腺炎、膠原蛋白病變、全身性紅斑狼瘡症、生殖障礙、閉經、不孕症、反覆性流產、驚厥、頭頸部腫瘤、肺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、胃腸器官疾病、發炎性腸病、潰瘍性結腸炎、克隆氏病(Crohn's disease)、疼痛、與骨關節炎有關之疼痛、眼病及年齡相關之黃斑退化。
73. 如請求項71之用途，其中該病症係選自由以下組成之群：類風濕性關節炎、骨關節炎、青少年慢性關節炎、膿毒性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑狼瘡症、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、發炎性腸病、胰島素依賴性糖尿病、甲狀腺炎、哮喘、過敏性疾病、牛皮癬、皮膚炎性硬皮病、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反應、與器官移植有關之急性或慢性免疫疾病、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、散播性血管內凝血、川崎氏病

(Kawasaki's disease)、格雷夫氏病(Grave's disease)、腎病症候群、慢性疲勞症候群、華格納氏肉芽病(Wegener's granulomatosis)、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schoenlein purpura)、腎臟之微觀脈管炎、慢性活動型肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、中毒性休克症候群、膿毒病症候群、惡病質、感染性疾病、寄生蟲病、後天免疫缺乏症候群、急性橫貫性脊髓炎、亨廷頓氏舞蹈病(Huntington's chorea)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、中風、原發性膽汁性肝硬化、溶血性貧血、惡性疾病、心臟衰竭、心肌梗塞、艾迪森氏病、偶發性I型多腺低減及II型多腺低減、史密特氏症候群(Schmidt's syndrome)、成人(急性)呼吸窘迫症候群、禿頭症、斑禿、血清陰性關節病、關節病、萊特爾氏病(Reiter's disease)、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸炎性關節病、腸病性滑膜炎、披衣菌、耶氏桿菌(yersinia)及沙門氏菌(salmonella)相關之關節病、脊椎關節病、動脈粥樣化病/動脈硬化症、特異體質過敏症、自體免疫性水皰病、尋常天庖瘡、落葉狀天庖瘡、類天庖瘡、線狀IgA病、自體免疫性溶血性貧血、庫氏試驗陽性溶血性貧血(Coombs positive haemolytic anaemia)、後天惡性貧血、青少年惡性貧血、肌痛性腦炎/皇家自由病(Royal Free Disease)、慢性皮膚黏膜念珠菌病、巨細胞動脈炎、原發性硬化性肝炎、隱源性自體免疫性肝炎、後天免疫缺乏疾病症候

群、後天免疫缺乏相關疾病、B型肝炎、C型肝炎、普通易變型免疫缺乏(普通易變型低丙球蛋白血症)、擴張性心肌病、女子不孕症、卵巢功能衰竭、卵巢早衰、纖維化肺病、隱源性致纖維性肺泡炎、發炎後間質性肺病、間質性肺炎、結締組織病相關之間質性肺病、混合結締組織病相關之肺病、全身性硬化症相關之間質性肺病、類風濕性關節炎相關之間質性肺病、全身性紅斑狼瘡症相關之肺病、皮膚炎/多肌炎相關之肺病、休格連氏病相關之肺病(Sjögren's disease associated lung disease)、關節黏連性脊椎炎相關之肺病、脈管炎性彌漫性肺病、血黃素沈積症相關之肺病、藥物誘發之間質性肺病、纖維化、放射性纖維化、閉塞性細支氣管炎、慢性嗜伊紅血球性肺炎、淋巴細胞浸潤性肺病、感染後間質性肺病、痛風性關節炎、自體免疫性肝炎、1型自體免疫性肝炎(經典自體免疫或類狼瘡性肝炎)、2型自體免疫性肝炎(抗LKM抗體肝炎)、自體免疫介導之低血糖症、B型胰島素抗性伴發黑色棘皮病、副甲狀腺低能症、與器官移植有關之急性免疫疾病、與器官移植有關之慢性免疫疾病、非炎性骨關節病、原發性硬化性膽管炎、1型牛皮癬、2型牛皮癬、特發性白血球減少病、自體免疫性嗜中性球減少症、腎病NOS、腎小球腎炎、腎臟之微觀脈管炎、萊姆病(lyme disease)、盤狀紅斑狼瘡、特發性男性不孕症或NOS、精子自體免疫、多發性硬化症(所有次型)、交感性眼炎、結締組織病繼發之肺性高血壓、古巴

士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、結節性多動脈炎之肺部表現、急性風濕熱、類風濕性脊椎炎、斯蒂爾病(Still's disease)、全身性硬化症、休格連氏症候群、高安氏病(Takayasu's disease)/動脈炎、自體免疫性血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進症、甲狀腺腫性自體免疫性甲狀腺低能症(橋本氏病(Hashimoto's disease))、萎縮性自體免疫性甲狀腺低能症、原發性黏液水腫、晶狀體源性葡萄膜炎、原發性脈管炎、白斑病急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精誘發之肝損傷、膽汁淤積、特質性肝病、藥物誘發之肝炎、非酒精性脂肪變性肝炎、過敏症及哮喘、B族鏈球菌(GBS)感染、精神障礙(例如抑鬱症及精神分裂症)、Th2型及Th1型介導之疾病、急性及慢性疼痛(不同形式之疼痛)、及諸如肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌及直腸癌之癌症及造血系統惡性疾病(白血病及淋巴瘤)、無 β 脂蛋白血症、手足發紺、急性及慢性寄生或感染過程、急性白血病、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、急性或慢性細菌感染、急性胰腺炎、急性腎衰竭、腺癌、心房異位搏動、AIDS癡呆複合症、酒精誘發之肝炎、過敏性結膜炎、過敏性接觸性皮膚炎、過敏性鼻炎、同種異體移植排斥反應、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、肌肉萎縮性側索硬化、貧血、心絞痛、前角細胞退化、抗cd3療法、抗磷脂症候群、抗受體過敏反應、主

動脈及周圍動脈瘤、主動脈剝離、動脈性高血壓、動脈硬化症、動靜脈瘤、共濟失調、心房微顫(持續性或陣發性)、心房撲動、房室傳導阻滯、B細胞淋巴瘤、骨移植排斥反應、骨髓移植(BMT)排斥反應、束枝傳導阻滯、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、燒傷、心律不整、心臟頓抑症候群、心臟腫瘤、心肌病、心肺分流發炎反應、軟骨移植排斥反應、小腦皮質退化、小腦病症、紊亂性或多源性房性心動過速、與化學療法有關之病症、慢性髓細胞白血病(CML)、慢性酒精中毒、慢性發炎症性病變、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性阻塞性肺病(COPD)、慢性水楊酸中毒、結腸直腸癌、充血性心臟衰竭、結膜炎、接觸性皮膚炎、肺原性心臟病、冠狀動脈疾病、庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、培養物陰性敗血症、囊腫性纖維化、細胞激素療法相關之病症、拳擊員癡呆、脫髓鞘疾病、登革出血熱(dengue hemorrhagic fever)、皮膚炎、皮膚病病狀、糖尿病(diabete)、糖尿病(diabetes mellitus)、糖尿病性動脈硬化病、泛發性路易體疾病(Diffuse Lewy body disease)、擴張型充血性心肌病、基底神經節病症、中年唐氏症候群(Down's Syndrome in middle age)、由阻斷CNS多巴胺受體之藥物誘發的藥物誘發之運動障礙、藥物敏感、濕疹、腦脊髓炎、心內膜炎、內分泌病、會厭炎、EB病毒感染(epstein-barr virus infection)、肢端紅痛症、錐體外及小腦病症、家族性噬血性淋巴組織細胞增殖症、胚胎

胸腺移植排斥反應、弗立特里希氏共濟失調(Friedreich's ataxia)、功能性周圍動脈病症、真菌性敗血症、氣性壞疽、胃潰瘍、腎小球腎炎、任何器官或組織的移植物排斥反應、革蘭氏陰性敗血症、革蘭氏陽性敗血症、胞內生物體引起之肉芽腫、毛細胞白血病、哈勒沃登-施帕茨病(Hallerrorden-Spatz disease)、喬本氏甲狀腺炎(hashimoto's thyroiditis)、花粉熱、心臟移植排斥反應、血色素沈著症、血液透析、溶血性尿毒癥候群/溶栓性血小板減少性紫癍、出血、肝炎(A)、希氏束心律不整(His bundle arrhythmias)、HIV感染/HIV神經病、霍奇金病(Hodgkin's disease)、運動過度病症、過敏反應、過敏性肺炎、高血壓、運動功能減退病症、下丘腦-垂體-腎上腺軸評估、特發性艾迪森氏病、特發性肺纖維化、抗體介導之細胞毒性、無力、嬰兒脊髓性肌萎縮症、主動脈發炎的a型流感、電離輻射曝露、虹膜睫狀體炎/葡萄膜炎/視神經炎、缺血再灌注損傷、缺血性中風、青少年類風濕性關節炎、青少年脊髓性肌萎縮症、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、腎臟移植排斥反應、退伍軍人桿菌(leigionella)、利什曼體病(leishmaniasis)、麻風病、皮質脊髓系統病變、脂性水腫、肝移植排斥反應、淋巴水腫、瘧疾、惡性淋巴瘤、惡性組織球病、惡性黑素瘤、腦膜炎、腦膜炎球菌血症、代謝性/特發性偏頭痛、粒線體複合系統病症、混合結締組織病、單株球蛋白症、多發性骨髓瘤、多系統退化(Mencel Dejerine-Thomas Shi-

Drager及Machado-Joseph)、重症肌無力、胞內鳥型分枝桿菌(*mycobacterium avium intracellulare*)、結核分枝桿菌(*mycobacterium tuberculosis*)、骨髓發育不良症候群、心肌梗塞、心肌缺血病症、鼻咽癌、新生兒慢性肺病、腎炎、腎病、神經退化性疾病、I型神經性肌肉萎縮、中性白血球減少性發熱、非霍奇金淋巴瘤(*non-Hodgkins lymphoma*)、腹主動脈及其分支堵塞、阻塞性動脈病症、okt3療法、睪丸炎/副睪丸炎、睪丸炎/輸精管切除逆轉程序、內臟增大、骨質疏鬆症、胰腺移植排斥反應、胰腺癌、腫瘤相關症候群/惡性高血鈣症、副甲狀腺移植排斥反應、盆腔發炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、周圍動脈粥樣硬化疾病、周圍血管疾病、腹膜炎、惡性貧血、卡氏肺囊蟲肺炎(*pneumocystis carinii pneumonia*)、肺炎、POEMS症候群(多發性神經病、內臟增大、內分泌病、單株球蛋白症及換膚症候群)、灌注後症候群、泵後症候群、MI心切開術後症候群、先兆驚厥、進行性核上性麻痺、原發性肺性高血壓、放射療法、雷諾現象(*Raynaud's phenomenon*)及疾病、雷諾病、雷夫蘇姆氏病(*Refsum's disease*)、規則狹窄QRS心動過速、腎血管性高血壓、再灌注損傷、限制型心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、路易體型老年癡呆(*Senile Dementia of Lewy body type*)、血清陰性關節病、休克、鐮形細胞性貧血、皮膚同種異體移植排斥反應、換膚症候群、小腸移植排斥反應、實體腫瘤、特異性心律不

整、脊髓性共濟失調、脊髓小腦退化、鏈球菌肌炎、小腦結構病變、亞急性硬化泛腦炎、昏厥、心血管系統梅毒、全身性過敏、全身性發炎反應症候群、全身發作型青少年類風濕性關節炎、T細胞或FAB ALL、毛細管擴張、血栓閉塞性血管炎、血小板減少症、中毒、移植、外傷/出血、III型過敏反應、IV型過敏、不穩定型心絞痛、尿毒癥、尿膿毒病、蕁麻疹、心臟瓣膜病、靜脈曲張、脈管炎、靜脈疾病、靜脈栓塞、心室纖維性顫動、病毒及真菌感染、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎、病毒相關之噬血症候群、韋尼克-科爾薩科夫症候群(Wernicke-Korsakoff syndrome)、威爾遜氏病(Wilson's disease)、任何器官或組織的異種移植物排斥反應、急性冠狀動脈症候群、急性特發性多發性神經炎、急性發炎性脫髓鞘性多神經根神經病、急性缺血、成人斯蒂爾病(Adult Still's Disease)、斑禿、過敏症、抗磷脂抗體症候群、再生不全性貧血、動脈硬化症、特應性濕疹、異位性皮膚炎、自體免疫性皮膚炎、與鏈球菌感染有關之自體免疫病症、自體免疫性腸病、自體免疫性聽力損失、自身免疫性淋巴增生性症候群(ALPS)、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢早衰、睪炎、支氣管擴張、大皰性類天疱瘡、心血管疾病、災難性抗磷脂症候群、乳糜瀉、頸椎關節黏連、慢性缺血、癩痕性類天疱瘡、具有多發性硬化症風險之臨床孤立症候群(CIS)、結膜炎、兒童期初發型精神異常、慢性阻塞性肺病(COPD)、淚囊炎、皮膚

炎、糖尿病性視網膜病變、糖尿病、椎間盤突出症、盤脫垂、藥物誘發之免疫性溶血性貧血、心內膜炎、子宮內膜異位、眼內炎、上鞏膜炎、多形性紅斑、重症多形性紅斑、妊娠期類天疱瘡、格-巴二氏症候群(Guillain-Barré Syndrome)(GBS)、花粉熱、休斯症候群(Hughes Syndrome)、特發性帕金森氏病、特發性間質性肺炎、IgE介導之過敏症、免疫性溶血性貧血、包涵體肌炎、感染性眼部發炎疾病、發炎性脫髓鞘疾病、發炎性心臟病、發炎性腎病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、乾眼症、庫斯病(Kussmaul disease)或庫斯-麥爾病(Kussmaul-Meier Disease)、蘭德里麻痺(Landry's Paralysis)、朗格漢氏細胞組織球病(Langerhan's Cell Histiocytosis)、網狀青斑、黃斑變性、顯微性多血管炎、白赫鐵列夫症(Morbus Bechterev)、運動神經元病症、黏膜類天疱瘡、多器官衰竭、重症肌無力、骨髓發育不良症候群、心肌炎、神經根病症、神經病、非A非B型肝炎、視神經炎、骨質溶解、少關節型青少年類風濕性關節炎(Pauciarticular JRA)、周圍動脈閉塞性疾病(PAOD)、周圍血管疾病(PVD)、周圍動脈疾病(PAD)、靜脈炎、結節性多動脈炎(或結節性動脈周圍炎)、多軟骨炎、風濕性多肌痛、白髮症、多關節型JRA、多發性內分泌缺乏症候群、多發性肌炎、風濕性多肌痛(PMR)、泵後症候群、原發性帕金森氏症、前列腺炎、純紅細胞發育不全、原發性腎上腺機能不全、復發性視神經脊髓炎、再

狹窄、風濕性心臟病、SAPHO(滑膜炎、痤瘡、膿皰病、骨肥厚及骨炎)、硬皮病、繼發性澱粉樣變性病、休克肺、鞏膜炎、坐骨神經痛、繼發性腎上腺機能不全、聚矽氧相關之結締組織疾病、角層下膿皰性皮膚病(Sneddon-Wilkinson Dermatitis)、關節黏連性脊椎炎、帝文生氏-強生症候群(SJS)、全身性發炎反應症候群、顳動脈炎、弓形蟲性視網膜炎、中毒性表皮壞死溶解、橫貫性脊髓炎、TRAPS(腫瘤壞死因子受體)、I型過敏反應、II型糖尿病、蕁麻疹、尋常性間質肺炎(UIP)、脈管炎、春季結膜炎、病毒性視網膜炎、沃格特-小柳-原田症候群(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome)(VKH症候群)、濕式黃斑變性及傷口癒合。

74. 一種如請求項1之結合蛋白之用途，其係用於製造治療罹患前列腺素E₂有害之病症之患者的藥物，其中該藥物係在投與第二藥劑之前、同時或之後投與，其中該第二藥劑係選自由以下組成之群：選自由以下組成之群的類風濕性關節炎或青少年類風濕性關節炎藥物：甲胺喋呤、來氟米特(leflunomide)、低劑量皮質類固醇、普賴蘇(prednisone)、皮質酮(cortisone)、抗瘡疾藥物羥基氯化奎寧(hydroxychloroquine)、金、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、青黴胺(penicillamine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、環孢黴素、二甲胺四環素(minocycline)、乙醯胺苯酚(acetaminophen)、阿司匹靈(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、賽利

克西 (celecoxib)、英利昔單抗 (Infliximab)、依那西普 (etanercept)、阿達木單抗 (adalimumab)、阿巴西普 (abatacept)、利妥昔單抗 (rituximab)、阿那白滯素 (anakinra)、靶向 IL-6、IL-6R、IL-17、IL-18、IL-23 及 B7.1/B7.2 之生物劑及經口傳遞藥劑；選自由以下組成之群的骨關節炎藥物：乙醯胺苯酚、阿司匹靈、布洛芬、萘普生、賽利克西、類固醇、人造關節液欣維可 (synvisc) 及膝爾康 (hyalgan)；選自由以下組成之群的克隆氏病藥物：阿達木單抗、咪唑硫嘌呤錠 (azasan)、阿薩克 (asacol)、硫唑嘌呤 (azathioprine)、磺胺塞拉金 (azulfidine)、布地縮松 (budesonide)、依託科特 (entocort)、滅滴靈 (flagyl)、移護寧 (imuran)、英利昔單抗、巯嘌呤 (mercaptopurine)、甲硝噻唑 (metronidazole)、普洛托斯他 (protostat)、巯基嘌呤 (purinethol)、瑞米卡德 (remicade) 及柳氮磺胺吡啶；選自由以下組成之群的關節黏連性脊椎炎藥物：阿西脫克 (acetocot)、乙醯水楊酸、阿卡普林 81 (acuprin 81)、阿達木單抗、阿立伏 (aleve)、阿姆闊 (amcort)、阿那普西 (anaprox)、阿瑞斯托闊 (aristocort)、阿司匹靈、阿斯皮塔 (aspirtab)、阿紮馬闊 (azmacort)、百服寧 (bufferin)、巴福克斯 (buffex)、凱扶蘭 (cataflam)、西樂葆 (celebrex)、速免痛 (clinoril)、皮質酮、雙氯芬酸 (diclofenac)、地泊坦 (dipentum)、艾斯普林 (easprin)、依那西普、吲哚辛 (indocin)、吲哚美辛 (indomethacin)、英

利昔單抗、萘普生、瑞米卡德、曲安西龍 (triamcinolone) 及服他寧 (voltage)；選自由以下組成之群的多發性硬化症藥物：阿凡尼西 (Avonex)、咪唑硫嘌呤、硫唑嘌呤、倍泰龍 (Betaseron)、布比普瑞 (Bubli-Pred)、克帕松 (Copaxone)、扣托隆 (Cotolone)、格拉默 (Glatiramer)、移護寧、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b 溶液、凱普瑞 (Key-Pred)、凱普瑞 SP (Key-Pred SP)、米托蒽醌 (Mitoxantrone)、那他珠單抗 (Natalizumab)、那凡曲隆 (Novantrone)、奧拉普德 (Orapred)、奧拉普德 ODT、培地普德 (Pediapred)、普瑞傑特 50 (Pred-Ject-50)、普瑞達闊 50 (Predacort 50)、普瑞達龍 50 (Predalone 50)、普瑞德特 50 (Predate-50)、潑尼龍 (Prednisolone)、普瑞隆 (Prelone)、利比 (Rebif) 及泰沙比瑞 (Tysabri)；選自由以下組成之群的癌症或惡性疾病藥物：阿百先 (Abraxane)、阿德力黴素 (Adriamycin)、阿杜西 (Aducril)、艾達樂 (Aldara)、阿倫單抗 (Alemtuzumab)、力比泰 (Alimta)、胺基乙醯丙酸、安美達錠 (Anastrozole)、阿瑞匹坦 (Aprepitant)、瑞寧德 (Arimidex)、阿諾新 (Aromasin)、阿倫恩 (Arranon)、三氧化二砷、阿瓦斯汀 (Avastin) (貝伐單抗 (Bevacizumab))、阿紫胞苷 (Azacitidine)、貝伐單抗、蓓薩羅丁 (Bexarotene)、硼替佐米 (Bortezomib)、坎帕斯 (Campath) (阿倫單抗)、坎普托斯塔 (Camptosar) (鹽酸伊立替康 (Irinotecan Hydrochloride))、卡培他濱

(Capecitabine)、卡鉑 (Carboplatin)、西妥昔單抗 (Cetuximab)、順鉑 (Cisplatin)、卡拉芬 (Clafen)(環磷醯胺)、氟伐拉濱 (Clofarabine)、科洛法瑞 (Clofarex)(氟伐拉濱)、科羅拉 (Clolar)(氟伐拉濱)、環磷醯胺、阿糖胞苷 (Cytarabine)、賽德薩-U (Cytosar-U)(阿糖胞苷)、賽托先 (Cytoxan)(環磷醯胺)、達珂 (Dacogen)(地西他濱 (Decitabine))、達沙替尼 (Dasatinib)、地西他濱、蒂潑西 (DepoCyt)(脂質阿糖胞苷)、蒂潑福馬 (DepoFoam)(脂質阿糖胞苷)、鹽酸右雷佐生 (Dexrazoxane Hydrochloride)、多西他賽 (Docetaxel)、多昔 (Doxil)(鹽酸多柔比星脂質體 (Doxorubicin Hydrochloride Liposome))、鹽酸多柔比星、鹽酸多柔比星脂質體、Dox-SL(鹽酸多柔比星脂質體)、艾福德 (Efudex)(氟尿嘧啶 (Fluorouracil))、艾倫斯 (Ellence)(鹽酸表柔比星 (Epirubicin Hydrochloride))、樂沙定 (Eloxatin)(奧沙利鉑 (Oxaliplatin))、艾蒙德 (Emend)(阿瑞匹坦)、鹽酸表柔比星、愛必妥 (Erbitux)(西妥昔單抗)、鹽酸埃羅替尼 (Erlotinib Hydrochloride)、艾伐昔特 (Evacet)(鹽酸多柔比星脂質體)、艾維斯達 (Evista)(鹽酸雷洛昔芬 (Raloxifene Hydrochloride))、依西美坦 (Exemestane)、伐斯洛德 (Faslodex)(氟維斯群 (Fulvestrant))、非馬拉 (Femara)(來曲唑 (Letrozole))、氟洛普雷 (Fluoroplex)(氟尿嘧啶)、氟尿嘧啶、氟維斯群、吉非替尼 (Gefitinib)、鹽酸吉西他濱 (Gemcitabine Hydrochloride)、吉妥單抗奧

唑米星 (Gemtuzumab Ozogamicin)、健擇 (Gemzar)(鹽酸吉西他濱)、格列衛 (Gleevec)(甲磺酸伊馬替尼 (Imatinib Mesylate))、赫賽汀 (Herceptin)(曲妥珠單抗 (Trastuzumab))、和美新 (Hycamtin)(鹽酸拓撲替康 (Topotecan Hydrochloride))、甲磺酸伊馬替尼、咪喹莫特 (Imiquimod)、易瑞沙 (Iressa)(吉非替尼)、鹽酸伊立替康、伊沙匹隆 (Ixabepilone)、埃坡黴素 (Ixempra)(伊沙匹隆 (Ixabepilone))、克奧昔芬 (Keoxifene)(鹽酸雷洛昔芬)、克皮凡昔 (Kepivance)(帕麗非明 (Palifermin))、二甲苯磺酸拉帕替 (Lapatinib Ditosylate)、來那度胺 (Lenalidomide)、來曲唑、雷戊蘭 (Levulan)(胺基乙醯丙酸)、立波杜 (LipoDox)(鹽酸多柔比星脂質體)、脂質阿糖胞苷、美賽唑斯通 (Methazolastone)(替莫唑胺 (Temozolomide))、美洛沙 (Mylosar)(阿紫胞苷)、麥羅塔 (Mylotarg)(吉妥單抗奧唑米星)、奈米粒子太平洋紫杉醇 (Paclitaxel)(太平洋紫杉醇白蛋白穩定化奈米粒子調配物)、奈拉濱 (Nelarabine)、尼奧沙 (Neosar)(環磷醯胺)、多吉美 (Nexavar)(甲苯磺酸索拉非尼 (Sorafenib Tosylate))、尼羅替尼 (Nilotinib)、諾瓦得士 (Nolvadex)(檸檬酸他莫昔芬 (Tamoxifen Citrate))、恩卡斯巴 (Oncaspar)(培門冬酶 (Pegaspargase))、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、太平洋紫杉醇白蛋白穩定化奈米粒子調配物、帕麗非明 (Palifermin)、帕尼單抗 (Panitumumab)、帕拉普拉 (Paraplat)(卡鉑)、伯爾定 (Paraplatin)(卡鉑)、

培門冬酶、培美曲塞二鈉(Pemetrexed Disodium)、帕拉提諾-AQ(Platinol-AQ)(順鉑)、帕拉提諾(Platinol)(順鉑)、鹽酸雷洛昔芬、雷利米得(Revlimid)(來那度胺)、美羅華(Rituxan)(利妥昔單抗(Rituximab))、利妥昔單抗、司蘭索胸膜內氣溶膠(Sclerosol Intrapleural Aerosol)(滑石粉)、甲苯磺酸索拉非尼、撲瑞賽(Sprycel)(達沙替尼)、無菌滑石粉(滑石粉)、斯特瑞托克(Steritalc)(滑石粉)、蘋果酸舒尼替尼(Sunitinib Malate)、舒坦特(Sutent)(蘋果酸舒尼替尼)、賽諾維(Synovir)(沙立度胺(Thalidomide))、滑石粉、檸檬酸他莫昔芬、塔拉賓PFS(Tarabine PFS)(阿糖胞苷)、特羅凱(Tarceva)(鹽酸埃羅替尼)、塔革雷汀(Targretin)(蓓薩羅丁(Bexarotene))、塔賽格納(Tasigna)(尼羅替尼)、紫杉酚(Taxol)(太平洋紫杉醇)、泰素帝(Taxotere)(多西他賽)、替莫達(Temodar)(替莫唑胺)、替莫唑胺、坦西莫司(Temsirolimus)、賽羅密德(Thalomid)(沙立度胺)、沙立度胺、托泰克(Totect)(鹽酸右雷佐生)、鹽酸拓撲替康、馱瑞塞爾(Torisel)(坦西莫司)、曲妥珠單抗、三森諾(Trisenox)(三氧化二砷)、泰克布(Tykerb)(二甲苯磺酸拉帕替)、維克替比(Vectibix)(帕尼單抗)、萬珂(Velcade)(硼替佐米)、維達紫(Vidaza)(阿紫胞苷)、伏立諾他(Vorinostat)、希羅達(Xeloda)(卡培他濱)、辛卡德(Zinecard)(鹽酸右雷佐生)、唑來膦酸(Zoledronic Acid)、唑林紫(Zolinza)(伏立諾他)及擇泰(Zometa)(唑來

磷酸)。

75. 如請求項74之用途，其中該藥物係藉由至少一種選自以下之模式投與：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、大腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸腔內、子宮內、膀胱內、快速注射、陰道、直腸、經頰、舌下、鼻內及經皮。
76. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合前列腺素E₂，且以細胞表面受體為基礎之結合分析中，以具有選自由以下組成之群的IC₅₀抑制前列腺素E₂與E1、E2、E3及E4受體中之至少一者的結合：約 1×10^{-6} 至 1×10^{-7} M、 1×10^{-7} 至 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} 至 1×10^{-9} M、 10^{-9} 至 10^{-10} M、 1×10^{-10} 至 1×10^{-11} M及 10^{-11} 至 10^{-12} M，或以ELISA為基礎之受體結合分析中，以具有選自由以下組成之群的IC₅₀抑制前列腺素E₂與E1、E2、E3及E4受體中之至少一者的結合：約 1×10^{-6} 至 1×10^{-7} M、 1×10^{-7} 至 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} 至 1×10^{-9} M、 10^{-9} 至 10^{-10} M、 1×10^{-10} 至 1×10^{-11} M及 10^{-11} 至 10^{-12} M。
77. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合PGE₂且在選自由以下組成之群的疾病模型中抑制PGE₂活性達約50%：角叉菜膠誘發之爪水腫模型、角叉菜膠誘發之痛覺過敏模型、膠原蛋白誘發之關

節炎模型及佐劑誘發之關節炎模型。

78. 如請求項77之抗體，其中該抗體在選自由以下組成之群的疾病模型中抑制PGE₂活性達約70%：角叉菜膠誘發之爪水腫模型、角叉菜膠誘發之痛覺過敏模型、膠原蛋白誘發之關節炎模型及佐劑誘發之關節炎模型。
79. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合PGE₂且在選自由以下組成之群的疾病模型中抑制發炎達約90%：角叉菜膠誘發之爪水腫模型、角叉菜膠誘發之痛覺過敏模型、膠原蛋白誘發之關節炎模型及佐劑誘發之關節炎模型。
80. 如請求項77之抗體，其中該抗體為2B5。
81. 一種經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合前列腺素E₂，且以細胞表面受體為基礎之結合分析中或以ELISA為基礎之受體結合分析中，在約100 nM之濃度下，抑制前列腺素E₂與E₁、E₂、E₃及E₄受體中之至少一者的結合達約70-100%。
82. 如請求項81之抗體，其中該抗體係選自由19C9、4F10、15F10、K1B、K7H、K3A、L11、L21、2B5-7.0、2B5-8.0及2B5-9.0組成之群。
83. 如請求項81之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段能夠調節前列腺素E₂之生物功能。
84. 如請求項81之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段能夠中和前列腺素E₂。
85. 如請求項81之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其

抗原結合片段係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、經雙硫鍵連接之Fv、scFv、單域抗體、雙功能抗體、多特異性抗體、雙重特異性抗體及雙特異性抗體。

86. 如請求項81之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為人類化抗體。
87. 一種醫藥組合物，其包含如請求項81之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。
88. 如請求項87之醫藥組合物，其進一步包含至少一種用於治療前列腺素E₂活性有害之病症的額外治療劑。
89. 一種產生與前列腺素E₂結合之抗體或其片段之方法，該方法包含以下步驟：以前列腺素E₂-甲狀腺球蛋白免疫非人類動物，收集包含抗前列腺素E₂抗體之體液或器官，及分離該抗前列腺素E₂抗體。
90. 一種包含抗原結合域之人類化抗體，該人類化抗體能夠結合前列腺素E₂，該抗原結合域包含至少一個包含選自由SEQ ID NO: 54-59組成之群之胺基酸序列的CDR區。
91. 一種包含抗原結合域之人類化抗體，該人類化抗體能夠結合前列腺素E₂，該抗原結合域包含至少一個包含與選自由SEQ ID NO: 54-59組成之群的胺基酸序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或至少約98%同源之胺基酸序列的CDR區。

92. 如請求項1之結合蛋白，其中該結合蛋白係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、經雙硫鍵連接之Fv、單株抗體、scFv、嵌合抗體、單域抗體、CDR移植抗體、雙功能抗體、人類化抗體、多特異性抗體、Fab、雙重特異性抗體、Fab'、雙特異性抗體、F(ab')₂及Fv。

八、圖式：

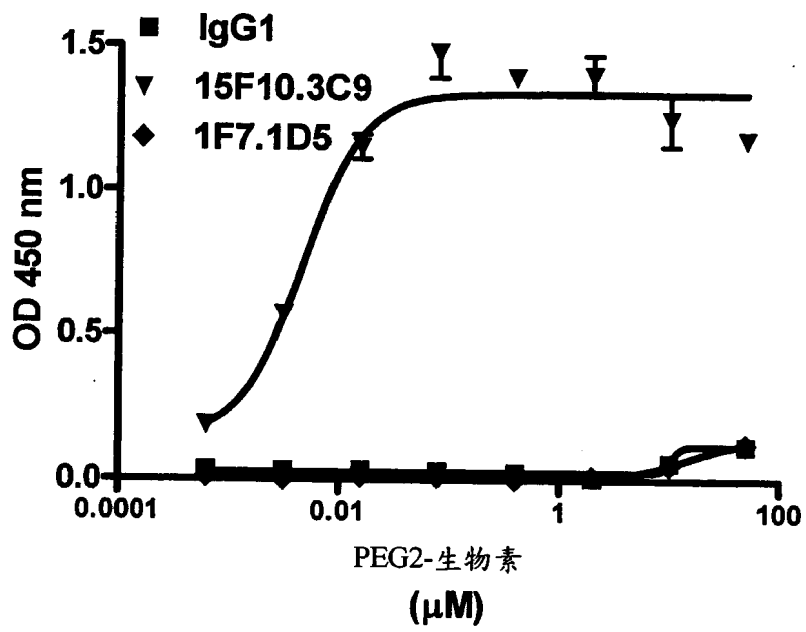


圖 1

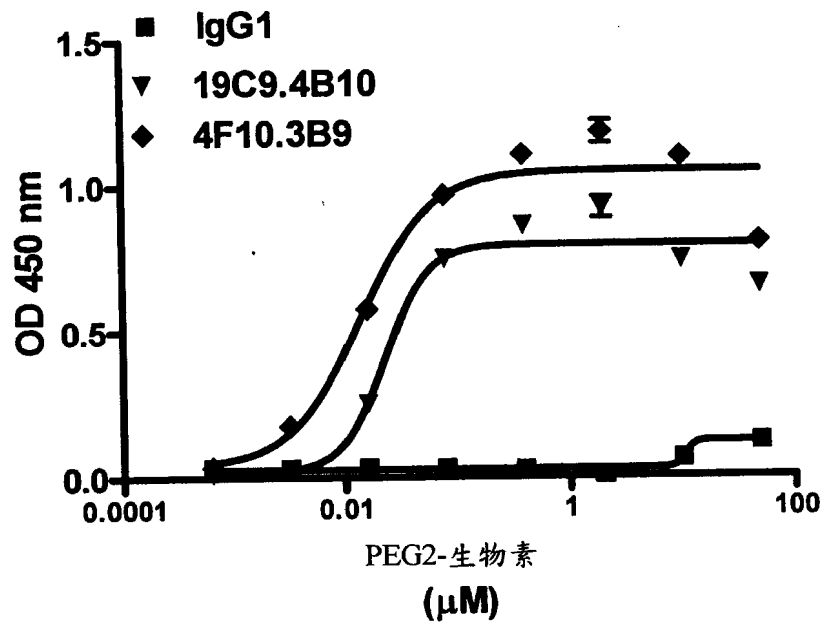


圖2

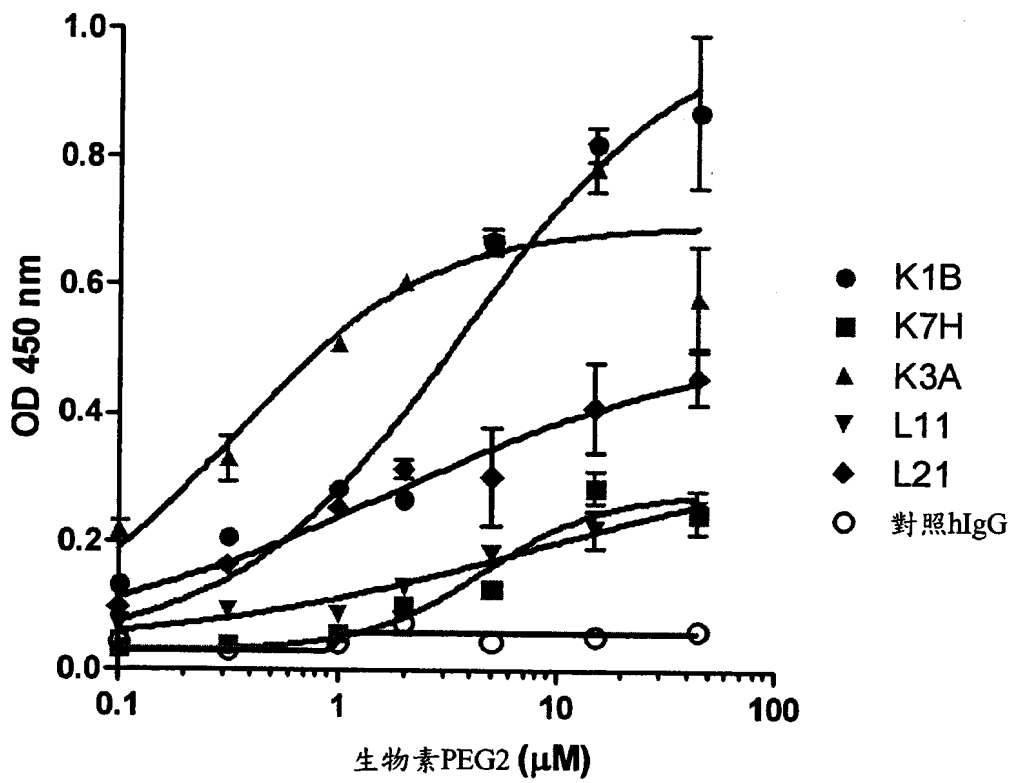


圖3

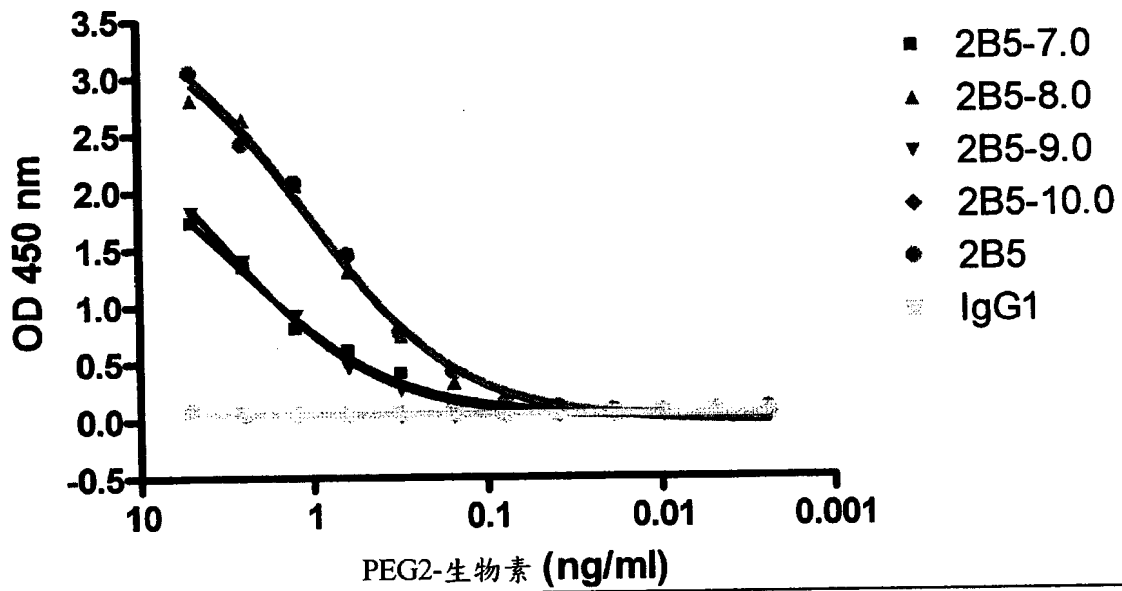


圖4

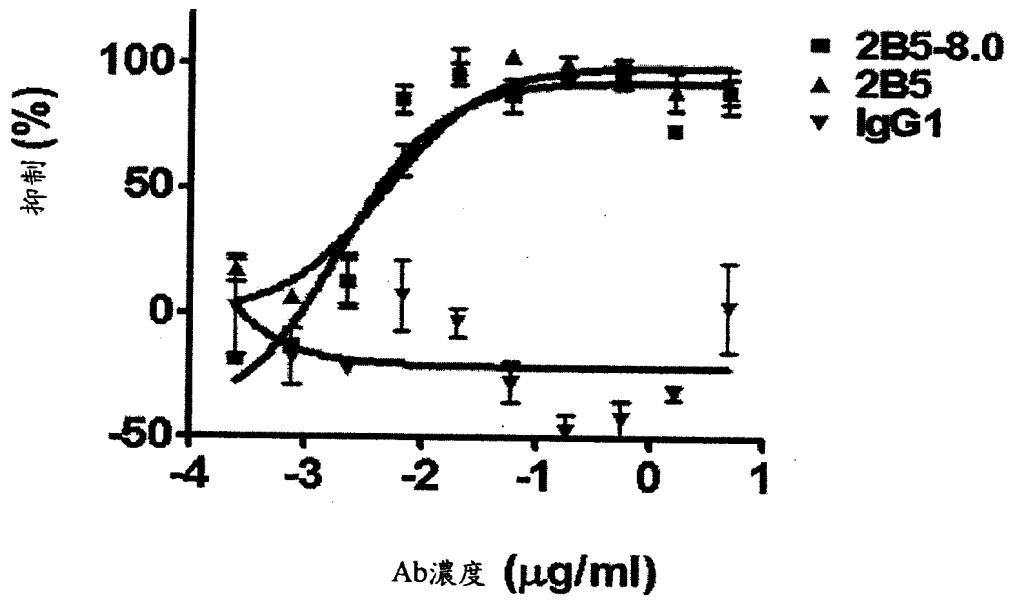


圖5

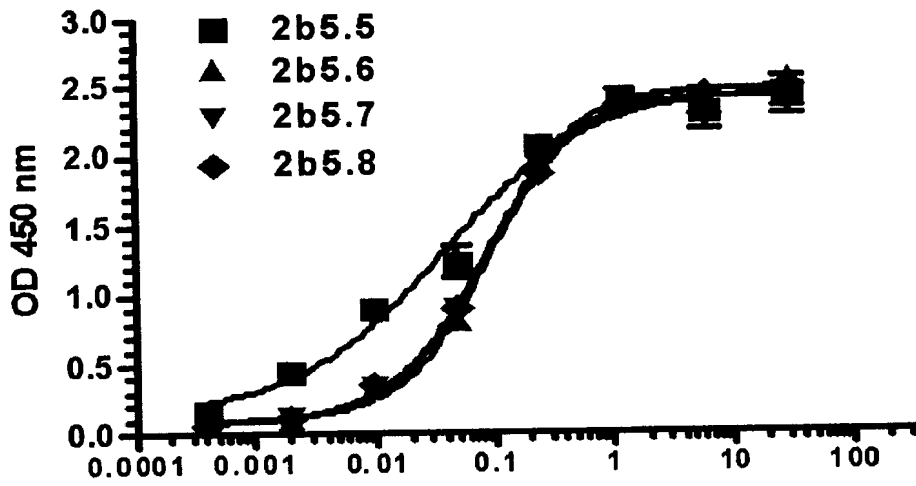


圖6

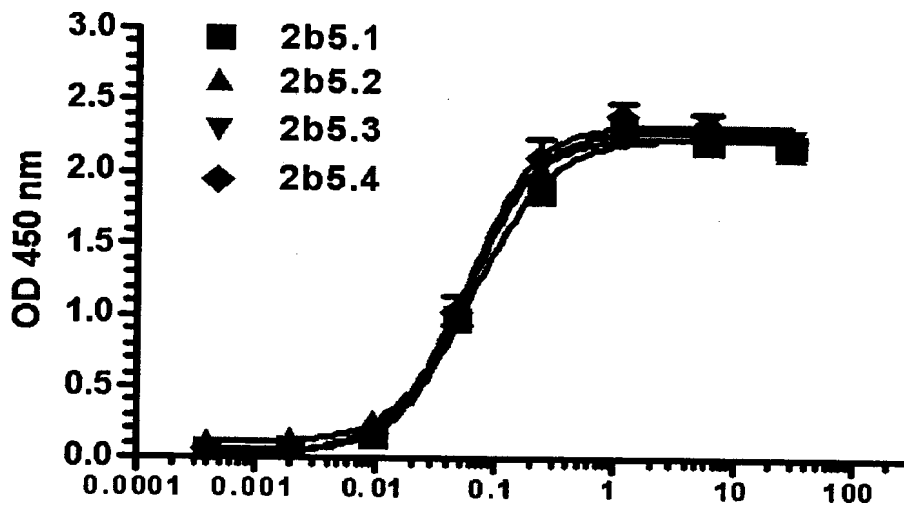


圖7

	(1)	1	10	20	30	40	50	60
2B5-7.0 VH	(1)	QVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFITKYWLGWVKQRPFGHGLEWIGDIYPCYDYTHY						
2B5-8.0 VH	(1)	QVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFITKYWLGWVKQRPFGHGLEWIGDIYPCYDYTHY						
2B5-9.0 VH	(1)	QVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFITKYWLGWVKQRPFGHGLEWIGDIYPGYDYTHY						
共同序列	(1)	QVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFITKYWLGWVKQRPFGHGLEWIGDIYPGYDYTHY						
	(61)	61	70	80	90	100	116	
2B5-7.0 VH	(61)	NEKFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSDGSSTYWGQGTILVTVSA						
2B5-8.0 VH	(61)	NEKFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSDGSSTYWGQGTILVTVSA						
2B5-9.0 VH	(61)	NEKFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSDGSSTYWGQGTILVTVSA						
共同序列	(61)	NEKFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSDGSSTYWGQGTILVTVSA						
	(1)	1	10	20	30	40	50	60
2B5-7.0 VL	(1)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVSNRF						
2B5-8.0 VL	(1)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVSNRF						
2B5-9.0 VL	(1)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVSNRF						
共同序列	(1)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVSNRF						
	(61)	61	70	80	90	100	113	
2B5-7.0 VL	(61)	SGVPDRFSGSGSTVFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQVSHVPYTFGGGTKLEIKR						
2B5-8.0 VL	(61)	SGVPDRFSGSGSTVFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQVSHVPYTFGGGTKLEIKR						
2B5-9.0 VL	(61)	SGVPDRFSGSGSTVFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQVSHVPYTFGGGTKLEIKR						
共同序列	(61)	SGVPDRFSGSGSTVFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQVSHVPYTFGGGTKLEIKR						

圖 8

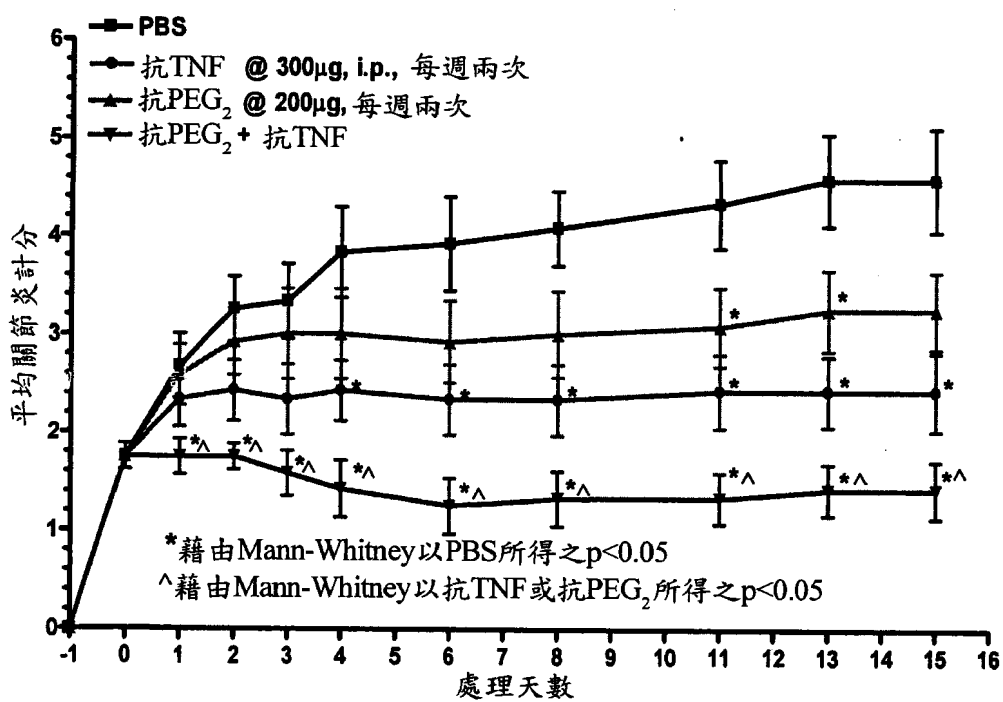


圖9

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)