



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I806247 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：110143303

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：財團法人國家衛生研究院(中華民國) NATIONAL HEALTH RESEARCH
INSTITUTES (TW)

苗栗縣竹南鎮科研路 35 號

(72)發明人：黃智興 HUANG, TZE-SING (TW)；徐祖安 HSU, TSU-AN (TW)；洪慧貞 HUNG,
HUI-CHEN (TW)；柯屹又 KE, YI-YU (TW)

(74)代理人：吳冠賜；蘇建太；林志鴻

(56)參考文獻：

US 2016/0053003A1

期刊 Chi-Shuan Fan et al, "Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma", Journal of Hematology & Oncology volume 12, Article number: 138 (2019)

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：10 共 99 頁

(54)名稱

抗 HSP90 α 抗體及其用途

(57)摘要

揭露一種分離的抗體，包括：能夠與分別在胺基酸 235 至 244 以及胺基酸 251 至 260 區域中含有兩個 EDK 位點的 HSP90 α 表位結合之新穎互補決定區(CDR)。亦揭露對應於上述抗體的核酸分子、包含上述抗體或對應核酸分子的醫藥組成物，以及使用上述抗體治療和監測癌症的方法。

Disclosed is an isolated antibody comprises: novel complementarity determining regions capable of specifically binding to the HSP90 α epitope containing two EDK sites in the amino acid 235 to 244 and amino acid 251 to 260 regions, respectively. Also disclosed are nucleic acid molecules corresponding to the aforesaid antibody, a pharmaceutical composition comprising the aforesaid antibody or the corresponding nucleic acid molecules, and the methods for treating and monitoring a cancer using the aforesaid antibody.

指定代表圖：

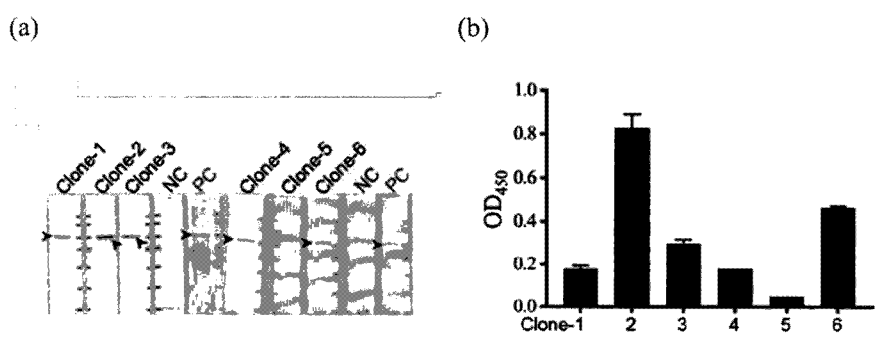


圖 1

I806247

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 抗HSP90 α 抗體及其用途**【英文發明名稱】** ANTI-HSP90 α ANTIBODY AND USES THEREOF

【中文】 揭露一種分離的抗體，包括：能夠與分別在胺基酸235至244以及胺基酸 251至260區域中含有兩個EDK位點的HSP90 α 表位結合之新穎互補決定區(CDR)。亦揭露對應於上述抗體的核酸分子、包含上述抗體或對應核酸分子的醫藥組成物，以及使用上述抗體治療和監測癌症的方法。

【英文】 Disclosed is an isolated antibody comprises: novel complementarity determining regions capable of specifically binding to the HSP90 α epitope containing two EDK sites in the amino acid 235 to 244 and amino acid 251 to 260 regions, respectively. Also disclosed are nucleic acid molecules corresponding to the aforesaid antibody, a pharmaceutical composition comprising the aforesaid antibody or the corresponding nucleic acid molecules, and the methods for treating and monitoring a cancer using the aforesaid antibody.

【指定代表圖】 圖1**【代表圖之符號簡單說明】** 無**【特徵化學式】** 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗HSP90 α 抗體及其用途

【英文發明名稱】 ANTI-HSP90 α ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭露涉及一種新穎抗 HSP90 α 抗體及其用途。更具體地，本揭露涉及一種新穎的分離的抗 HSP90 α 抗體、包含該抗體的醫藥組成物以及使用該抗體治療癌症的方法。

【先前技術】

【0002】 癌症的發展和進展不僅取決於上皮細胞的遺傳和表觀遺傳改變，還取決於其基質微環境的關鍵變化，基質微環境由細胞外基質 (ECM) 和基質細胞 (如纖維母細胞和免疫細胞) 組成。參見 Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Gastroenterol Hepatol 2009;7(11):S44–7。組織間質增生 (desmoplasia) 是許多惡性腫瘤 (如胰管腺癌 (PDAC) 和大腸直腸癌 (CRC)) 的共同特徵，由大量 ECM 以及大量表現 α -平滑肌動蛋白 (α -SMA) 為定義標記物的肌纖維母細胞 (myofibroblasts) 引起。這種肌纖維母細胞，也稱為活化纖維母細胞或癌症相關纖維母細胞 (CAF)，有助於腫瘤生長、免疫抑制和惡性進展。參見於下列文獻: Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell 2005;121(3):335–48; Lakins MA, Ghorani E, Munir H, Carla P. Martins CP, Shields JD. Cancer-associated

fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8⁺ T cells to protect tumour cells. *Nat Commun* 2018;9(1):948; Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2015;15(11):669–82; 以及 Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2005;15(5):329–41。它們構成了大部分腫瘤的基質細胞，且來自於多種細胞來源，例如組織常駐型纖維母細胞、星狀細胞、間質幹細胞/前驅細胞和浸潤性纖維細胞。參見 Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006;5(12):1640–6。此外，CAF 也可由內皮細胞的內皮間質轉化 (EndoMT) 產生。參見 Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007;67(21):10123–8。在我們先前的研究中，在 CRC 組織樣品中觀察到表現骨橋蛋白 (osteopontin, OPN) 的巨噬細胞附近，檢測到帶有 α -SMA⁺CD31⁺ 細胞之 EndoMT 衍生的 CAF。參見 Fan CS, Chen WS, Chen LL, Chen CC, Hsu YT, Chua KV, et al. Osteopontin–integrin engagement induces HIF-1 α –TCF12-mediated endothelial-mesenchymal transition to exacerbate colorectal cancer. *Oncotarget* 2018;9(4):4998–5015。OPN 誘導內皮細胞的 EndoMT，由此產生的 EndoMT 衍生的 CAF 透過分泌 HSP90 α 來促進 CRC 細胞幹性，藉此表現出有效的腫瘤促進作用。參見 Fan CS, Chen WS, Chen LL, Chen CC, Hsu YT, Chua KV, et al. Osteopontin–integrin engagement induces HIF-1 α –TCF12-mediated endothelial-mesenchymal transition to exacerbate colorectal cancer. *Oncotarget* 2018;9(4):4998–5015。最近，我們還發現 EndoMT 衍生的 CAF 與 PDAC 細胞混合移殖入老鼠體內後，可以明顯地招募骨髓衍生的巨噬細胞，阻止免疫 T 細胞

並促進腫瘤生長。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 2019;12:138。EndoMT 衍生的 CAF 所分泌的 HSP90 α 可以透過細胞表面受體 CD91 和 TLR4 以及下游的 MyD88-JAK2/TYK2-STAT-3 途徑,進一步誘導巨噬細胞 M2 極化和更多 HSP90 α 分泌。參見 See Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 2019;12:138。

【0003】 HSP90 α 是一種眾所周知的細胞伴護蛋白(chaperone),在細胞內幫助許多客戶蛋白(client protein)的折疊、成熟和運輸,包括癌症相關的 Bcr-Abl、ErbB2/Neu、Akt, HIF-1 α 、突變的 p53 及 Raf-1 都是其輔助的對象。參見 Trepel JB, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. Targeting the dynamic Hsp90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10(8):537-49。除了在細胞內, HSP90 α 亦可從受傷組織中的角質細胞和纖維母細胞分泌到胞外,另外,在不利的組織微環境下,癌細胞也會大量表現和分泌出 HSP90 α ,以加速癌細胞上皮間質轉化(EMT)、遷移、侵襲和轉移。參見 Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng C-F, Bright AM, et al. Extracellular heat shock protein-90 α : linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007;26(5):1221-33; Xu A, Tian T, Hao J, Liu J, Zhang Z, Hao J, et al. Elevation of serum HSP90 α correlated with the clinical stage of non-small cell lung cancer. *J Cancer Mol* 2007;3(4):107-12; 和 Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, et al. The regulatory mechanism of HSP90 α secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(50):21288-93。臨床上,包括

CRC 和 PDAC 在內的數種惡性腫瘤病人，在其癌症的前期即可檢測到血清/血漿的 HSP90 α 含量有升高的情形。參見 Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, et al. The regulatory mechanism of HSP90 α secretion and its function in tumor malignancy. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(50):21288–9; Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, et al. The regulatory mechanism of HSP90 α secretion and its function in tumor malignancy. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(50):21288–93; Chen JS, Hsu YM, Chen CC, Chen LL, Lee CC, Huang TS. Secreted heat shock protein 90 α induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF- κ B-mediated integrin α_v expression. J Biol Chem 2010;285(33):25458–66; 和 Chen CC, Chen LL, Li CP, Hsu YT, Jiang SS, Fan CS, et al. Myeloid-derived macrophages and secreted HSP90 α induce pancreatic ductal adenocarcinoma development. OncoImmunology 2018;7(5):e1424612。已知胰臟炎是罹患 PDAC 的高危險因子，而胰臟炎患者的血液樣本亦可檢測到細胞外 HSP90 α (eHSP90 α) 含量有升高的現象，此意謂著過量的 eHSP90 α 可能與 PDAC 的形成有關，這個假說可以從實驗鼠模型獲得支持，在胰管表皮細胞表達活化型 K-Ras 的基因轉殖鼠自發性發展出 PDAC 之前，eHSP90 α 可自浸潤胰臟的骨髓衍生之巨噬細胞和所刺激的胰管上皮細胞產生，以促進 PDAC 的形成。參見 Chen CC, Chen LL, Li CP, Hsu YT, Jiang SS, Fan CS, et al. Myeloid-derived macrophages and secreted HSP90 α induce pancreatic ductal adenocarcinoma development. OncoImmunology 2018;7(5):e1424612。此外，由 EndoMT 衍生的 CAF 分泌的 HSP90 α 或重組 HSP90 α (rHSP90 α) 能夠誘發巨噬細胞 M2 標記的表現和大量 HSP90 α 分泌的前饋迴路 (feedforward loop)，因而可解釋為什麼 M2 極化的巨噬細胞不僅會引起免疫抑制和促進血管生成，還會造成一個富含 eHSP90 α 的腫瘤微環境，以促進

PDAC 細胞之腫瘤生長和惡化。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hematol Oncol 2019;12:138。總而言之，eHSP90 α 無論在腫瘤形成的開始階段或是其後來的惡化過程都扮演了關鍵角色，可被視為是重要的治療標靶。

【0004】 在我們先前的研究中，我們合成了一種不能通過細胞膜的小分子 HSP90 α 抑制劑來針對 eHSP90 α 。參見 Chen CC, Chen LL, Li CP, Hsu YT, Jiang SS, Fan CS, et al. Myeloid-derived macrophages and secreted HSP90 α induce pancreatic ductal adenocarcinoma development. OncoImmunology 2018;7(5):e1424612。雖然其對 PDAC 細胞生長成腫瘤及發生轉移有一定的抑制效果，但由於容易自小鼠體內排出，頻繁給藥卻引起了小鼠脾臟的腫大。另一方面，我們在使用 HSP90 α 的小鼠單株抗體時獲得了令人鼓勵的成果，在我們先前發表的研究結果裡，HSP90 α 的小鼠單株抗體對 EndoMT 所促進的、並有 M2 巨噬細胞參與的 PDAC 細胞之腫瘤生長具有明顯的治療效果，該抗體可減少 eHSP90 α 與其細胞表面受體的連接，進而防止 eHSP90 α 誘導的 HSP90 α 表現和分泌的前饋迴路。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hematol Oncol 2019;12:138。我們的另一項研究成果也支持了這一發現，酸辛酯 (octyl gallate, OG) 是一種在食品和化妝品中安全使用的抗氧化劑和防腐劑，我們發現酸辛酯可以透過阻斷 eHSP90 α 與其細胞表面受體 TLR4 的連接，而抑制 EndoMT 衍生的 CAF 所誘導的巨噬細胞 M2 極化作用及相關的 eHSP90 α 之前饋迴路。參見 Chua KV, Fan CS, Chen LL, Chen CC, Hsieh SC, Huang TS. Octyl

gallate induces pancreatic ductal adenocarcinoma cell apoptosis and suppresses endothelial-mesenchymal transition-promoted M2-macrophages, HSP90 α secretion, and tumor growth. Cells 2020;9(1):91。

【0005】 總而言之，eHSP90 α 是組織間質增生及 M2 巨噬細胞有關的腫瘤惡化之潛在治療標靶，開發出有效果的抗 HSP90 α 抗體是發展對付 eHSP90 α 的標靶治療之有價值和有希望的策略。

【發明內容】

【0006】 在一態樣中，本文描述一種分離的抗體。該分離的抗體包括：能夠與在氨基酸 235 至 244 以及氨基酸 251 至 260 區域中含有氨基酸序列 EDK 之 HSP90 α 表位專一性結合之新穎互補決定區 (CDR)。

【0007】 在一些實施例中，HSP90 α 可以是 eHSP90 α 。

【0008】 在一些實施例中，該分離的抗體可包括：SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：12 的重鏈可變區序列的重鏈互補決定區 CDR1、CDR2 和 CDR3；以及 SEQ ID NO：7 或 SEQ ID NO：17 的輕鏈可變區序列的輕鏈互補決定區 CDR1、CDR2 和 CDR3。

【0009】 在一些實施例中，重鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 係來自 SEQ ID NO:2，且輕鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 可來自 SEQ ID NO:7。

【0010】 在一些實施例中，分離的抗體可包含與 SEQ ID NO: 2 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一重鏈可變區，以及與 SEQ ID NO：7 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一輕鏈可變區。

【0011】 在一些實施例中，重鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 3 序列，重鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 4 序列，重鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 5 序列，輕鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 8 序列，輕鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 9 序列，以及輕鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 10 序列。

【0012】 在一些實施例中，重鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 可來自 SEQ ID NO: 12，並且輕鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 係來自 SEQ ID NO: 17。

【0013】 在一些實施例中，分離的抗體可包含與 SEQ ID NO: 12 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一重鏈可變區，以及與 SEQ ID NO:17 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一輕鏈可變區。

【0014】 在一些實施例中，重鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 13 序列，重鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 14 序列，重鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 15 序列，輕鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 18 序列，輕鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 19 序列，以及輕鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 20 序列。

【0015】 在一些實施例中，分離的抗體可為一包含 Fc 區之抗體、一 Fab 片段、一 Fab'片段、一 F(ab')₂ 片段、一單鏈抗體、一 scFV 多聚體、一單株抗體、一單價抗體、一多特異性抗體、一人源化抗體或一嵌合抗體。

【0016】 本文還描述了核酸分子，其包含編碼本文揭露之抗體之核酸序列。

【0017】 在一些實施例中，本文提供一種宿主細胞，其包含該核酸分子。

【0018】 本文還描述了一種醫藥組成物，其包含本文所述之抗體或包含編碼本文揭露的抗體的核酸序列的核酸分子。醫藥組成物可進一步包括醫藥可接

受之載體和/或另一種治療劑(例如另一種癌症藥物、細胞毒劑或免疫調節劑)。
治療劑的示例可包括但不限於吉西他濱(gemcitabine)。

【0019】 eHSP90 α 可用於組織間質增生 (特別是癌組織間質增生) 的治療策略，因此，本文還描述了用於治療主體的癌組織間質增生的方法，包括：向該所需主體施用一靶向 eHSP90 α 之治療劑。

【0020】 在一些實施例中，本文所述的抗體還可用於抑制癌細胞生長或癌細胞轉移。因此，本文描述的是治療主體中癌症的方法，包括：向所需主體施用有效量的本文所述的抗體或含有編碼本文揭露的抗體的核酸序列的核酸分子。

【0021】 在一些實施例中，本文所述的抗體還可用於減少組織間質增生或防止組織間質增生。因此，本文描述的是用於治療主體中組織間質增生的方法，包括：向所需主體施用有效量的本文所述的抗體或含有編碼本文揭露的抗體的核酸序列的核酸分子。在此，組織間質增生可以是癌組織間質增生。

【0022】 在一些實施例中，該方法還可以包括向主體施用另一種治療劑。給予治療劑的時間沒有特別限制。在一些實施例中，可以在施用抗體或核酸分子時施用治療劑。在一些實施例中，可以在施用抗體或核酸分子之後施用治療劑。

【0023】 在一些實施例中，可以使用本文所述的分離抗體檢測主體的血液 HSP90 α 含量，以監測在治療癌症或組織間質增生的方法中主體的腫瘤縮小。在一些實施例中，主體的血液 HSP90 α 含量可以是主體的全血或血清中的血液 HSP90 α 含量。

【0024】 在一些實施例中，癌症可具有組織間質增生特徵。

【0025】 在一些實施例中，癌症可具有 M2 巨噬細胞惡化特徵。

【0026】 癌症的示例可包括但不限於胰臟癌、結腸癌、乳癌、肝癌或肺癌。

【0027】 本文還提供了一種評估主體腫瘤縮小的方法，包括：獲取主體的血液樣品；並確定血液樣品中的 HSP90 α 含量。在一些實施例中，血液樣品可以是全血或血清。

【0028】 在一些實施例中，用於評估主體中腫瘤縮小的方法可包括：獲取施用了 IgG 的主體的血液樣品以及施用了如本文所述的抗體或包含編碼本文揭露之抗體之核酸序列的核酸分子的另一主體的另一血液樣品；測定施用如本文所述的 IgG、抗體或核酸分子的主體的血液樣品中的 HSP90 α 含量。當施用本文揭露的抗體或核酸分子的主體的血液樣品中的 HSP90 α 含量低於施用 IgG 的主體的血液樣品中的 HSP90 α 含量時，表示本文所述的抗體或核酸分子可有效地抑制腫瘤的生長或縮小腫瘤體積。

【0029】 本揭露的一或多個實施例的細節在以下描述中闡述。本揭露的其他特徵、目的和優點從描述和請求項中顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0030】

圖 1 是一組顯示小鼠抗 HSP90 α 單株抗體特性分析的圖表。(a) 以西方墨點法分析源自 rHSP90 α 免疫小鼠的六個融合瘤植株的培養上清液之 HSP90 α 結合能力。(b) 以 ELISA 分析以上六個融合瘤植株的培養上清液之 HSP90 α 結合活性。(c) 亞型特性分析 Clone-2 和 Clone-6 抗體，鑑定其為含有 κ 輕鏈的 IgG2b 同型免疫球蛋白。(d) 以鄰近連接測試 (proximity ligation assay, PLA) 分析 Clone-2 和

Clone-6 抗體對 HSP90 α 與 CD91 之分子結合及 CD91 與 IKK α 之分子結合的影響，測試條件為胰管腺癌 PANC-1 細胞株以 rHSP90 α (15 μ g/ml)刺激的同時存在有 10 μ g/ml 的對照 IgG 或 Clone-2 或 Clone-6 抗體。(e) 細胞侵襲能力測試 (Transwell invasion assay) 顯示 rHSP90 α 能夠誘發癌細胞侵襲能力，測試條件為 SW620、LoVo 和 BxPC-3 癌細胞株經 PBS 或 rHSP90 α (15 μ g/ml)預處理 16 小時。(f) 以細胞侵襲能力測試法分析 Clone-2 或 Clone-6 抗體對 rHSP90 α 誘發癌細胞侵襲能力的影響，測試條件為 SW620 和 PANC-1 癌細胞株經 15 μ g/ml 的 rHSP90 α 加 10 μ g/ml 的對照 IgG 或 Clone-2 或 Clone-6 抗體預處理 16 小時。(g) 以細胞類球體形成能力測試法分析 Clone-2 或 Clone-6 抗體對 rHSP90 α 誘發癌細胞幹性的影響，測試條件為 SW620、PANC-1 和 Panc 02 癌細胞株分別種植入含 15 μ g/ml 的 rHSP90 α 加 10 μ g/ml 的對照 IgG 或 Clone-2 或 Clone-6 抗體的類球體形成培養基。

圖 2 人源化抗 HSP90 α 抗體的特性分析的圖表。(a) 使用 Biacore T200 測定分析人源化 HSP90 α 抗體 Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 對 HSP90 α 的結合動力學。(b) 由(a)之 分子結合感測圖並套用簡易 1:1 交互模式計算出 Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 抗體的平衡解離常數 (K_D) 值。(c) 以細胞侵襲能力測試法分析 Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 抗體對 rHSP90 α 誘發癌細胞侵襲能力的影響，測試條件為 PANC-1 癌細胞株經 15 μ g/ml 的 rHSP90 α 加 10 μ g/ml 的對照 IgG、Clone-2、Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 或 Clone-2-hC 抗體預處理 16 小時。(d) 以細胞類球體形成能力測試法分析 Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 抗體對 rHSP90 α 誘發癌細胞幹性的影響，測試條件為 PANC-1 細

胞種植入含 15 $\mu\text{g/ml}$ 的 rHSP90 α 加 10 $\mu\text{g/ml}$ 的對照 IgG、Clone-2、Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 或 Clone-2-hC 抗體的類球體形成培養基。(e)分析 17-AAG 和人源化 HSP90 α 抗體 HH01 (即 Clone-2-hA) 對視網膜色素上皮細胞之毒性，測試條件為人類視網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 細胞分別用系列濃度的 17-AAG 和 HH01 抗體處理 72 小時，然後評估其存活率。(f) 人源化 HSP90 α 抗體 HH01 的藥物動力學研究，測試條件為單一劑量 10 mg/kg 的 HH01 抗體經靜脈 (IV) 注射入 5 隻公小鼠中。

圖 3 是一組鑑定結果顯示 Clone-2-chimera 和 HH01 (即 Clone-2-hA) 抗體所辨識的 HSP90 α 表位。(a) 以蛋白質區域掃描測定法 (domain scanning assay) 大致勾勒出 Clone-2 抗體所結合的 HSP90 α 區域。(b) 以胜肽掃描測定法 (peptide scanning assay) 進一步推斷出 Clone-2-chimera 抗體所結合的 HSP90 α 位點的氨基酸序列。(c) 以胜肽掃描測定法推斷出 HH01 抗體所結合的 HSP90 α 位點的氨基酸序列。(d) 以丙胺酸掃描測定法 (alanine scanning assay) 推斷出 Clone-2-chimera 和 HH01 抗體所結合的 HSP90 α 位點的關鍵性氨基酸。(e) 以細胞侵襲能力測試法分析 HSP90 α 表位對 rHSP90 α 誘發癌細胞侵襲能力的影響，測試條件為 PANC-1 癌細胞株經 15 $\mu\text{g/ml}$ 的 rHSP90 α 加 15 $\mu\text{g/ml}$ 的對照胜肽 (P-ctrl) 或含表位胜肽 (P-46) 預處理 16 小時。(f) 以細胞類球體形成能力測試法分析 HSP90 α 表位對 rHSP90 α 誘發癌細胞幹性的影響，測試條件為 PANC-1 細胞種植入含 15 $\mu\text{g/ml}$ 的 rHSP90 α 加 15 $\mu\text{g/ml}$ 的對照胜肽 (P-ctrl) 或含表位胜肽 (P-46) 的類球體形成培養基。

圖 4 是一組實驗鼠數據顯示 HH01 抗體在具有組織間質增生的小鼠 PDAC 模型中的預防功效。(a) 馬森三色染色法 (Masson's trichrome stain) 揭示了在

EndoMT 細胞參與下，Panc 02 癌細胞長出的腫瘤具有組織間質增生的現象。(b) 在 EndoMT 細胞參與 Panc 02 癌細胞長出腫瘤的小鼠 PDAC 模型中，HH01 抗體用以預防組織間質增生性腫瘤長成的給藥時間。(c) 由體表測量表面腫瘤體積，顯示用 HH01 抗體處理的小鼠的腫瘤生長曲線與處理 IgG 的對照組比起來有明顯受到壓制。(d) 接種後第 30 天犧牲小鼠的腫瘤重量。(e) 經對照 IgG 或 HH01 抗體處理的小鼠的腫瘤組織切片的馬森三色染色。(f) 用對照 IgG 或 HH01 抗體處理的小鼠的血清 HSP90 α 含量。

圖 5 是一組實驗鼠數據顯示 HH01 抗體在具有組織間質增生的小鼠 PDAC 模型中的治療功效。(a) 在 EndoMT 細胞參與 Panc 02 癌細胞長出腫瘤的小鼠模型中，HH01 抗體用以治療組織間質增生性腫瘤生長的給藥時間。(b) 由體表測量長寬並估算出皮下腫瘤體積，顯示使用 HH01 抗體治療的小鼠的腫瘤生長曲線與使用 IgG 的對照組比起來有明顯受到壓制。(c) 接種後第 41 天犧牲小鼠的腫瘤重量。(d) 經對照 IgG 或 HH01 抗體治療的小鼠的腫瘤切片的馬森三色染色。(e) 用對照 IgG 或 HH01 抗體治療的小鼠的血清 HSP90 α 含量。

圖 6 是一組實驗鼠數據顯示 HH01 抗體在具有組織間質增生的人源化小鼠 PDAC 模型中的治療功效。(a) 在 EndoMT 細胞參與 PANC-1 癌細胞長出腫瘤的人源化小鼠模型中，HH01 抗體用以治療組織間質增生性腫瘤生長的給藥時間。(b) 由體表測量長寬並估算出皮下腫瘤體積以繪製分別經對照 IgG、對照 IgG 加吉西他濱(gemcitabine)、和 HH01 抗體加吉西他濱處理的小鼠的腫瘤生長曲線。(c) 接種後第 39 天犧牲小鼠的腫瘤重量。(d) 來自不同治療組別的小鼠之腫瘤切片的馬森三色染色。(e) 經對照 IgG、對照 IgG 加吉西他濱、或 HH01 抗體加吉西他濱處理的小鼠的血清 HSP90 α 含量。

圖 7 是一組實驗鼠數據顯示 HH01 抗體在胰管細胞 K-Ras^{G12D} 突變所誘導的組織間質增生性小鼠 PDAC 模型中的治療功效。(a) 在胰管細胞 K-Ras^{G12D} 突變的基因轉殖鼠 (即 LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre 鼠, 以下簡稱 KC 鼠) 模型中, HH01 抗體用以治療組織間質增生性 PDAC 的給藥時間。(b) 分別用對照 IgG 和 HH01 抗體治療的 KC 鼠之 Kaplan-Meier 存活曲線。(c) 用對照 IgG 或 HH01 抗體治療的 KC 鼠之胰臟和肝臟外觀及組織間質增生情形的示例。(d) 用對照 IgG 或 HH01 抗體治療的 KC 鼠之血清 HSP90 α 含量。

圖 8 是一組實驗鼠數據顯示 eHSP90 α 所誘導的 M2 型巨噬細胞具有顯著的促進腫瘤生長的能力。(a) 經 rHSP90 α 處理過的巨噬細胞能夠促進 Panc 02 癌細胞生長出腫瘤。C57BL/6 小鼠皮下注射單獨的 Panc 02 細胞或一起注射經 PBS、100 ng/ml 的 LPS 或 15 μ g/ml 的 rHSP90 α 預處理 24 小時的 BMDM (每組 n = 6)。使用游標卡尺從鼠體表面測量生長中的腫瘤大小, 並用 $\frac{1}{2} \times \text{長} \times \text{寬}^2$ 的公式估算出腫瘤的體積。(b) 接續 (a), 不同組別的實驗鼠在 Panc 02 癌細胞接種後第 28 天犧牲小鼠並取出腫瘤稱重。[@]當與「Panc 02」或「Panc 02 + BMDM」組別相比時 $p < 0.01$ 。(c) 實驗鼠之腫瘤組織的 F4/80、CD163、CD4 和 CD8 的免疫組織化學染色分析。H/E 為蘇木精和伊紅染色。(d) 實驗鼠之腫瘤組織的染 DAPI 螢光分析。

圖 9 是一組實驗鼠數據顯示 HH01 抗體在 M2 巨噬細胞促進惡化的小鼠 PDAC 模型中的治療功效。(a) HH01 抗體在治療 M2 巨噬細胞促進 Panc 02 癌細胞長出腫瘤的小鼠模型中的給藥時間。(b) 由體表測量長寬並估算出皮下腫瘤體積以繪製分別經對照 IgG 和 HH01 抗體處理的小鼠的腫瘤生長曲線。(c) Panc 02 癌細胞加上 M2 巨噬細胞接種後第 42 天, 犧牲小鼠取出其腫瘤並稱得重量。(d) 對照 IgG 或 HH01 抗體處理的小鼠的血清 HSP90 α 含量。(e) 用對照 IgG 或 HH01

抗體治療的小鼠腫瘤的 CD163、CD204、CD4 和 CD8 的免疫組織化學染色分析。
H/E 為蘇木精和伊紅染色。

圖 10 是一組延續圖 9 的數據顯示來自經對照 IgG 和 HH01 抗體處理的小鼠的腫瘤的 F4/80、iNOS、Arginase 1、CD4、CD8 和 TNF- α 的免疫組織螢光染色分析的結果。(a 和 b) 在經 HH01 處理的小鼠的腫瘤組織中觀察到 F4/80⁺iNOS⁺ 的 M1 巨噬細胞之增加(如白色箭頭所示)和 F4/80⁺Arginase 1⁺ 的 M2 巨噬細胞之明顯消失(如對照 IgG 組別之黃色箭頭所示)。(c) 從經 HH01 治療的小鼠的腫瘤組織中觀察到 CD4⁺TNF- α ⁺細胞的增加(如箭頭所示)。(d) 從經 HH01 治療的小鼠的腫瘤組織中觀察到 CD8⁺TNF- α ⁺細胞的增加(如箭頭所示)。

【實施方式】

【0031】 本文描述了結合 HSP90 α ，例如 eHSP90 α ，的新抗體。

【0032】 分離的抗體可包括能夠特異性結合 HSP90 α 表位的新 CDR，該表位包含 ₂₃₅AEEKEDK₂₄₄ 和 ₂₅₁ESEDKPEIED₂₆₀ 區域中的氨基酸序列 EDK。

【0033】 分離的抗體可包括：SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：12 的重鏈可變區序列的重鏈互補決定區 CDR1、CDR2 和 CDR3；以及 SEQ ID NO：7 或 SEQ ID NO：17 的輕鏈可變區序列的輕鏈互補決定區 CDR1、CDR2 和 CDR3。

【0034】 在一態樣中，重鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 可來自 SEQ ID NO: 2，輕鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 可來自 SEQ ID NO: 7。在一些實施例中，分離的抗體可包含與 SEQ ID NO: 2 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一重鏈可變區，以及與 SEQ ID NO: 7 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一輕鏈可變區。

在一些實施例中，重鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 3 序列，重鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 4 序列，重鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 5 序列，輕鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 8 序列，輕鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 9 序列，以及輕鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 10 序列。在一些實施例中，亦可提供一種核酸分子，該核酸分子含有核酸序列，該核酸序列編碼了包含與 SEQ ID NO: 2 序列至少 80% 相同的一重鏈可變區、以及與 SEQ ID NO: 7 序列至少 80% 相同的一輕鏈可變區。在一些實施例中，該核酸分子可包含與 SEQ ID NO: 1 序列至少 80% (例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 相同的一序列以編碼重鏈可變區、以及與 SEQ ID NO: 6 序列至少 80% (例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 相同的一序列以編碼輕鏈可變區。

【0035】 於下表 1 列出 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 10 序列。

【0036】 表 1：Clone-2 抗 HSP90 α 抗體

重鏈可變區	
DNA 序列 SEQ ID NO: 1	AGGTGCAGGTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGC CTAAAGGGTTCATTGAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAAACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAA GTAAAAGTAGAAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAG TGAAAGACAGGTTCCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAT TCATGTTCTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGG ACACAGCCATGTATTACTGTGTTGTGGGGGGCTCGGGTT TTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCT CA
胺基酸序列 SEQ ID NO: 2	EVQVVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFKTYAMNWVRQ APKGLEWVARIRSKSRNYATYYADSVKDRFTISRDDSQF

	MFYLMNNLKTEDTAMYCYVVGSGFDYWGQGTTLTVS S
CDR1 SEQ ID NO: 3	GFTEKTYA
CDR2 SEQ ID NO: 4	IRSKSRNYAT
CDR3 SEQ ID NO: 5	VVGSGFDY
輕鏈可變區	
DNA 序列 SEQ ID NO: 6	GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATG GTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGAT CTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAG G TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAG CATCAGCAGAGTGGAGGCTGGGGATCTGGGAGTTTATTA CTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGA GGCACCAAGCTGGAAATCAAA
胺基酸序列 SEQ ID NO: 7	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWY LQKPGQSPKLLIYKVGVPDRFSGSGSGTDFLTLISRVEAGD LGVYYCFQGSHPWTFGGGTKLEIK
CDR1 SEQ ID NO: 8	RSSQSIVHSNGNTYLE
CDR2 SEQ ID NO: 9	KVGVPDRF
CDR3 SEQ ID NO: 10	FQGSHPWT

粗體字: CDR

【0037】 在一態樣中，重鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 可來自 SEQ ID NO: 12，輕鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 可來自 SEQ ID NO: 17。在一些實施例中，分離的抗體可包含與 SEQ ID NO: 12 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一重鏈可變區，以及與 SEQ ID NO: 17 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同之一輕鏈可變區。在一些實施例中，重鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 13 序列，重鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 14 序列，重鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 15 序列，輕鏈 CDR1 可具有 SEQ ID NO: 18 序列，輕鏈 CDR2 可具有 SEQ ID NO: 19 序列，以及輕鏈 CDR3 可具有 SEQ ID NO: 20 序列。在一些實施例中，亦可提供一種核酸分子，該核酸分子含有核酸序列，該核酸序列編碼了包含與 SEQ ID NO: 12 序列至少 80%相同的一重鏈可變區、以及與 SEQ ID NO: 17 序列至少 80%相同的一輕鏈可變區。在一些實施例中，該核酸分子可包含與 SEQ ID NO: 11 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同的一序列以編碼重鏈可變區、以及與 SEQ ID NO: 16 序列至少 80%(例如 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)相同的一序列以編碼輕鏈可變區。

【0038】 於下表 2 列出 SEQ ID NO: 11 至 SEQ ID NO: 20 序列。

【0039】 表 2：HH01 抗 HSP90 α 抗體

重鏈可變區	
DNA 序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCA
SEQ ID NO: 11	GCCAGGAGGAAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTTCCGG CTTCACCTTTAAGACATACGCCATGAACTGGGTGAGGCAG GCTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGGTGGCTAGGATCCGG TCTAAGTCCCGGAATTACGCCACCTACTATGCTGACTCCG

	TGAAGGATAGATTCAACAATCAGCCGCGACGATTCTAAGAA CCAGTTTTATCTGCAGATGAACAATCTGCGCACCGAGGAC ACAGCCGTGTACTATTGCGTGGTGGGCGGCAGCGGCTTC GATTATTGGGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCCAGC
胺基酸序列 SEQ ID NO: 12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK TYAM NWVRQA PGQGLEWVAR RIRSKSR NYATYYAD SVKDR FTISRDDS KNQ FYLQMNNLRTEDTAVYYCVVGG SGFDY WGQGTTLTVSS
CDR1 SEQ ID NO: 13	TFKTYAMN
CDR2 SEQ ID NO: 14	RIRSKSRNYATYYADSVKD
CDR3 SEQ ID NO: 15	GSGFDY
輕鏈可變區	
DNA 序列 SEQ ID NO: 16	GACGTGGTCATGACCCAGACACCACTGTCCCTGCCTGTG AGCCTGGGCGATCAGGCCAGCATCTCTTGCAGGTCCAGC CAGTCTATCGTGCACCTCCAACGGCAATACCTACCTGGAGT GGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGA TCTACAAGGTGAGCAACAGGTTCTCTGGAGTGCCTGACC GGTTTTCCGGAAGCGGATCTGGCACAGATTCACCCTGAC AATCTCTTCCGTGGAGGCTGAGGACCTGGGCGTGTACTAT TGTTTCCAGGGCTCCCATGTGCCATGGACCTTGGCGGGCG GCACAAAGCTGGAGATCAAG
胺基酸序列 SEQ ID NO: 17	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASIS RSSQSIVHS NGNTYLEW YLQKPGQSPQLLIY KVSNRFS GVDRFSGSGSGTDFTLT ISS VEAEDLGVYYCF QGS HVPWTFGGG TKLEIK
CDR1 SEQ ID NO: 18	RSSQSIVHSNGNTYYLE
CDR2	KVSNRFS

SEQ ID NO:19	
CDR3	FQGSHPV
SEQ ID NO: 20	

粗體字: CDR

【0040】 該抗體可與 HSP90 α 專一性結合。更具體地說，該抗體對 HSP90 α 的結合比起對其他非 HSP90 α 蛋白具有很高的親和力。此外，可透過本領域已知的任何方法確定重鏈或輕鏈可變區的 CDR。

【0041】 本文所述的抗體表現出對 eHSP90 α 的高結合親和力。因此，本文所述的抗體可以抑制腫瘤內的組織間質增生，以進一步抑制腫瘤生長或縮小腫瘤大小。

【0042】 根據本文揭露的抗體序列及其 CDR，技術人員可使用本領域已知的任何方法產生各種形式的抗 HSP90 α 抗體，並且產生的抗 HSP90 α 抗體可以專一性結合至在胺基酸 235 至 244 和胺基酸 251 至 260 區域中含有兩個 EDK 位點的 HSP90 α 表位。

【0043】 根據 HSP90 α 表位的序列，合成的胜肽可以競爭性地抑制 eHSP90 α 的促癌功能。

【0044】 本文所用之術語「抗體」包含具有抗原結合活性的各種抗體結構。舉例而言，抗體可包含但不限於：一包含 Fc 區之抗體、一 Fab 片段、一 Fab' 片段、一 F(ab')₂ 片段、一單鏈抗體、一 scFV 多聚體、一單株抗體、一單價抗體、一多專一性抗體、一人源化抗體或一嵌合抗體。在一些實施例中，抗體是一人源化抗體。

【0045】 本文還描述了一種含有本文所述抗體的醫藥組成物。該醫藥組成物包括：如本文所述之分離抗體和醫藥可接受之載體。

【0046】 本文還描述了含有能夠編碼如本文所述之抗體的核酸分子的一種醫藥組成物。該醫藥組成物包括：能夠編碼如本文所述之抗體的核酸分子和醫藥可接受之載體。

【0047】 術語「藥學上可接受的載體」係指載體必須與活性成分相容(例如，能夠穩定抗體)並且對於待治療的主體無害。載體可為選自由活性劑、佐劑、分散劑、潤濕劑和懸浮劑所組成的群組中的至少一種。載體的示例可為但不限於微晶纖維素、甘露醇、葡萄糖、脫脂奶粉、聚乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、澱粉或其組合。

【0048】 抗體、核酸分子或含有它們之中的一或多種的醫藥組成物可口服、腸胃外、透過吸入噴霧、局部、直腸、鼻腔、口腔或通過植入的儲藥器施用於主體。本文所用之術語「腸胃外」包含皮下、皮內、靜脈內、肌肉內、關節內、動脈內、滑膜內、胸骨內、鞘內、病灶內和顱內注射或輸注技術。

【0049】 本文還描述了抗體或核酸分子用於製備治療癌症藥物之用途。

【0050】 本文還描述了用於治療主體中的癌症的方法，包括：向主體施用一有效量的如本文所述之抗體或核酸分子。

【0051】 癌症的示例可包括但不限於膀胱癌、骨癌、腦癌、乳癌、子宮頸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、白血病、肝癌、淋巴瘤、腎癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌(包括基底細胞癌和鱗狀細胞癌和黑色素瘤)、胃癌、胸腺癌和甲狀腺癌。在一些實施例中，癌症具有組織間質增生特

徵，並且具體而言，組織間質增生可在腫瘤內或腫瘤周圍發現。在一些實施例中，癌症可為胰臟癌、大腸直腸癌、乳癌、肝癌或肺癌。

【0052】 本文所述之抗體可抑制癌組織間質增生、免疫抑制、生長和轉移。

【0053】 術語「主體」是指人類或非人類動物。

【0054】 術語「治療(treating)」、「治療(treat)」或「治療(treatment)」是指向主體施用抗體、核酸分子或醫藥組成物，其目的是治癒、減輕、緩解、改變、補救、改善或影響疾病、症狀、或染病傾向。「有效量」是指為了給主體所欲效果所需之抗體或核酸分子的量。如本領域技術人員所知，有效量取決於給藥途徑、賦形劑的使用以及與其他治療方法共同使用的可能性，例如使用其他活性劑。

【0055】 本揭露的一或多個實施例的細節在以下描述中闡述。本揭露的其他特徵、目的和優點將從描述和請求項中顯而易見。

【0056】 實施例

【0057】 無需進一步詳細說明，本領域具有通常知識者可根據以上之敘述，充分利用本揭露。因此，以下具體實施例應被解釋為僅是說明性的，並且不以任何方式限制本揭露的其餘部分。本文引用的所有出版物均透過引用完整併入本文。

【0058】 材料及方法

【0059】 細胞培養

【0060】 人類 PDAC 細胞株 PANC-1 在 37°C 和 5% CO₂ 的加濕培養箱中培養，與添加了10%胎牛血清 (FBS)以及100 units/ml 的青黴素、100 µg/ml 的鏈

黴素和2 mM的L-麩胺酸 (1× PSG) 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中一起培養。人類 PDAC 細胞株 BxPC-3、人類 CRC 細胞株 SW620 和小鼠 PDAC 細胞株 Panc 02在37°C下在 5% CO₂ 和 95% 空氣環境中，與添加了10% FBS 和 1× PSG 的 RPMI-1640 培養基一起培養。在相同的生長條件下，人類CRC細胞株 LoVo 維持在含有 20% FBS 和 1× PSG 的 Ham's F-12 培養基中，人類視網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 (ATCC CRL-2302TM; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 在添加有 10% FBS 和 1× PSG 的 ATCC 配製的 DMEM:F12 培養基(型號#30-2006, ATCC)中培養。分離人臍靜脈內皮細胞 (HUVEC)，並在 37°C 和 5% CO₂ 的加濕培養箱中培養，與含有 20% FBS、100 units/ml 的青黴素、100 µg/ml 的鏈黴素、30 µg/ml 的內皮細胞生長補充劑 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) 的 M199 培養基一起培養。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA。 Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90α-secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hematol Oncol 2019;12:138。對於 EndoMT 誘導，HUVEC 與含 2% FBS 的 M199 培養基預培養16小時，然後加入 0.3 µg/ml 的OPN 並再培養24小時。小鼠內皮細胞株 3B-11 (ATCC CRL-2160TM) 在添加有 10% FBS 和 1×PSG 的 RPMI-1640 培養基中生長。對於 EndoMT 誘導，除了使用含有 1% FBS 的 RPMI-1640 培養基外，3B-11 細胞的處理方式與 HUVEC 相同。小鼠骨髓來源的巨噬細胞 (BMDM) 之製備方法如先前發表所述，並在添加 10% FBS 和 1×PSG 的 DMEM 中培養。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90α-secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hematol Oncol 2019;12:138。

【0061】 小鼠模型

【0062】 小鼠實驗是在國家衛生研究院動物護理和使用機構委員會的許可下進行的 (NHRI-IACUC-106031-A, 109022-M2-S02, and 109196-A)。為了建立組織間質增生性腫瘤移植模型，對12週齡的 C57BL/6 小鼠皮下接種了 Panc 02 癌細胞和 EndoMT 衍生的 CAF (即經 OPN 處理的 3B-11 細胞) 的混合物。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 2019;12:138；和 Chua KV, Fan CS, Chen LL, Chen CC, Hsieh SC, Huang TS. Octyl gallate induces pancreatic ductal adenocarcinoma cell apoptosis and suppresses endothelial-mesenchymal transition-promoted M2-macrophages, HSP90 α secretion, and tumor growth. *Cells* 2020;9(1):91。進一步的小鼠治療模式之圖示呈現於圖中及其相關說明與內文。治療效果之監測包括用游標卡尺從體表測量皮下生長中的腫瘤大小，用公式 $1/2 \times \text{長} \times \text{寬}^2$ 估算腫瘤體積，最後小鼠犧牲後也會摘取腫瘤並予以秤重。為了在人源化小鼠中建立組織間質增生性腫瘤移植模型，將植入了人類造血幹細胞 (human hematopoietic stem cells; hHSC) 的 NOD-SCID IL2R^{null} (ASID) 小鼠之皮下接種了 PANC-1 細胞和經 OPN 處理的 HUVEC 的混合物。此所使用的人源化小鼠 (即移植有 hHSC 的 ASID 小鼠) 由國家實驗動物中心 (Taipei, Taiwan) 提供，每隻小鼠含有人類 CD45⁺ 細胞量超過總淋巴細胞的 38%。為了建立 M2 巨噬細胞促進惡化的小鼠 PDAC 模型，對 C57BL/6 小鼠皮下接種了 Panc 02 癌細胞和經 rHSP90 α 處理過的 BMDM 之混合物。進一步的小鼠治療模式之圖示呈現於圖中及其相關說明與內文。此外，採用 LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre 基因轉殖小鼠 (即一般簡稱的 KC 鼠) 作為自發性發生

PDAC 的小鼠模型，以評估HH01抗體的治療效果。LSL-KrasG12D 和 Pdx1-Cre 育種小鼠是來自美國國家癌症研究所 (Frederick, Maryland, USA) 的人類癌症聯盟庫的小鼠模型，LSL-KrasG12D 小鼠與 Pdx1-Cre 小鼠交配以產生 LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre 小鼠，並如圖式和相關內文所示，對此基因轉殖小鼠進行了進一步的處理。

【0063】 西方墨點法分析

【0064】 根據一般常用的技術流程，使用 732-氨基酸 (a.a.) 全長的重組人類 HSP90 α (rHSP90 α ; PeproTech Co., Cranbury, NJ, USA) 免疫小鼠以產生小鼠融合瘤。參見 Yokoyama WM. Production of monoclonal antibody supernatant and ascites fluid. *Curr Protoc Mol Biol* 2008;83:11.10.1-11.10.10。接著，採用西方墨點法的一般程序初步篩選融合瘤。參見 Fan CS, Chen LL, Hsu TA, et al. Endothelial-mesenchymal transition harnesses HSP90 α -secreting M2-macrophages to exacerbate pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 2019;12:138。收集融合瘤培養基以與含有從電泳膠印漬而來的 HSP90 α 和分子量標記蛋白之膜條作反應。用加有 0.05% Tween-20 的 PBS (即 PBST) 洗滌三次後，將膜條與辣根過氧化氫酶偶聯的二級抗體培養 1 小時。再用 PBST 洗滌 3 次後，與 0.3 mg/ml 的 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺在 0.015% H₂O₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中反應後可看到免疫反應蛋白條帶 (band)。

【0065】 酶聯免疫吸附測定(ELISA)

【0066】 為了量化所製備的抗體對 HSP90 α 的結合活性，用含 12.5 ng/ml rHSP90 α 的捕捉緩衝液 (BioLegend, San Diego, CA, USA) 塗覆 96 孔盤，在 4°C 下隔夜培養。用 PBST 洗滌塗覆的孔盤兩次，然後用加有 3% 牛血清白蛋白 (BSA)

的 PBST 進行阻塞作用。投入製備的抗體並在室溫下培養 2 小時，在用 PBST 洗滌 3 次後，加入辣根過氧化氫酶偶聯的二級抗體，並在 37°C 下再培養 1 小時。洗滌 3 次後，將含有 0.3 mg/ml 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺的 0.015% H₂O₂ 加入每個孔中，且在室溫下避光培養 10 分鐘。透過添加 H₂SO₄ (0.5 M) 停止反應後以 Infinite M200 微量盤分析儀 (TECAN, Männedorf, Switzerland) 測量 OD₄₅₀ 值。此外，抗 HSP90 α 抗體的免疫球蛋白 (IgG) 同型特性分析乃使用小鼠 Ig 同型 ELISA Ready-Set-Go!TM 試劑盒 (eBioscienceTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 來進行。如前所述，ELISA 檢測流程還用於測定小鼠血清樣品中分泌的 HSP90 α 含量。參見 Chen JS, Hsu YM, Chen CC, Chen LL, Lee CC, Huang TS. Secreted heat shock protein 90 α induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF- κ B-mediated integrin α_v expression. J Biol Chem 2010;285(33):25458–66。

【0067】 鄰位連接試驗(PLA)

【0068】 以 2×10^5 個細胞 (每 22 \times 22 mm 蓋玻片) 的密度接種到玻璃蓋玻片上的 PANC-1 細胞與含 0.5% 血清的培養基在 37°C 和 5% CO₂ 濕潤環境下培養 16 小時。然後在不存在或存在 10 μ g/ml 對照 IgG 或測試的抗 HSP90 α 抗體的情況下，將細胞加入 PBS 或 15 μ g/ml 的 rHSP90 α ，再培養 24 小時。然後用 3% 多聚甲醛固定處理過的細胞，並用 Duolink 原位 PLA 試劑盒 (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) 中提供的阻塞溶液進行阻塞作用。此外，在 4°C 下將細胞樣品與和 HSP90 α 抗體 (1:80, cat. #AHP-1339, AbD Serotec, Raleigh, NC, USA) 或 IKK α 抗體 (1:80, cat. #3285, Epitomics Co., Burlingame, CA, USA) 做混合的 CD91 抗體 (1:80, cat. #550495, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 一起培養。用加有

Tween 20 (0.05%) 的 Tris 緩衝液洗滌三次後，根據 Duolink 原位 PLA 試劑盒的廠商說明書，將細胞樣品與 PLA 探針一起培養，以進行隨後的連接和擴增程序。最後，用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI; Sigma-Aldrich) 對細胞核進行複染。使用 Leica TCS SP5 II 共聚焦顯微鏡和 LAS AF Lite 4.0 軟體 (Leica, Wetzlar, Germany) 對圖像進行拍照和分析。

【0069】 癌細胞侵襲性測定

【0070】 在 37°C 和 5% CO₂ 的加濕培養箱中，癌細胞在含 0.5% FBS 的培養基中進行血清飢餓 16 小時，然後在 10 µg/ml 的對照 IgG 或測試的抗 HSP90α 抗體不存在或存在的情況下，加入 PBS 或 15 µg/ml 的 rHSP90α。再過 24 小時後，收集經處理的細胞並分為等分試樣 (每試樣 1 × 10⁵ 個細胞) 在含有 0.5% FBS 的培養基中，然後將每個等分試樣種到預先塗有 5 倍稀釋的基質膠 (Matrigel)(BD Biosciences) 的 Transwell™ 上層腔室中。允許癌細胞進行 16 小時侵襲作用穿過基質膠移向含有培養基和 10% FBS 的下層腔室。然後將留在 Transwell™ 篩板上的癌細胞固定並用 Giemsa 染色。使用 Axiovert S100/AxioCam HR 顯微鏡系統 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 對篩板下側的侵襲性癌細胞進行拍照，並藉由 Image-Pro Plus 軟體 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) 做量化。

【0071】 細胞類球體形成能力測定 (細胞幹性測定)

【0072】 將一千個癌細胞種到 24 孔盤的每個孔中，該孔盤預塗有 4 mm 厚的 0.5% 瓊脂糖層。在 37°C 和 5% CO₂ 濕潤環境下用無血清培養基培養 24 小時後，在 10 µg/ml 的對照 IgG 或測試的抗 HSP90α 抗體不存在或存在的情況下，向細胞添加 PBS 或 15 µg/ml 的 rHSP90α，持續培養 10~14 天，每 3 天補充一些新鮮的無血清培養基。最後，在 Olympus IX 71 倒置顯微鏡 (Center Valley, PA,

USA) 下對緊密、非固著性、及直徑 $> 100 \mu\text{m}$ 為特徵的細胞類球體進行拍照和計數，並以公式 (細胞類球體數/1000) $\times 100\%$ 計算細胞類球體形成百分比。

【0073】 融合瘤細胞抗體基因的選殖與定序

【0074】 從產生抗HSP90 α IgG的小鼠融合瘤細胞中分離總RNA，並透過反轉錄酶 (reverse transcriptase) 和隨機六核苷引子轉化為 cDNA。小鼠 Ig-引子套組 (Sigma-Aldrich) 用於 PCR 擴增 IgG 重 (H) 和輕 (L) 鏈的可變結構域 (即 V_H 和 V_L 結構域)。將 PCR 產物轉殖到 CloneJET PCR 選殖試劑盒 (Thermo Fisher Scientific) 中提供的 pJET1.2/blunt 轉殖載體中，然後進行殖株選擇和 DNA 定序分析。

【0075】 重組抗體的建構與表現

【0076】 IgG V_H 和 V_L 結構域的 cDNA 序列由 GeneDireX Inc. (Taoyuan, Taiwan) 合成，並且分別被插入到 pFUSEss-CHIg-hG1e1 和 pFUSE2ss-CLIg-hk 質體 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) 中的編碼 H 和 L 鏈之恆定結構域的區域之前的位點。在使用 pFUSEss-CHIg-hG1e1 當載體的選殖方面，將 V_H cDNA 序列插入人類 IL-2 訊號序列後面的 *EcoR* I-*Nhe* I 位點以表現含有在 Q250T、E356D、M358L 和 L428M 殘基處具有突變的 Fc 片段的重組蛋白。另一方面，V_L 結構域的 cDNA 在用 *EcoR* I 和 *BsiW* I 切割後，插入 pFUSE2ss-CLIg-hk 質體。使用 hIgHG-F/hIgHG-R 和 CLIg-F/CLIg-R 引子進一步擴增編碼重組 IgG H 和 L 鏈的重組 DNA 序列，然後分別插入 pcDNA3.4-TOPO 質體 (Thermo Fisher Scientific)。最後，用編碼 H 鏈和 L 鏈的重組 pcDNA3.4-TOPO 質體以 2:3 的比例共轉染 ExpiCHO 細胞。培養 8~10 天後收取轉染的 ExpiCHO 細胞的培養基，利用

Gibco™ ExpiCHO™ Expression System (Thermo Fisher Scientific) 的蛋白 A 管柱來純化重組抗體。

【0077】 抗體人源化與最佳化

【0078】 借助電腦模擬計算方法對小鼠單株抗體的 F(ab')₂ 區域進行人源化，所有計算均由 Discovery Studio 2018 軟體 (BIOVIA Inc., San Diego, CA, USA) 進行。透過已發表的方法鑑定互補決定區 (CDR)。參見 Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, MD, 1991。分別透過 PdbID: 4X0K 和 PdbID: 4Y5X 的 X 射線模板對 V_L 和 V_H 結構域的三維 (3D) 結構建模。參見 Johnson JL, Entzminger KC, Hyun J, Kalyoncu S, Heaner DP, Morales Jr IA, Sheppard A, Gumbart JC, Maynard JA, Lieberman RL. Structural and biophysical characterization of an epitope-specific engineered Fab fragment and complexation with membrane proteins: implications for co-crystallization. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2015;71:896-906；和 Moraga I, Wernig G, Wilmes S, Gryshkova V, Richter CP, Hong WJ, Sinha R, Guo F, Fabionar H, Wehrman TS, Krutzik P, Demharter S, Plo I, Weissman IL, Minary Majeti PR, Constantinescu SN, Piehler J, Garcia KC. Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands. Cell 2015;160:1196-1208。將小鼠抗體的 CDR 移植到自家的人類模板中，以進一步計算 3D 結構。計算包括聚集性、轉譯後修飾、蛋白水解酶切割、藥代動力學和穩定性等方面的突變建議，以改善重組抗體。

【0079】 HSP90α 結合親和力測定

【0080】 為了測量抗 HSP90α 抗體對 HSP90α 的結合特性，使用 Biacore T200 (Cytiva Co., Marlborough, MA, USA) 進行結合動力學測定。將感興趣的抗

HSP90 α 抗體當做基團施加到 Protein A Series S 感測器晶片上，以達到大約 3000 ~ 5000 個回應單位。將含一系列濃度的 rHSP90 α (1.5625-100 nM) 的 HBS-EP+ 緩衝液注入晶片表面，監測該結合 60 秒，最終解離時間為 1500 秒。

【0081】 視網膜細胞毒性試驗

【0082】 以每孔 4000 個細胞的密度將 ARPE-19 細胞接種到 96 孔盤上，然後用不同濃度的 17-AAG 或抗 HSP90 α 抗體 HH01 處理細胞 72 小時，然後加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑 (MTS ; Sigma-Aldrich) 做反應，最後測量 OD₄₉₀ 以評估細胞存活率。

【0083】 藥代動力學測定

【0084】 使用 Bltw:CD1(ICR) 公小鼠 (BioLASCO Taiwan Co., Taipei, Taiwan) 研究抗 HSP90 α 抗體 HH01 的藥代動力學。實驗鼠保持在任何時候都可以隨意獲得食物和水的狀態下進行測試，首先對體重為 25~30 g 的小鼠 (n = 5) 靜脈注射 10 mg/kg 的 HH01 抗體，為了測定 HH01 抗體的血清暴露量，在給 HH01 第 0.04、0.08、0.25、1、2、3、7、9、14、16、18、21、23、25、35、42、49、56 和 63 天後收集血液樣品，使用 ELISA 試劑組 (Cayman Chemical Co., Michigan, USA) 測量這些樣品的人類 IgG1 含量，以代表小鼠血清中剩餘的 HH01 含量。

【0085】 全長和截短 HSP90 α 的選殖、表現和純化

【0086】 選殖、表現和純化全長 HSP90 α (a.a. 1-732) 及其 3 個截短片段，包括 N 端加連接子之區域 (a.a. 1-272)、N 端到中間之區域 (a.a. 1-629) 和 C 端區域 (a.a. 630-732)。簡而言之，每個帶有 8 \times His 標籤的 cDNA 序列透過 PCR 從人類 ORF 殖株 (NM_005348) 中擴增，引子包含 *Xho* I 和 *Bam*HI 位點。純化 PCR 產物，用限制酶切割，然後插入 pET-23a 質體 (Sigma-Aldrich)。然後將重組質體轉

化到大腸桿菌 ClearColi[®] 接容細胞 (competent cells, Lucigen Co., Middleton, WI, USA) 中，並透過添加異丙基-D-硫代半乳糖-吡喃糖苷來刺激重組 DNA 的表現。根據廠商的說明書，使用 Ni-NTA 管柱 (Qiagen, Germantown, MD, USA) 進一步純化表現出的 8× His 標籤之全長和截短的 HSP90α。最後將純化的蛋白質對由 25 mM Tris-HCl (pH, 7.0)、50 mM NaCl、0.1% Triton X-100、50% 甘油、1 mM EDTA 和 1 mM DTT 組成的儲存緩衝液進行透析，並且透過 Bradford 蛋白質試驗 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) 決定蛋白質濃度。

【0087】 抗 HSP90α 抗體的 HSP90α 表位之鑑定

【0088】 首先，區域掃描策略用於初步決定出負責與我們製備的抗體結合的 HSP90α 區域。將上述全長 HSP90α 及其 3 個截短片段用於塗覆 96 孔 ELISA 盤，以用於測定受試小鼠單株抗體的結合活性。結果顯示受試小鼠單株抗體與 HSP90α 的 a.a. 1-272 區域結合，因此，在胜肽掃描策略中，由 Mimotopes Pty. Ltd. (Melbourne, Victoria, Australia) 合成了一個 132 胜肽庫，其係由一系列位移 2 a.a. 的 10-a.a. 胜肽所組成，以橫跨 HSP90α 的 a.a. 21~272 區域的序列。該系列胜肽用於塗覆 96 孔 ELISA 盤，以測定被測試抗體的結合活性。胜肽掃描分析結果表示 HSP90α 的 ₂₃₅AEEKEDK₂₄₄ 和 ₂₅₁ESEDKPEIED₂₆₀ 為與被測試抗體結合的表位，因此進一步採用丙胺酸掃描策略來研究哪個氨基酸殘基對被測試抗體的結合至關重要。用丙胺酸依序替換每個氨基酸，合成了 19 個胜肽 (Genozyme Biotech Inc., Taipei, Taiwan)，然後如上所述進行 ELISA 以測定被測試抗體的結合活性。

【0089】 馬森三色染色法

【0090】 用二甲苯對小鼠石蠟包埋的組織切片進行脫蠟，並經過一系列乙醇稀釋液進行再水合作用。使用 Trichrome Stain Kit (ScyTek Laboratories Inc., Utah, USA) 並根據廠商所提供的步驟進行馬森三色染色。切片染色後用系列漸濃之乙醇溶液和二甲苯脫水，最後在室溫下、黑暗中用封片液 (mounting solution) 封片過夜。使用Axiovert S100/AxioCam HR 顯微鏡系統對切片進行觀察和拍照。

【0091】 免疫組織化學染色

【0092】 用二甲苯對 4- μm 厚的小鼠組織切片進行脫蠟，並在逐漸稀釋之乙醇溶液中進行再水合作用。透過在 10 mM 檸檬酸鹽緩衝液 (pH 6.0) 及高壓下加熱切片 15 分鐘來進行抗原構形回復。內源性過氧化物酶活性利用加入 0.3% H_2O_2 來抑制。染色前，切片用 PBS 加 3% BSA 在室溫下進行 30 分鐘的阻塞作用。隨後，抗 F4/80 抗體 (1:100, cat. #MCA497R, AbD Serotec)、抗 CD163 抗體 (1:80, cat. #sc-33560, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 CD204 抗體 (1:100, cat. #GTX51749, GeneTex Inc., Hsinchu City, Taiwan)、抗 CD4 抗體 (1:100, cat. #GTX44531, GeneTex Inc.)、或抗 CD8 抗體 (1:100, cat. #GTX16696, GeneTex Inc.) 被加入並且在 4°C 反應過夜。洗滌後，加入二級抗體並在室溫下反應 30 分鐘。使用 DAKO REAL EnVision Detection System (Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark) 來檢測切片，並用蘇木精複染。將染色後切片脫水，用封片液封片，最後使用 Axiovert S100/AxioCam HR 顯微鏡系統進行觀察和拍照。

【0093】 免疫組織螢光染色

【0094】 如上所述，對小鼠組織切片進行脫蠟、再水合和抗原構形回復。切片在室溫下用 PBS 加 5% BSA 進行 30 分鐘的阻塞作用。隨後，分別加入 3 組

抗體並在 4°C 下反應過夜。抗體組 1 是由抗 F4/80 抗體 (1:100, cat. #MCA497R, AbD Serotec)、抗 iNOS 抗體 (1:100, cat. #GTX15323, GeneTex Inc.)、和抗 Arginase 1 抗體 (1:50, cat. #sc-271430, Santa Cruz Biotechnology) 所組成。抗體組 2 包含抗 CD4 抗體 (1:100, cat. #GTX44531, GeneTex Inc.) 和抗 TNF- α 抗體 (1:75, cat. #sc-52746, Santa Cruz Biotechnology)。抗體組 3 由抗 CD8 抗體 (1:100, cat. #GTX16696, GeneTex Inc.) 和抗 TNF- α 抗體 (1:75, cat. #sc-52746, Santa Cruz Biotechnology) 所組成。洗滌後，分別加入螢光標記的二級抗體並在室溫下進行反應 1 小時，細胞核則用 DAPI 做複染，最後使用 Leica TCS SP5 II 共聚焦顯微鏡和 LAS AF Lite 4.0 軟體對切片進行觀察、拍照和分析。

【0095】 結果

【0096】 小鼠抗 HSP90 α 單株抗體的製備和特性分析

【0097】 六個融合瘤殖株來自用人類 HSP90 α 的重組蛋白質 (rHSP90 α) 免疫的小鼠。收集它們的培養上清液用於在使用標準的西方墨點法和 ELISA 流程中測定與 HSP90 α 的結合活性。除了 clone-5 外，這些融合瘤產生的抗體均可與抗原 rHSP90 α 發生結合 (圖 1(a))。透過 ELISA 進一步量化結合活性，Clone-2 和 Clone-6 表現出前兩高的 HSP90 α 結合含量 (圖 1(b))，因此被選擇用於以下進一步的測定。純化兩個殖株的抗體，且兩者均被鑑定為含有 κ 輕鏈的 IgG2b 同型免疫球蛋白 (圖 1(c))。它們可以有效地阻斷 eHSP90 α 與其細胞表面受體 CD91 的結合以及 CD91 與下游 IKK α 的結合 (圖 1(d))。鑑於 eHSP90 α 透過多種機制發揮其促癌作用，例如誘導癌細胞 EMT、遷移、侵襲和細胞幹性的獲得 (gain-of-stemness)，與之前的研究一致，我們的 Transwell 侵襲試驗顯示 rHSP90 α 可作為癌細胞侵襲力的有效誘發劑 (圖 1(e))，然而 rHSP90 α 的誘發可以被 Clone-2

和 Clone-6 抗 HSP90 α 抗體大幅消除 (圖 1(f))。此外，rHSP90 α 也可以誘發癌細胞的細胞幹性 (透過增加的細胞類球體形成能力反映出來)，此誘發也可以被 Clone-2 和 Clone-6 抗體顯著抑制 (圖 1(g))。綜合這些數據，表明抗 HSP90 α 單株抗體可以被開發並用於抑制 eHSP90 α 促進腫瘤細胞的惡化。

【0098】 Clone-2 抗 HSP90 α 抗體的人源化

【0099】 接下來，我們分別選殖並分析了 Clone-2 和 Clone-6 抗 HSP90 α 抗體的 IgG H 和 L 鏈的可變結構域 (即 V_H 和 V_L) 之 cDNA 序列。cDNA 序列和編碼胺基酸序列列表於表 1 和表 2 中。進一步選擇 Clone-2 進行人源化。合成 V_H 和 V_L DNA 序列並插入到質體載體中，分別在表現人類 IgG H 鏈和 L 鏈恆定結構域 (即 C_H 和 C_L) 的區域之前，以表現名為「Clone-2-chimera」的重組 IgG1 抗體。此外，根據電腦輔助結構建模和計算的建議，我們建構了 3 個 Clone-2-chimera 的突變體，命名為 Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC，旨在改善抗體在聚集、蛋白酶切割、轉譯後修飾、藥代動力學和穩定性等方面的特性。突變位點列表於表 3 中。這些工程化的人源化重組抗體由 ExpiCHO 細胞表現，並在純化後分析 HSP90 α 結合親和力。使用 Biacore T200 進行動力學分析以確定 Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 抗體對 rHSP90 α 的結合特性 (圖 2(a))。進一步計算出 Clone-2-chimera、Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 抗體的平衡解離常數 (K_D) 值，分別為 0.94×10^{-10} 、 1.87×10^{-10} 、 1.48×10^{-10} 、和 1.47×10^{-10} M (圖 2(b))，表示 Clone-2-hA、Clone-2-hB 和 Clone-2-hC 抗體中的突變沒有顯著降低其對 HSP90 α 結合親和力。

【0100】 表 3

	突變位點
--	------

Clone-2-hA	輕鏈：L3V, K45Q, S74T, R77S, G81E 重鏈：V4L, K15G, K19R, K43Q, Q75K, F76N, M77T, K83R, M89V
Clone-2-hB	輕鏈：L3V, V27L, K45Q, S74T, R77S, G81E 重鏈：V4L, K15G, K19R, K43Q, Q75K, F76N, M77T, N82S, K83R, M89V
Clone-2-hC	輕鏈：L3V, V27L, K45Q, S74T, R77S, G81E 重鏈：V4L, K15G, K19R, K43Q, K52L, Y55S, Q75K, F76N, M77T, N82S, K83R, M89V

【0101】 為了初步評估這些人源化抗 HSP90 α 抗體的抗癌功效，我們測定了它們對 rHSP90 α 誘發的 PDAC 細胞侵襲和類球體形成的抑制活性。Transwell 侵襲試驗結果顯示，在抑制 rHSP90 α 誘發人類 PDAC PANC-1 細胞侵襲性方面，Clone-2-chimera 和 Clone-2-hA 優於 Clone-2-hB、Clone-2-hC 及其母株 Clone-2 (圖 2(c))。在類球體形成試驗中，Clone-2-hA 在抑制 rHSP90 α 誘發的 PANC-1 細胞類球體形成方面仍然表現出最突出的功效 (圖 2(d))。因此，最終選擇 Clone-2-hA 並將其命名為 HH01 抗體，用於進一步的體外和體內測定。HH01 抗體在 PBS 中的溶解度 > 10 mg/ml，動態光散射測定 (Dynamic Light Scattering assay) 顯示 HH01 抗體是直徑落在 10~50 nm 範圍內、取平均值就是直徑約為 19.33 nm 大小的分子，表示 HH01 抗體不易形成聚集體。考量到臨床應用上，格爾德黴素 (geldanamycin) 和間苯二酚衍生物等小分子 HSP90 抑制劑在視網膜上累積到一定程度時會導致視網膜感光細胞損傷，我們透過研究 HH01 抗體對於 ARPE-19 視網膜色素上皮細胞存活率的影響來進一步評估 HH01 抗體對於非癌性視網膜細胞是否表現出任何毒性。如圖 2(e) 所示，17-AAG 對 ARPE-19 細胞表現出細胞毒性，IC₅₀ 為 64.7 nM，然而，HH01 抗體即使在其濃度達到 594.3 nM (100 μ g/ml)，

也沒有對 ARPE-19 細胞造成任何明顯的細胞毒性。此外，在雄性小鼠中研究了 HH01 抗體的藥代動力學，結果顯示在小鼠血液內，HH01 抗體的清除速率為 3×10^{-3} ml/min/kg，穩定狀態下體積為 80 ml/kg，測得 HH01 抗體的半衰期 ($T_{1/2}$) 約為 18.4 天 (圖 2(f))。顯示 HH01 抗體在靜脈注射給藥後，具有長的 $T_{1/2}$ 和高血清暴露量，適合進一步開發成為一治療藥物。

【0102】 HH01 抗體所辨識表位之鑑定

【0103】 如表 3 所列，HH01 抗體能夠專一性結合人類 HSP90 α ，其互補決定區 (CDR) 中具有嶄新的胺基酸 (a.a.) 序列，因此我們欲鑑定 HSP90 α 的哪個區域被 HH01 抗體結合。在初步的鑑定工作中，我們採用 HSP90 α 區域掃描的策略來界定出負責與 Clone-2 抗體結合的 HSP90 α 區域。全長 HSP90 α (a.a. 1~732) 及其 3 個截短片段，包括 N 端加連接子之區域 (a.a. 1~272)、N 端到中間之區域 (a.a. 1~629) 和 C 端區域 (a.a. 630~732) 被選殖、表現和純化。隨後，通過 ELISA 方法測定 Clone-2 抗體與全長和截短的三段 HSP90 α 片段的結合活性。結果顯示，Clone-2 抗體與 a.a. 1~272 區域之結合能力相若於與全長蛋白之結合 (圖 3(a))，表示 Clone-2 抗體的結合表位可能在 HSP90 α 的 N 端到連接子之區域內 (a.a. 1~272)。進一步地，我們採用胜肽掃描策略來鑑定 Clone-2-chimera 和 HH01 抗體所結合的 HSP90 α 表位。建立了一個胜肽庫，由一系列 10-a.a. 胜肽組成，任兩個連續的胜肽之間有 8-a.a. 重疊以掃描 HSP90 α 的 a.a. 21~272 區域的序列。透過 ELISA 測定 Clone-2-chimera 和 HH01 抗體對這一系列 10-a.a. 胜肽的結合活性。結果顯示，Clone-2-chimera 抗體的可能表位位點是 HSP90 α 的 235 AEEKEDK 244 和 251 ESEDKPEIED 260 (圖 3(b))。一致地，這兩個位點也可以作為 HH01 抗體的結合表位 (圖 3(c))。基於這兩個位點的序列，我們合成了兩個

系列的 10-a.a. 胜肽，以丙胺酸 (alanine) 依序取代氨基酸殘基。丙胺酸掃描策略用於鑑識 Clone-2-chimera 和 HH01 抗體與表位位點結合的關鍵氨基酸。結果顯示，當用丙胺酸替換 E237、E239、K241、E253 和 K255 時，Clone-2-chimera 抗體與表位位點的結合活性急劇下降 (圖 3(d))。此外，另一 D240 也負責與 HH01 抗體的結合 (圖 3(d))。根據上述表位定位結果，我們合成了一個有 HSP90 α 的 a.a. 227~272 區域序列的胜肽。該胜肽競爭性抑制了 rHSP90 α 誘發的 PANC-1 細胞侵襲 (圖 3(e)) 以及類球體形成 (圖 3(f))，證實含有表位位點的 HSP90 α 區域可能是新穎的抗癌策略的標靶。

【0104】 HH01 抗體在組織間質增生性小鼠 PDAC 移植模型中的預防和治療效果的評估

【0105】 HH01 抗體用於進一步的體內抗癌試驗。在我們之前的研究中，EndoMT 衍生的 CAF 顯著促進了胰管腺癌 Panc 02 細胞在實驗鼠體內的腫瘤生長。我們的馬森三色染色結果進一步揭示了 EndoMT 細胞參與的 Panc 02 腫瘤表現出顯著程度的組織間質增生，這在僅源自 Panc 02 細胞的腫瘤中未觀察到 (圖 4(a))。為了研究 HH01 抗體的體內抗癌活性，我們按照先前使用小鼠單株抗體的給藥方式，並在 EndoMT 參與的小鼠 PDAC 模型中測定了它的癌症預防活性。對 C57BL/6 小鼠皮下接種 Panc 02 細胞+EndoMT 細胞。在接種後第 4 天，進一步每隔 3 天對小鼠靜脈內施用每劑 5 mg/kg 的對照 IgG 或 HH01 抗體，共 8 劑 (圖 4(b))。如圖 4(c) 所示，HH01 抗體有效抑制了 EndoMT 參與的 Panc 02 癌細胞在小鼠皮下的腫瘤生長。在接種後第 30 天犧牲所有小鼠，取其腫瘤秤重。正如預期，HH01 抗體顯著抑制了 Panc 02 加 EndoMT 細胞的腫瘤生長能力 ($p < 0.001$ ，圖 4(d))。HH01 抗體也顯著預防了腫瘤的組織間質增生 (圖 4(e))。此外，在組織間質增生

的小鼠 PDAC 模型的血清中，我們檢測到增加的 eHSP90 α 含量，並且小鼠在處理過 HH01 抗體後，其血清 HSP90 α 含量顯著降低 (圖 4(f))。這些數據表明，HH01 抗體是一種可防止組織間質增生性的 PDAC 細胞腫瘤生長的有效藥劑。

【0106】 為了評估 HH01 抗體在組織間質增生性的小鼠 PDAC 模型中的治療效果，對 C57BL/6 小鼠皮下接種 Panc 02 加 EndoMT 細胞移植物。在接種後第 20 天，小鼠患有平均大小為 75 mm³ 的腫瘤，並開始以每劑為 5 mg/kg 的對照 IgG 或 HH01 抗體對小鼠靜脈內注射，每間隔 7 天一次，共三次 (圖 5(a))。體表測量結果顯示 HH01 治療完全抑制了皮下腫瘤生長動力 (圖 5(b))。在第 41 天取腫瘤秤重，數據顯示在 HH01 治療的小鼠組中腫瘤生長確實受到抑制 (圖 5(c))。HH01 治療還顯著降低腫瘤的組織間質增生程度 (圖 5(d)) 和血清 HSP90 α 含量 (圖 5(e))。總之，這些數據表明 HH01 抗體可開發為有效治療組織間質增生性 PDAC 的治療劑。

【0107】 HH01 抗體在組織間質增生性的人源化小鼠 PDAC 移植模型中的治療效果的評估

【0108】 我們還評估了 HH01 抗體在組織間質增生性的人源化小鼠 PDAC 模型中的治療效果。對 hHSC 移植的 ASID 小鼠皮下接種人類胰管腺癌 PANC-1 細胞與 EndoMT 衍生細胞的混合物。在接種後第 20 天，將小鼠分成 3 組進行進一步處理 (圖 6(a))。對 A 組小鼠 (n = 3) 靜脈注射每劑 5mg/kg、間隔 7 天共三劑的對照 IgG。對 B 組小鼠 (n = 5) 注射三次對照 IgG 加兩次吉西他濱，而 C 組小鼠 (n = 5) 注射三次 HH01 抗體加兩次吉西他濱。小鼠在接種 PANC-1 + EndoMT 細胞後第 20 天接受第一劑 5 mg/kg 的 IgG (B 組) 或 HH01 (C 組)，4 天後，進一步靜脈注射第一劑 100 mg/kg 的吉西他濱。其他兩劑的對照 IgG 或 HH01 抗體以

及另一劑的吉西他濱各自以 7 天間隔施用 (圖 6(a))。直到第 39 天，每 3 天對皮下生長中的腫瘤進行體表測量，並將腫瘤生長曲線繪製為圖 6(b)。與單獨用 IgG 治療的小鼠相比，用 IgG 加吉西他濱治療的小鼠在第二次施用吉西他濱後顯著抑制了腫瘤。然而，在用 HH01 加吉西他濱治療的小鼠中，僅在首劑 HH01 注射後 4 天就觀察到有效的腫瘤生長停止，在施用第二劑吉西他濱和第三劑 HH01 後，腫瘤進一步縮小 (圖 6(b))。在第 39 天犧牲所有小鼠，用 HH01 加吉西他濱治療的小鼠的腫瘤被顯著抑制 (圖 6(c))。HH01 抗體與吉西他濱的組合在抑制腫瘤的組織間質增生 (圖 6(d)) 以及血清 HSP90 α 含量 (圖 6(e)) 方面也表現出顯著的功效。這些數據指出，HH01 抗體與其它藥劑如吉西他濱組合可以更有效對付組織間質增生性的 PDAC。

【0109】 HH01 抗體在 K-Ras^{G12D} 誘發的組織間質增生性的小鼠 PDAC 模型中的治療效果的評估

【0110】 接下來，我們評估 HH01 抗體在自發性發展 PDAC 的小鼠模型中之治療效果。臨床上，大於 90% 的 PDAC 患者在其腺癌細胞中含有活化的 K-Ras 突變體。在基因轉殖小鼠模型中，胰管上皮細胞含有活化的突變 K-Ras^{G12D} 即可經由胰腺細胞管化病變 (ADM)、胰管上皮內瘤病變 (PanIN) 自發性發展出 PDAC。這些胰管上皮細胞表現 K-Ras^{G12D} 的基因轉殖鼠 (即 LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre 鼠，簡稱 KC 鼠) 早在出生後 3 個月就出現 ADM，3~6 個月是 PanIN 演進期，然後在 6 個月月齡發展出 PDAC 病兆。馬森三色染色結果顯示，從 3 月齡 KC 小鼠的胰臟組織即可檢測到少量的組織間質增生，到 6 月齡以上整個胰臟就呈現廣泛的組織間質增生現象，然而此情形並未在 LSL-KrasG12D 對照小鼠中檢測到。為了評估 HH01 抗體的治療效果，KC 小鼠在 6 個月大發展出 PDAC 病兆後開始接受

治療，從靜脈內注射每劑 5 mg/kg 的對照 IgG 或 HH01 抗體，開始時一週一劑，施用 4 劑，接下來每兩週一劑，施用 4 劑，最後每個月一劑，施用 2 劑，總共是 10 劑的療程 (圖 7(a))。整個實驗以第 450 天為終點，用 Kaplan-Meier 法繪製 IgG 或 HH01 治療的小鼠之存活曲線 (圖 7(b))。結果顯示 7 隻 IgG 治療的小鼠有 6 隻在 450 天內死亡，但 9 隻 HH01 治療小鼠中有 7 隻在第 450 天仍然存活。IgG 和 HH01 治療的小鼠的中位存活時間分別為 344 天和 > 450 天 (透過等級檢定 (Log rank) 分析， $p = 0.004$)。與正常 C57BL/6 小鼠或 LSL-KrasG12D 對照小鼠的光滑胰臟外觀不同，無論 KC 小鼠是否接受 HH01 治療，其胰臟都呈現結節、硬化的現象 (圖 7(c))。然而，馬森三色染色顯示，使用 HH01 治療並且在第 450 天仍然存活的 KC 鼠之胰臟組織間質增生現象明顯復元 (圖 7(c))。觀察到一隻 IgG 治療的 KC 鼠和一隻 HH01 治療的 KC 鼠在肝臟外觀上出現小腫瘤結節，但在數目上，經 HH01 治療的小鼠明顯比 IgG 治療的小鼠減少 (圖 7(c))。馬森三色染色進一步顯示了 HH01 治療的小鼠之肝臟組織間質增生的現象明顯獲得改善 (圖 7(c))。此外，無論是 IgG 或 HH01 治療的 KC 鼠，其犧牲前所收集的最後一次血清樣品的 HSP90 α 含量與其在 IgG 或 HH01 治療之前所收集的樣品含量進行比較 (即治療後對治療前比較)。我們的數據顯示，可以透過 HH01 治療有效壓制 KC 小鼠血清中 HSP90 α 含量之上升 (圖 7(d))。

【0111】 M2 巨噬細胞促進惡化的小鼠 PDAC 模型中 HH01 抗體治療功效的評估

【0112】 為了建立 M2 巨噬細胞參與的小鼠 PDAC 模型，我們將 rHSP90 α 處理過的 BMDM 與 Panc 02 癌細胞混合，然後接種於 C57BL/6 小鼠的皮下。為了與 M1 巨噬細胞進行比較，將 Panc 02 細胞和 LPS 處理過的 BMDM 接種到另

一組小鼠中。「Panc 02 + rHSP90 α 處理的 BMDM」組別在接種後第 6 天開始生長，並且腫瘤繼續比其它組別生長更快 (圖 8(a))。接種後第 30 天，犧牲所有小鼠，取腫瘤秤重。如圖 8(b) 所示，rHSP90 α 處理的 BMDM 顯著促進 Panc 02 腫瘤的生長，這與 LPS 處理的 BMDM 產生的腫瘤抑制作用形成對比。免疫組織化學染色分析結果顯示，與取自其它小鼠組別的腫瘤塊相比，來自「Panc 02 + rHSP90 α 處理的 BMDM」組別的腫瘤組織含有更多 CD163⁺ 細胞，但 CD4⁺ 和 CD8⁺ 細胞的含量顯著較少 (圖 8(c))。在 LPS 處理的 BMDM 小鼠組別中，被抑制的腫瘤組織含有相對較高含量的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 細胞。用 4',6-二脘基-2-苯基吡啶 (DAPI) 進行的核染色也顯示染色質凝聚和核碎裂程度升高 (圖 8(d))，這表明 LPS 誘導的 M1 巨噬細胞招召募 CD4⁺ 和 CD8⁺ 免疫細胞並引起更多的細胞凋亡以抑制 Panc 02 腫瘤的生長。因此，由這些結果印證 eHSP90 α 所誘導的 M2 型巨噬細胞可以表現出有效的免疫抑制和腫瘤促進能力。進一步地，我們評估了 HH01 抗體在這種 M2 巨噬細胞促進的小鼠 PDAC 模型中的治療效果。對 C57BL/6 小鼠皮下接種 Panc 02 加 rHSP90 α 處理過的 BMDM 細胞移植物。在接種後第 27 天，每隻小鼠長出大約 0.1-cm³ 的腫瘤並開始用 5 mg/kg 的對照 IgG 或 HH01 抗體治療 (圖 9(a))。由於 HH01 在小鼠血液中的半衰期約 18.4 天，在間隔 7 天後追加第二劑加強 HH01 抗體的作用。如圖 9(b) 所示，3 天後立即觀察到 HH01 治療後腫瘤急劇縮小。在第 42 天犧牲所有小鼠，結果顯示與對照組的小鼠之持續生長的腫瘤相比，HH01 治療的小鼠的腫瘤顯著縮小 ($p = 0.001$ ，圖 9(c))。一致地，在 HH01 治療後，血清 HSP90 α 含量的升高也被顯著抑制 (圖 9(d))。腫瘤樣品的免疫組織化學分析還顯示，由於 HH01 治療後 M2 巨噬細胞的減少，M2 巨噬細胞所抑制的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 細胞量得以有效地提高 (圖 9(e))。最後，免疫組

織螢光染色結果證實了這些結果。從 HH01 治療的小鼠腫瘤組織中觀察到 F4/80⁺iNOS⁺ 細胞 (M1 巨噬細胞) 的增加和 F4/80⁺Arginase1⁺ 細胞 (M2 巨噬細胞) 的減少 (圖 10(a)和 10(b))。一致地，回應 HH01 抗體治療，CD4⁺TNF- α ⁺ 細胞 (效應性 T 細胞) 和 CD8⁺TNF- α ⁺ 細胞 (細胞毒殺性 T 細胞) 的含量皆增加 (圖 10(c) 和 10(d))。這些數據表示，HH01 抗體是抑制 M2 巨噬細胞促進 PDAC 惡化以及提高腫瘤微環境免疫性的有效藥劑。

【0113】 結論

【0114】 組織間質增生是許多惡性腫瘤的標誌，與腫瘤快速生長、轉移發生和治療結果不佳有著密切相關性。能夠抑制組織間質增生來緩解腫瘤的惡性進展並提高治療效果的試劑和策略，一直以來都是癌症患者急迫的醫療需求。癌症相關纖維母細胞(CAF)的大量產生是組織間質增生的主要原因之一，內皮細胞的內皮間質轉化(EndoMT)為 CAF 提供了豐富的來源。EndoMT 衍生的 CAF 將大量骨髓衍生的巨噬細胞召集到腫瘤中，並促進這些巨噬細胞向 M2 型極化。M2 型巨噬細胞不僅分泌 IL-10 和 TGF- β 以有效抑制細胞毒性 T 細胞，還產生 VEGF、bFGF 和 PDGF 以刺激腫瘤血管生成。此外，這些 M2 型巨噬細胞表現和分泌大量的 eHSP90 α ，創造了一個富含 eHSP90 α 的腫瘤微環境，能促進癌細胞之擴散和獲得細胞幹性。因此，eHSP90 α 和富含 eHSP90 α 的腫瘤微環境可被視為新型癌症治療的標靶。在我們之前發表的小鼠腫瘤模型結果中，EndoMT 衍生的 CAF 顯著促進了胰管腺癌細胞移植物的腫瘤生長。然而，自癌細胞接種後第 4 天起，當小鼠接受小鼠抗 HSP90 α 單株抗體靜脈內注射時，EndoMT 促進腫瘤生長的現象被顯著抑制。我們已經對這種小鼠抗 HSP90 α 單株抗體的基因進行了定序。經過電腦輔助分析和建議，我們進一步建構了人源化和改良的抗

體基因。已將重組基因導入 ExpiCHO 細胞以表現人源化抗 HSP90 α 抗體 HH01。透過一系列的分析，我們知道 HH01 抗體的 CDR 有一個嶄新的胺基酸序列，對 eHSP90 α 表現出很高的結合親和力，KD 值為 1.87×10^{-10} M。HH01 抗體不易形成聚集體。其水溶性好，但不易從小鼠體內排出，在血液中的半衰期 >18.4 天。對視網膜色素上皮細胞無細胞毒性，也不會引起小鼠脾臟腫大。HH01 抗體在抗癌功能方面也表現出優越性。它有效地抑制胰管腺癌和大腸直腸癌細胞株的侵襲性和細胞類球體形成能力。我們三個小鼠癌症模型的結果表明，單獨使用 HH01 抗體即可以消除 EndoMT 促進的組織間質增生性的腫瘤生長，並且還可以與吉西他濱聯合使用以發揮協同作用。在自發性 PDAC 形成的基因轉殖小鼠模型中，它可以有效抑制 K-Ras 突變引起的組織間質增生性的和胰管腺癌的發展及其肝轉移，從而延長實驗小鼠的存活時間。此外，在 M2 巨噬細胞惡化的小鼠 PDAC 模型中，HH01 抗體能有效抑制腫瘤生長並提高腫瘤微環境的免疫性。

【0115】 本說明書中公開的所有特徵可以任何組合方式組合。本說明書中公開的每個特徵可使用於相同、等同或類似目的的其他特徵代替。因此，除非另有明確說明，否則所揭露的每個特徵僅是等同或類似特徵的通用系列的示例。

【0116】 此外，根據以上描述，本領域具有通常知識者可輕易確定所描述的基本特徵，並且在不脫離其精神和範圍的情況下，可對本公開進行各種改變和修改以使其適應各種用途和情況。因此，其他實施例也在請求項範圍內。

【符號說明】

【0117】 無

【生物材料寄存】

【0118】 無

序列表

<110> 國家衛生研究院

<120> 抗HSP90 α 抗體及其用途

<130> A3957/0556PCT

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 353

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 1

```

aggatgcaggt tgttgagtct ggtggaggat tggatgcagcc taaagggtca ttgaaactct      60
catgtgcagc ctctggattc accttcaaaa cctacgccat gaactgggtc cgccaggctc      120
caggaaaggg tttggaatgg gttgctcgca taagaagtaa aagtagaaat tatgcaacat      180
attatgccga ttcagtgaat gacaggttca ccatctccag agatgattca caattcatgt      240
tctatctgca aatgaacaac ttgaaaactg aggacacagc catgtattac tgtgttgggg      300
ggggctcggg ttttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca              353

```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 2

```

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

```

```

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr

```

20

25

30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Arg Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Phe Met
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Val Gly Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區 CDR1

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區 CDR2

<400> 4

Ile Arg Ser Lys Ser Arg Asn Tyr Ala Thr
 1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區 CDR3

<400> 5

Val Val Gly Gly Ser Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 6

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 6

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcagcatc 240

agcagagtgg aggctgggga tctgggagtt tattactgct ttcaaggffc acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 7

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Gly Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變區 CDR1

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變區 CDR2

<400> 9

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變區 CDR3

<400> 10

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 11

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 11

gagggtgcagc tgggtggagtc tggaggagga ctggtgcagc caggaggaag cctgagactg 60

tcttgcgccg cttccggctt cacctttaag acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120

cctggacagg gactggagtg ggtggctagg atccggtcta agtcccggaa ttacgccacc 180

tactatgctg actccgtgaa ggatagattc acaatcagcc gcgacgattc taagaaccag 240

ttttatctgc agatgaacaa tctgcgcacc gaggacacag ccgtgtacta ttgcgtggtg 300

ggcggcagcg gcttcgatta ttggggccag ggcaccacac tgaccgtgtc cagc 354

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 12

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Arg Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Val Gly Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變區 CDR1

<400> 13

Thr Phe Lys Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 14

<211> 19

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變區 CDR2

<400> 14

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Arg Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變區 CDR3

<400> 15

Gly Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 16
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 16
gacgtggtea tgaccagac accactgtcc ctgcctgtga gcctgggcga tcaggccagc 60
atctcttgca ggtccagcca gtctatcgtg cactccaacg gcaataccta cctggagtgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtccccccag ctgctgatct acaaggtag caacaggttc 180
tctggagtgc ctgaccggtt ttccggaagc ggatctggca cagatttcac cctgacaatc 240
tcttccgtgg aggctgagga cctgggcgtg tactattggt tccagggctc ccatgtgcca 300
tggacctttg gcggcggcac aaagctggag atcaag 336

<210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 17

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變區 CDR1

<400> 18

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變區 CDR2

<400> 19

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變區 CDR3

<400> 20

Phe Gln Gly Ser His Val Pro
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種分離的抗體，包括：

SEQ ID NO: 2的重鏈可變區序列的重鏈互補決定區 CDR1、CDR2和 CDR3，其中該重鏈 CDR1 具有 SEQ ID NO: 3 序列，該重鏈 CDR2 具有 SEQ ID NO: 4 序列，該重鏈 CDR3 具有 SEQ ID NO: 5 序列；以及

SEQ ID NO: 7的輕鏈可變區序列的輕鏈互補決定區 CDR1、CDR2和 CDR3，其中該輕鏈 CDR1 具有 SEQ ID NO: 8 序列，該輕鏈 CDR2 具有 SEQ ID NO: 9 序列，以及該輕鏈 CDR3 具有 SEQ ID NO: 10 序列。

【請求項2】 一種分離的抗體，包括：

SEQ ID NO: 12 的重鏈可變區序列的重鏈互補決定區 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中該重鏈 CDR1 具有 SEQ ID NO: 13 序列，該重鏈 CDR2 具有 SEQ ID NO: 14 序列，該重鏈 CDR3 具有 SEQ ID NO: 15 序列；以及

SEQ ID NO: 17 的輕鏈可變區序列的輕鏈互補決定區 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中該輕鏈 CDR1 具有 SEQ ID NO: 18 序列，該輕鏈 CDR2 具有 SEQ ID NO: 19 序列，以及該輕鏈 CDR3 具有 SEQ ID NO: 20 序列。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述之抗體，其中，該分離的抗體係一包含 Fc 區之抗體、一 Fab 片段、一 Fab' 片段、一 F(ab')₂ 片段、一單鏈抗體、一 scFV 多聚體、一單株抗體、一單價抗體、一多特异性抗體、一人源化抗體或一嵌合抗體。

【請求項4】 一種核酸分子，包含編碼如請求項 1 至 3 中任一項所述之分離的抗體之核酸序列。

【請求項5】 一種醫藥組成物，包括如請求項 1 至 3 中任一項所述之分離的抗體或請求項 4 所述之核酸分子；以及一醫藥可接受之載體。

【請求項6】 一種醫藥組成物用於製備治療癌症藥物的用途，其中該醫藥組成物包括：如請求項 1 至 3 中任一項所述之分離的抗體或如請求項 4 所述之核酸分子，且該癌症具有一組織間質增生特徵或一 M2 巨噬細胞所惡化特徵。

【請求項7】 如請求項 6 所述之用途，其中該癌症具有一組織間質增生特徵。

【請求項8】 如請求項 6 所述之用途，其中該癌症具有一 M2 巨噬細胞所惡化特徵。

【請求項9】 如請求項 6 所述之用途，其中該癌症是胰臟癌、大腸直腸癌、乳癌、肝癌或肺癌。

【請求項10】 如請求項 6 所述之用途，其中該醫藥組成物更包括一治療劑。

【請求項11】 如請求項 10 所述之用途，其中該治療劑是吉西他濱 (gemcitabine)。

【請求項12】 一種如請求項 1 至 3 中任一項所述之分離的抗體之用途，用於檢測一主體的血液 HSP90 α 含量以監測該主體的腫瘤縮小。

【請求項13】 一種醫藥組成物用於製備治療組織間質增生藥物之用途，其中該醫藥組成物包括：如請求項 1 至 3 中任一項所述之分離的抗體或如請求項 4 所述之核酸分子。

【發明圖式】

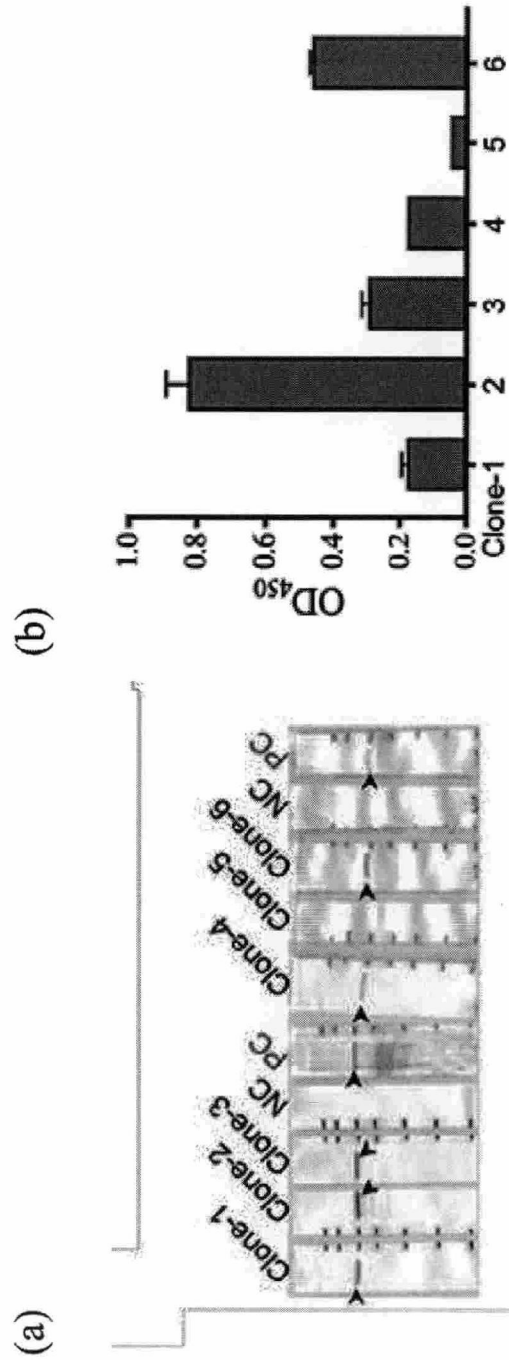


圖 1

(c)

Ig 同型	Clone-2	Clone-6
IgG1	-	-
IgG2a	-	-
IgG2b	++++	++++
IgG3	-	-
IgA	-	-
IgM	-	-
κ 輕鏈	++	++
λ 輕鏈	-	-

圖 1 (續)

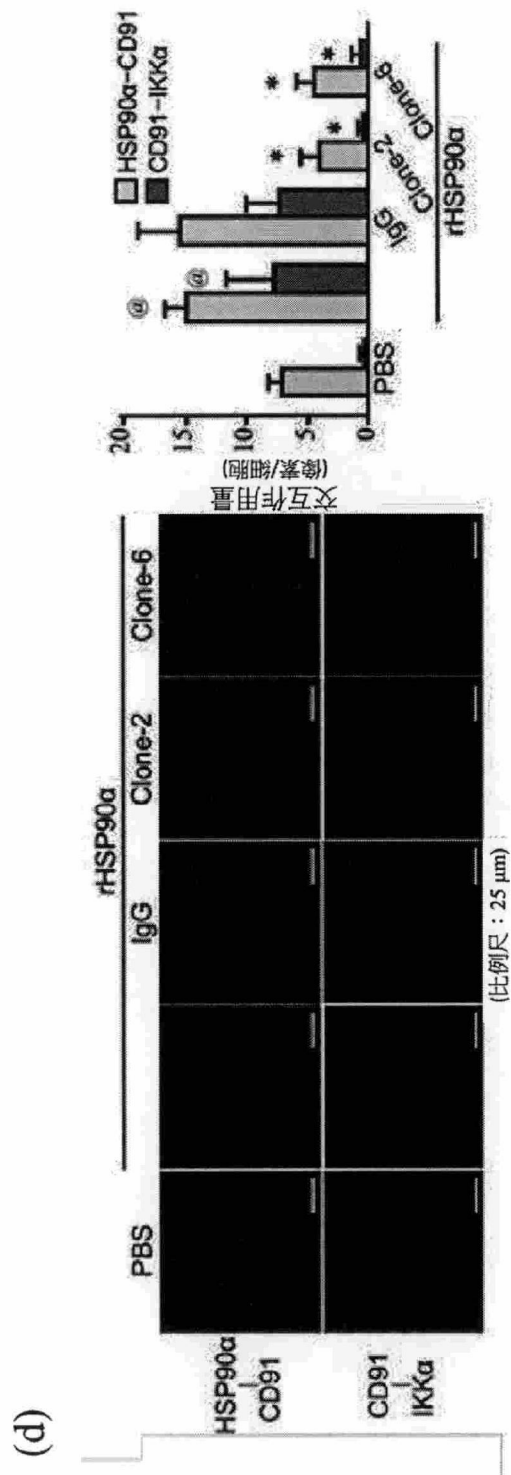


圖 1 (續)

(e)

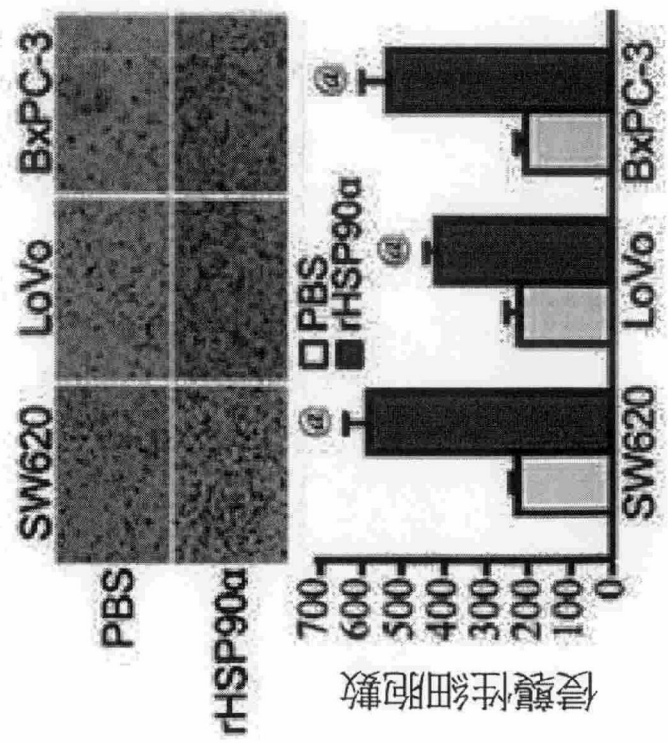


圖 1 (續)

(f)

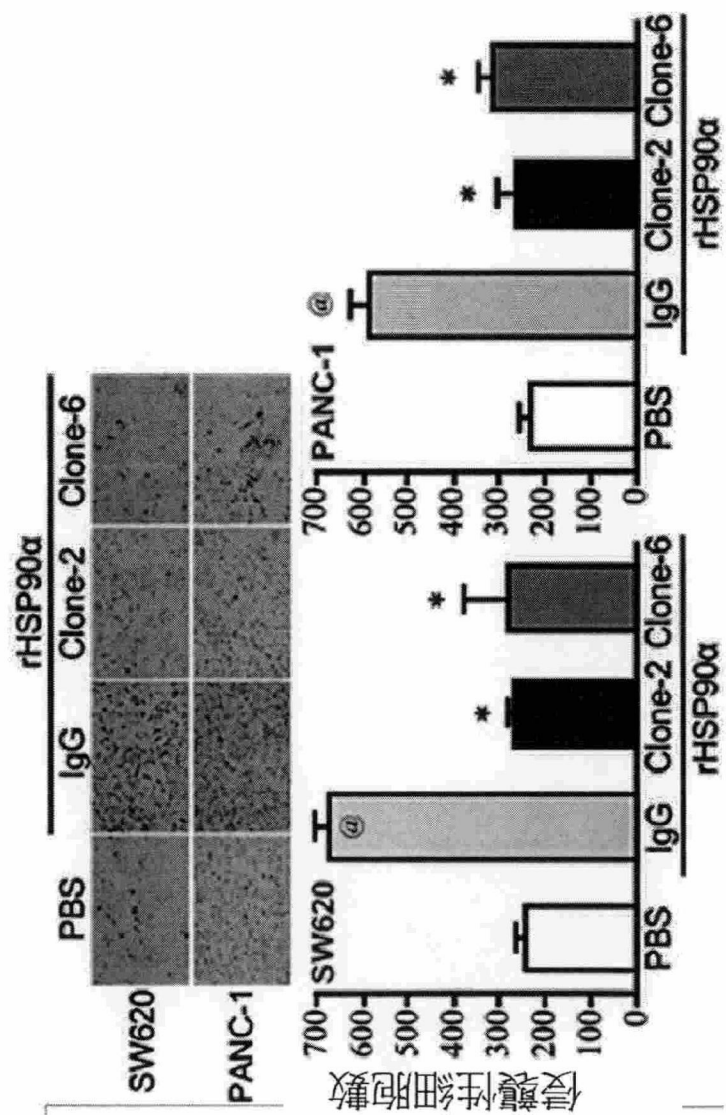


圖 1 (續)

(g)

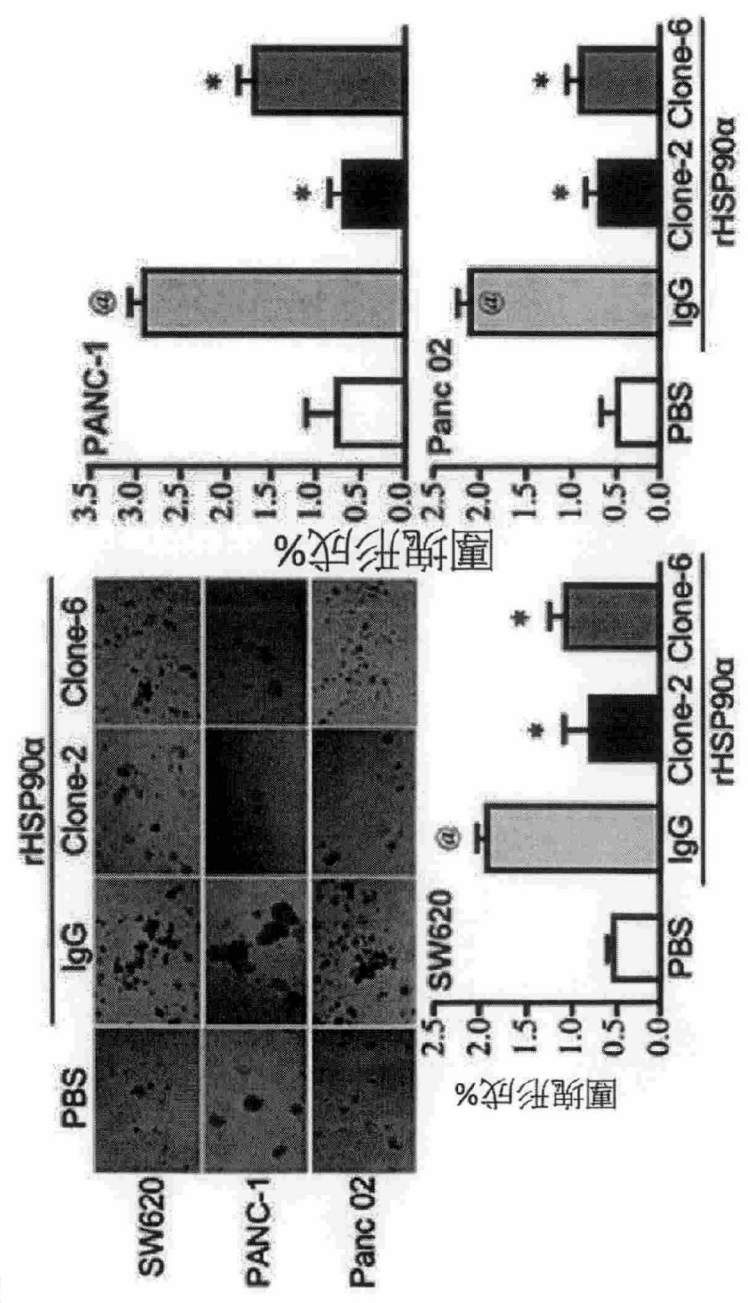


圖 1 (續)

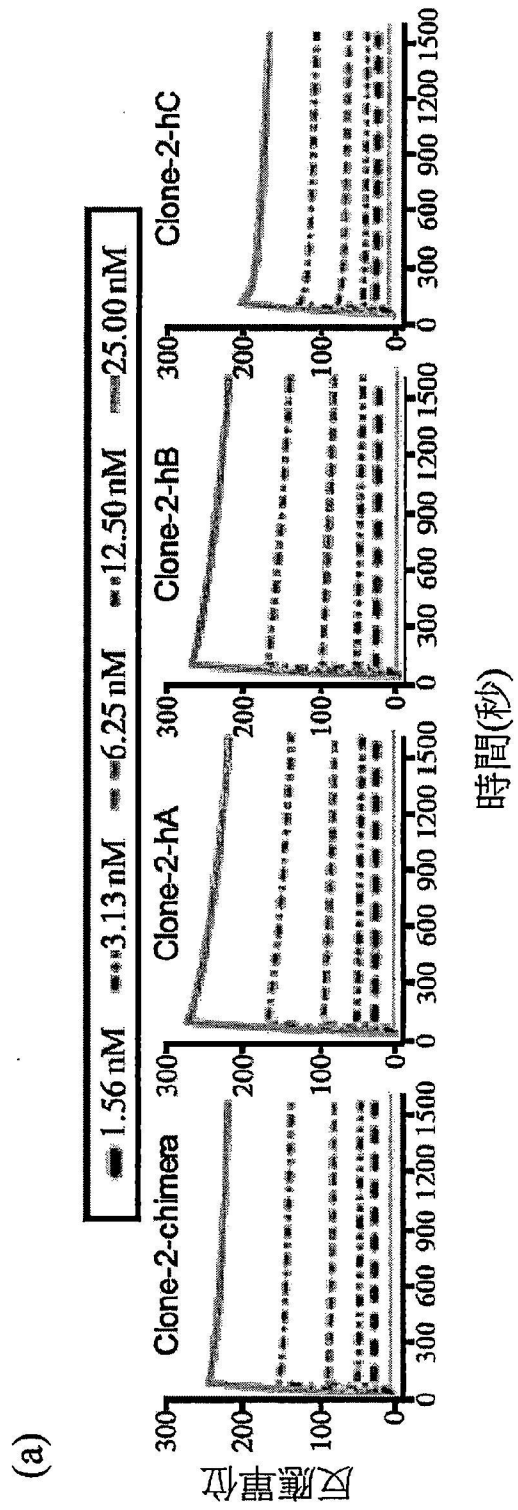


圖 2

(b)

Clone-2	k_a ($\times 10^5, 1/Ms$)	k_d ($\times 10^{-4}, 1/s$)	K_D ($\times 10^{-10}, M$)
嵌合體	7.11	0.67	0.94
hA	7.29	1.37	1.87
hB	8.43	1.24	1.48
hC	6.69	0.98	1.47

圖 2 (續)

(c)

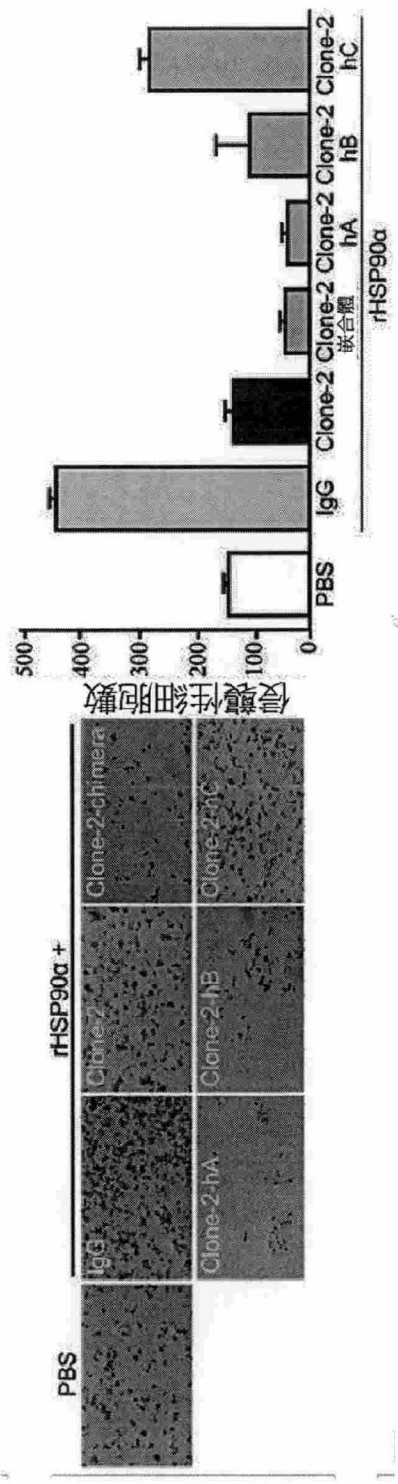


圖 2 (續)

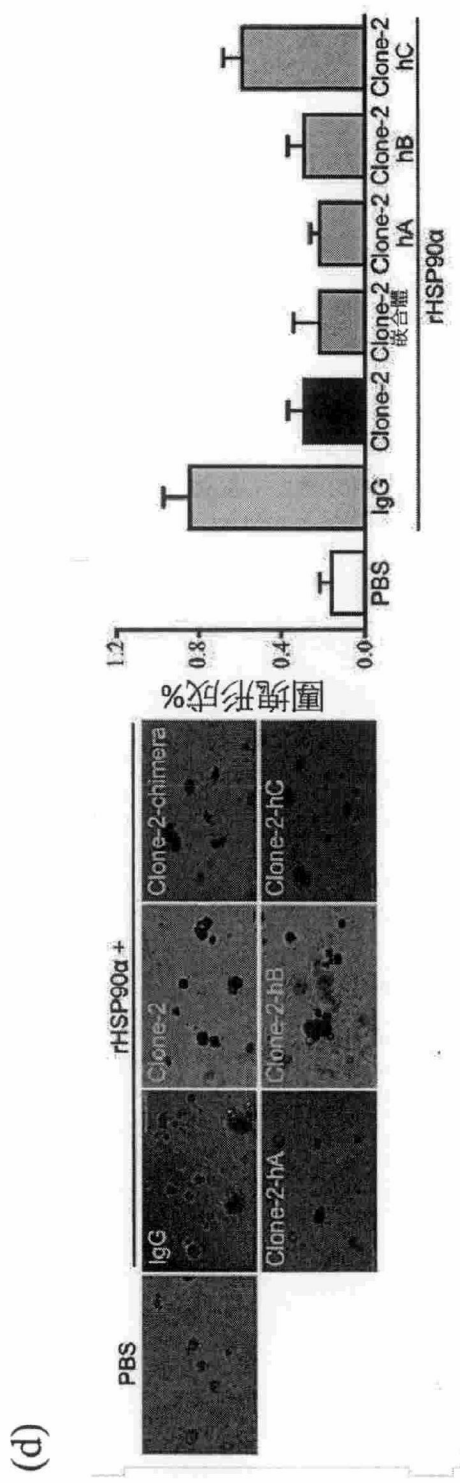


圖 2 (續)

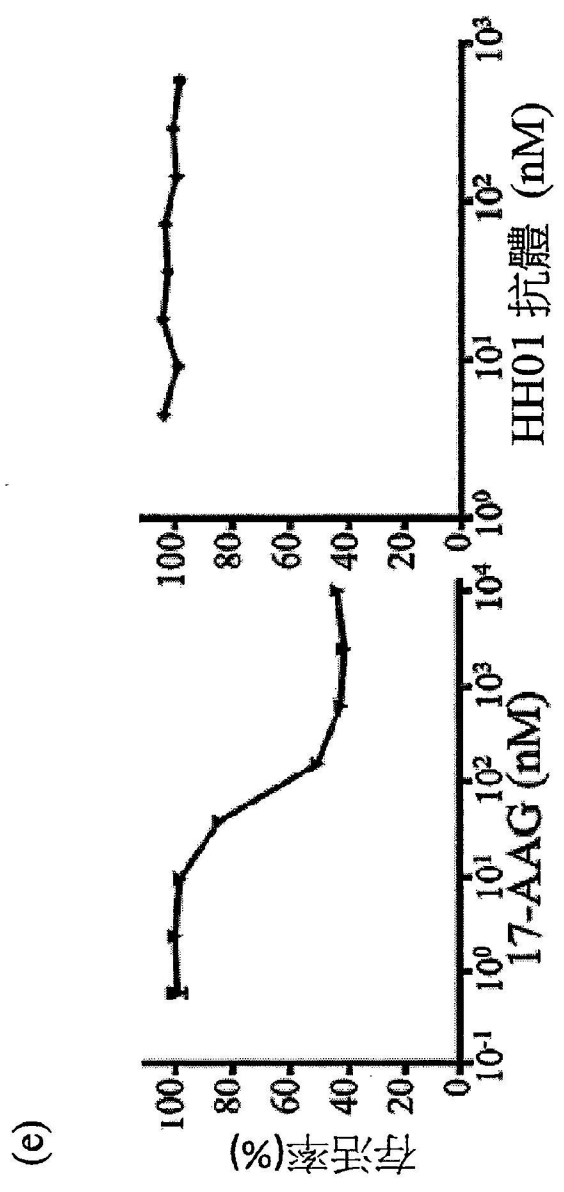


圖 2 (續)

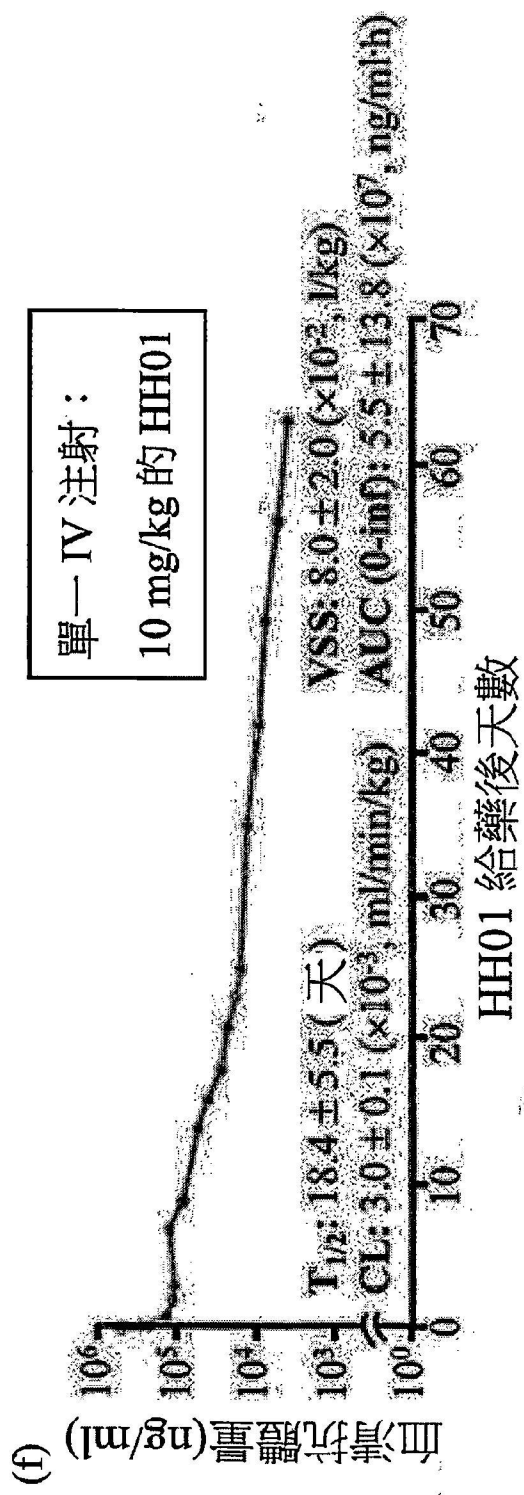


圖 2 (續)

(a)

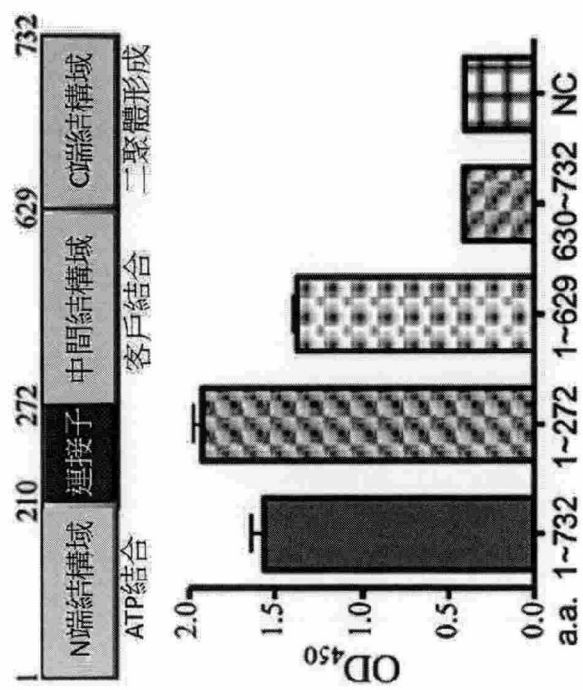


圖 3

(b)

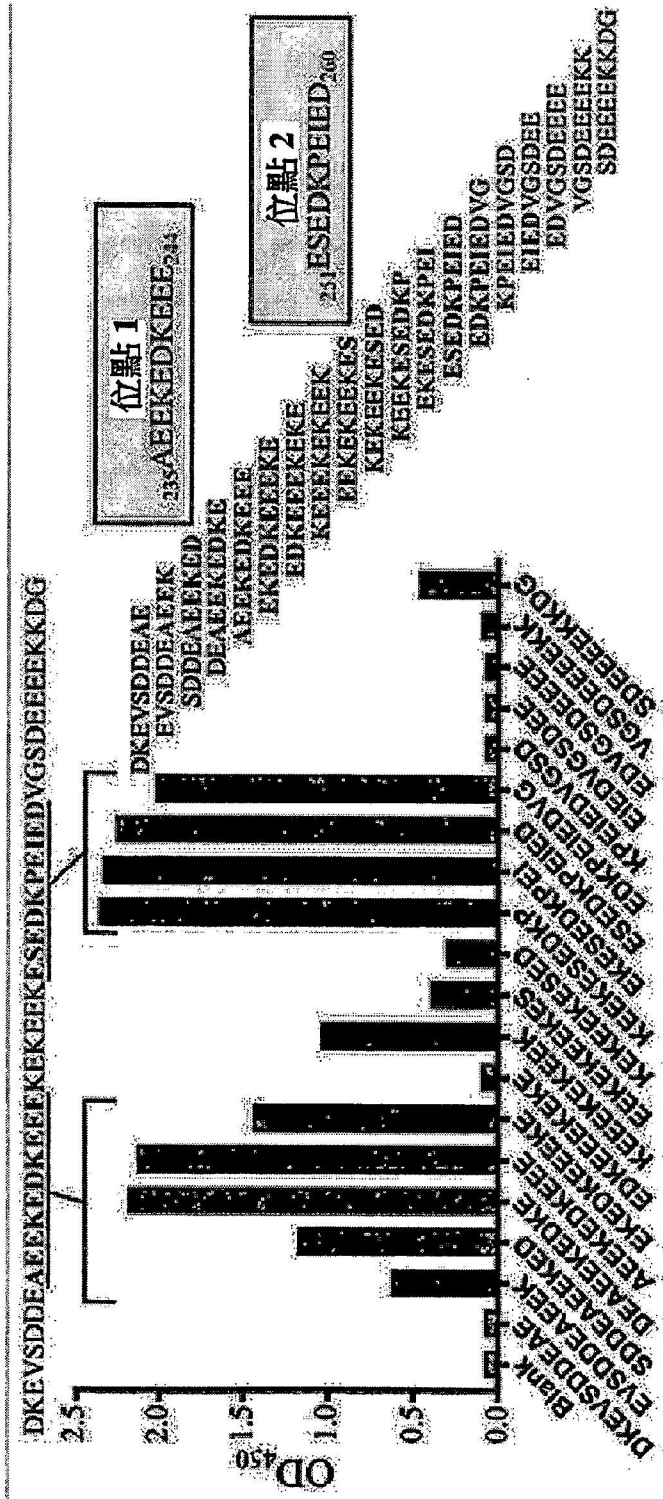


圖 3 (續)

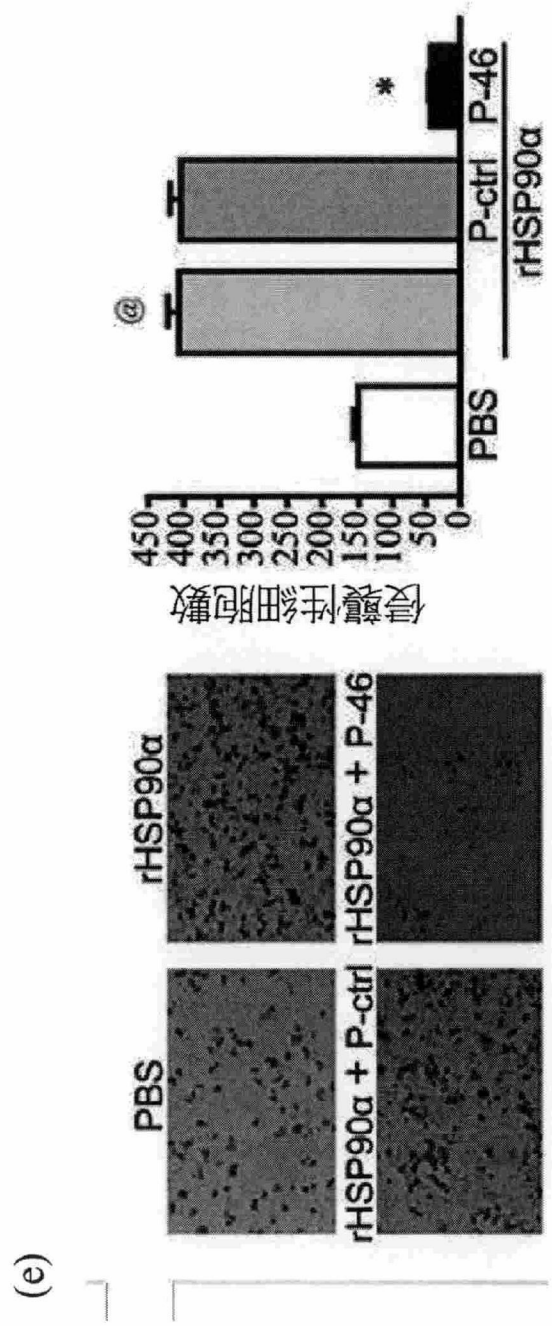


圖 3 (續)

(f)

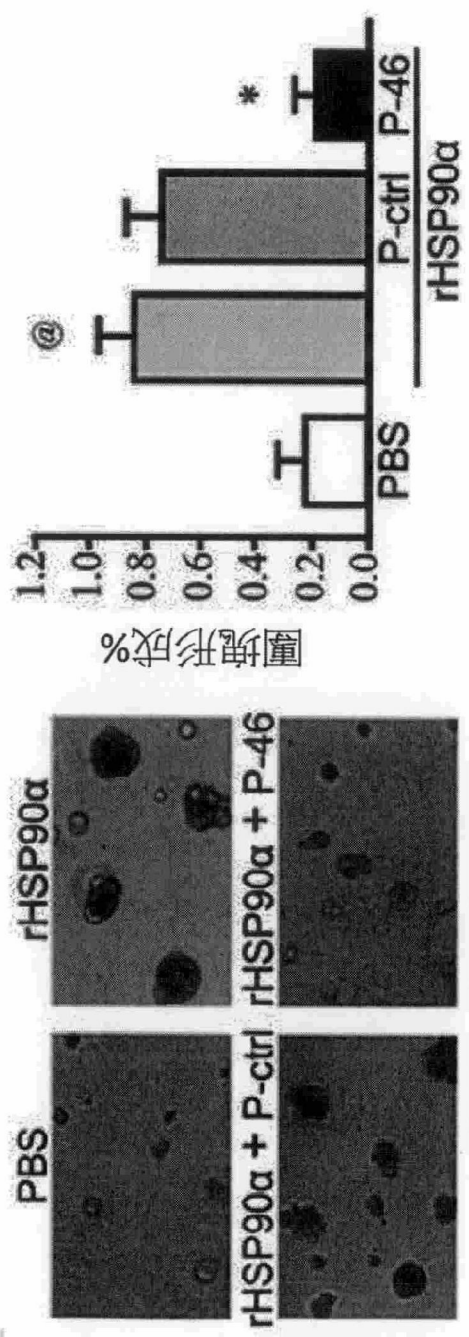


圖 3 (續)

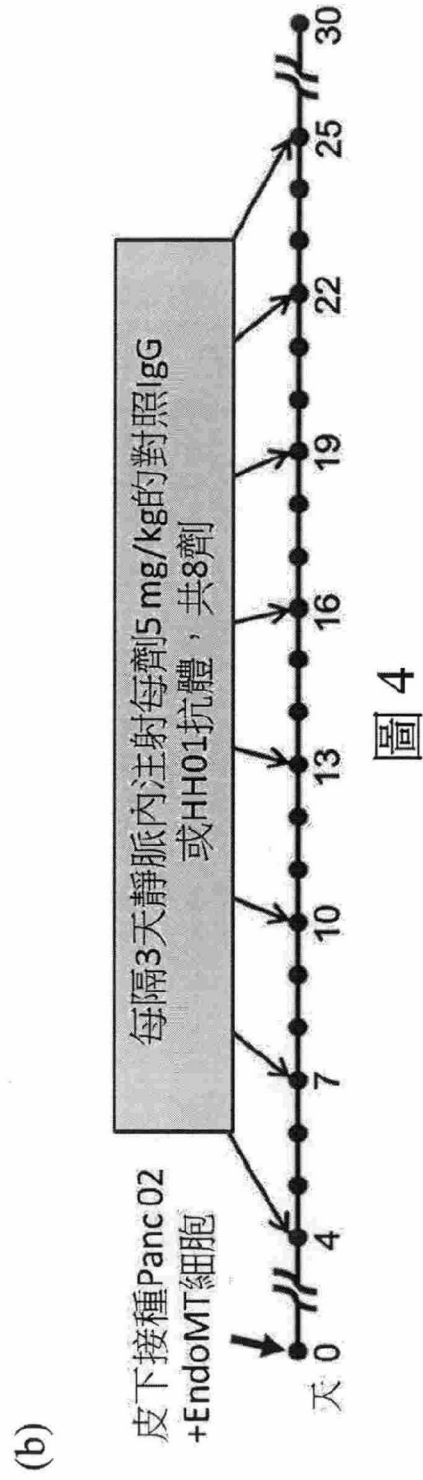
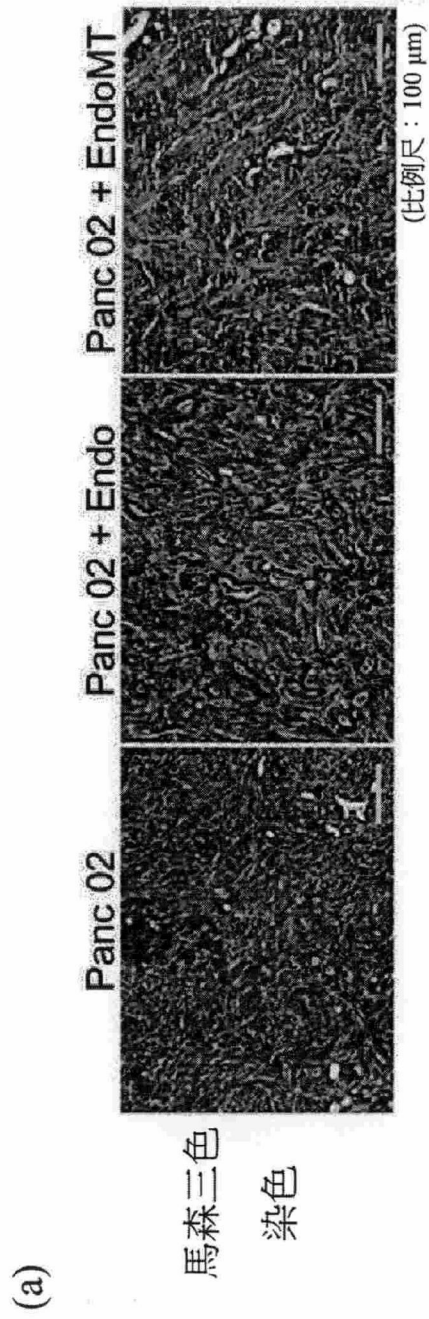


圖 4

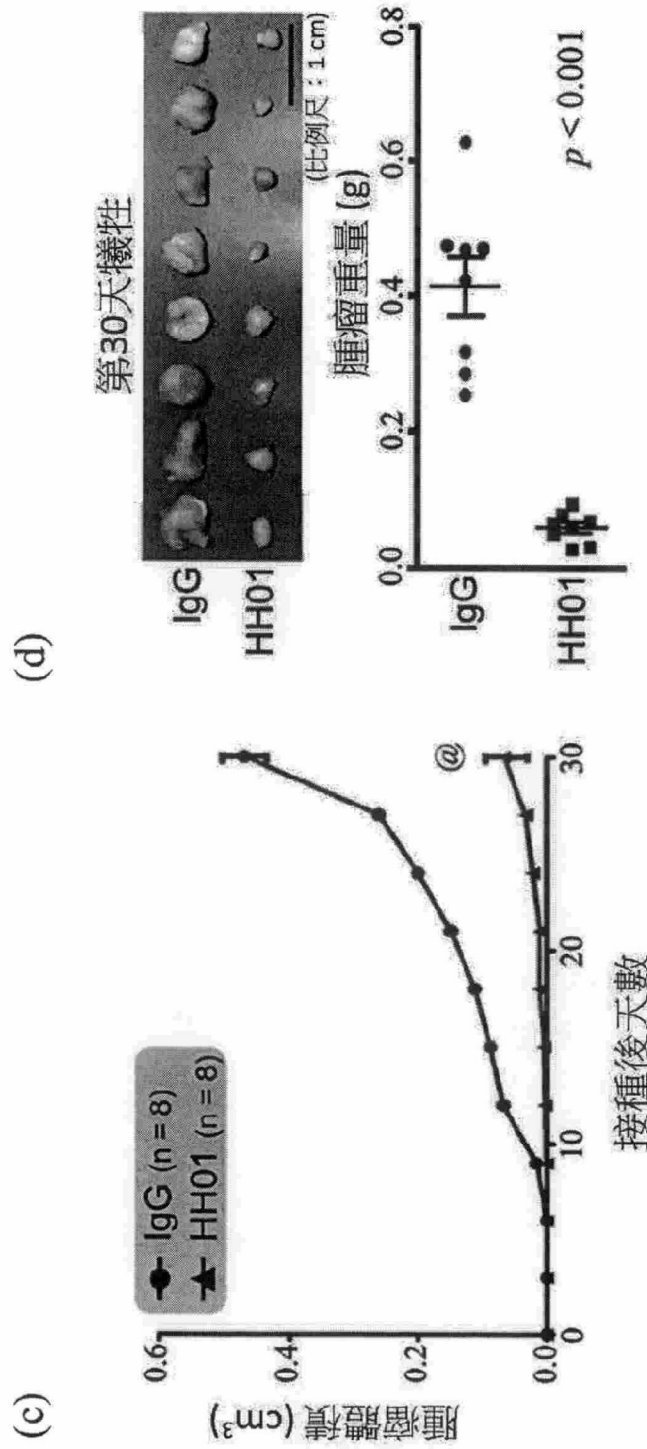
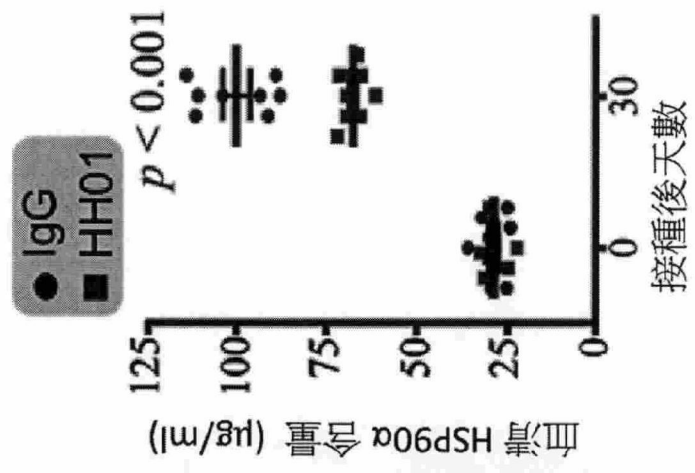
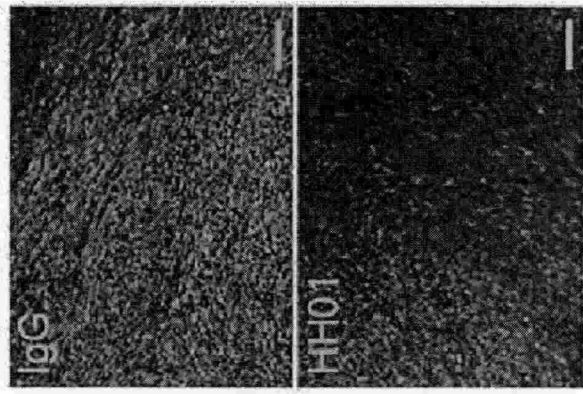


圖 4 (續)

(f)



(e)



馬森三色
染色

圖 4 (續)



圖 5

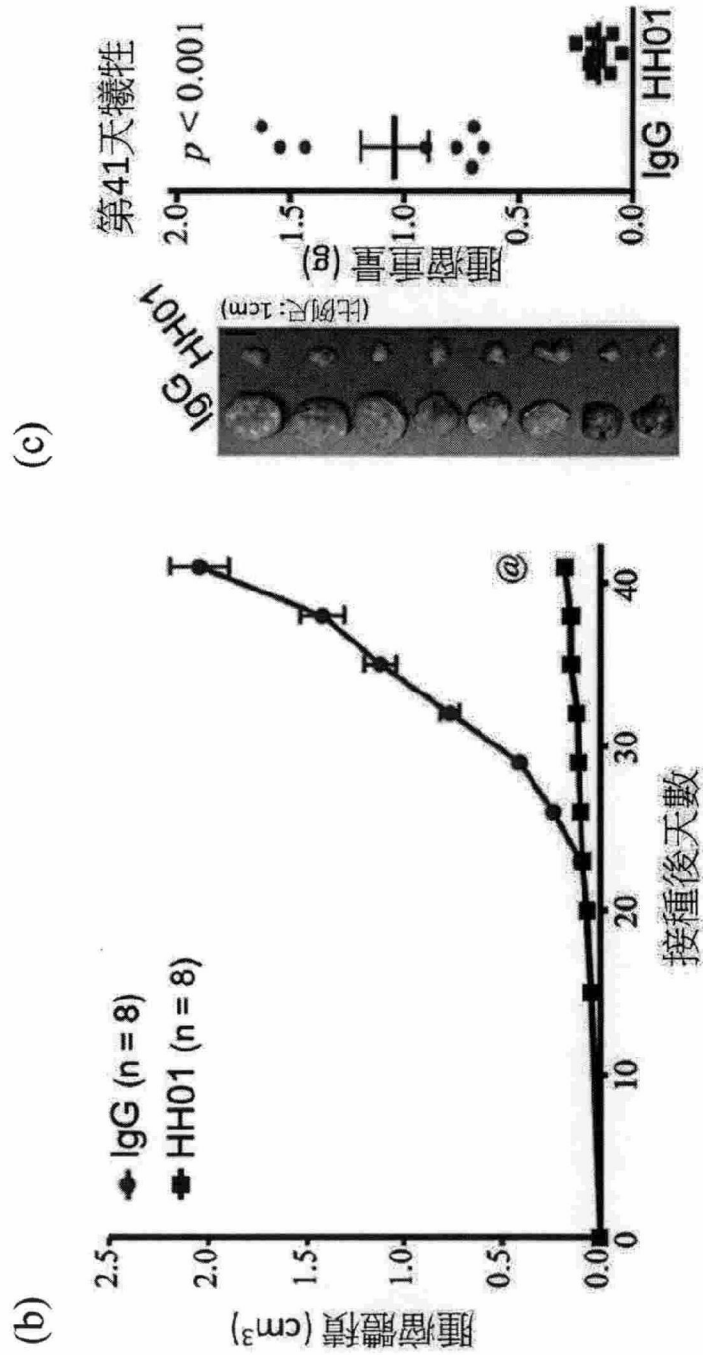


圖 5 (續)

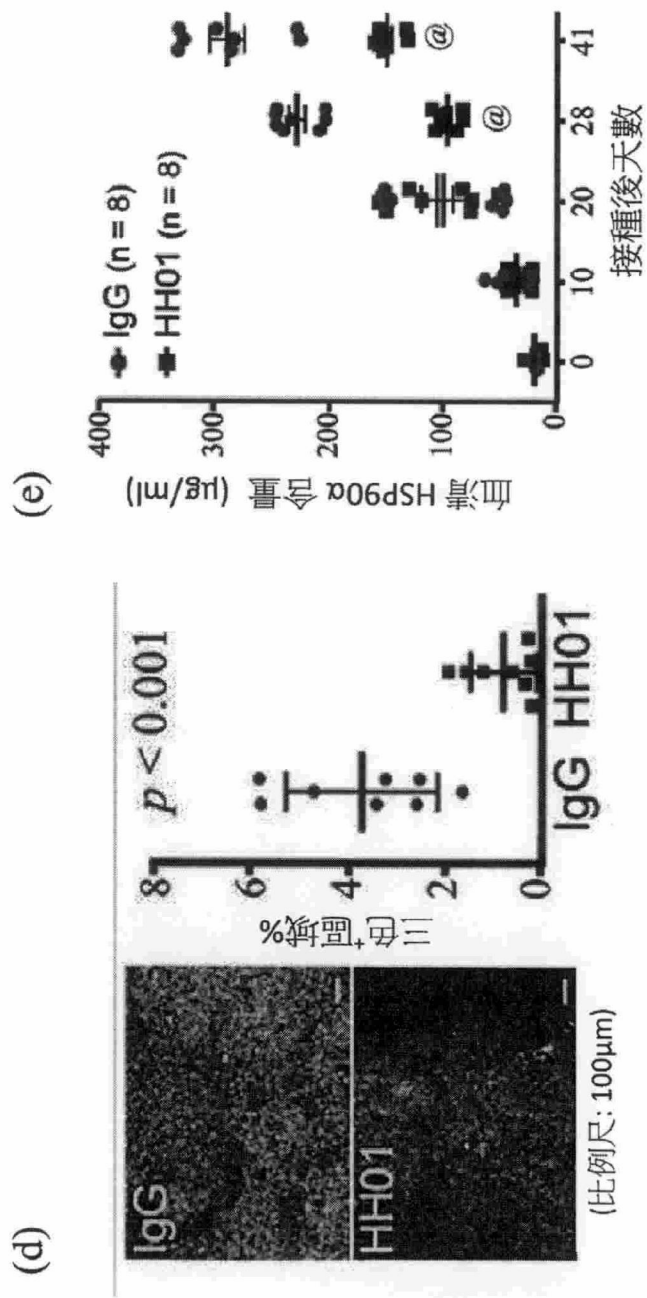


圖 5 (續)

(a)

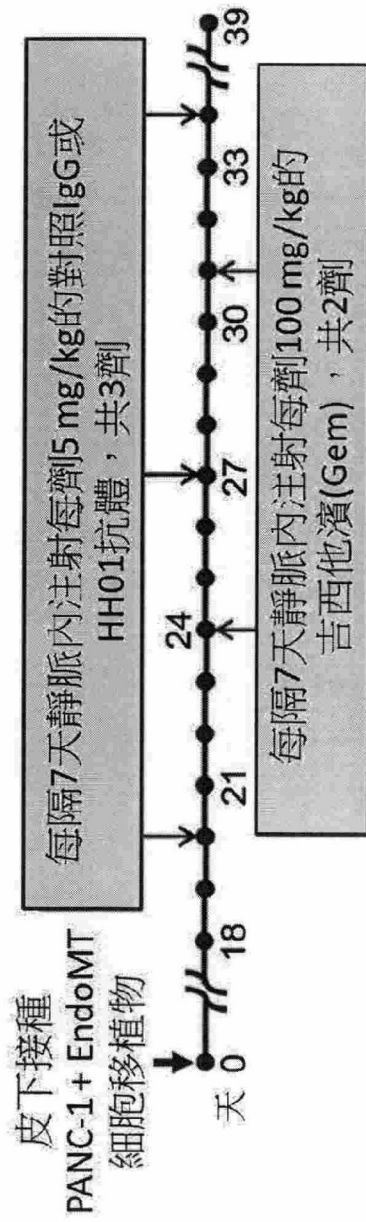


圖 6

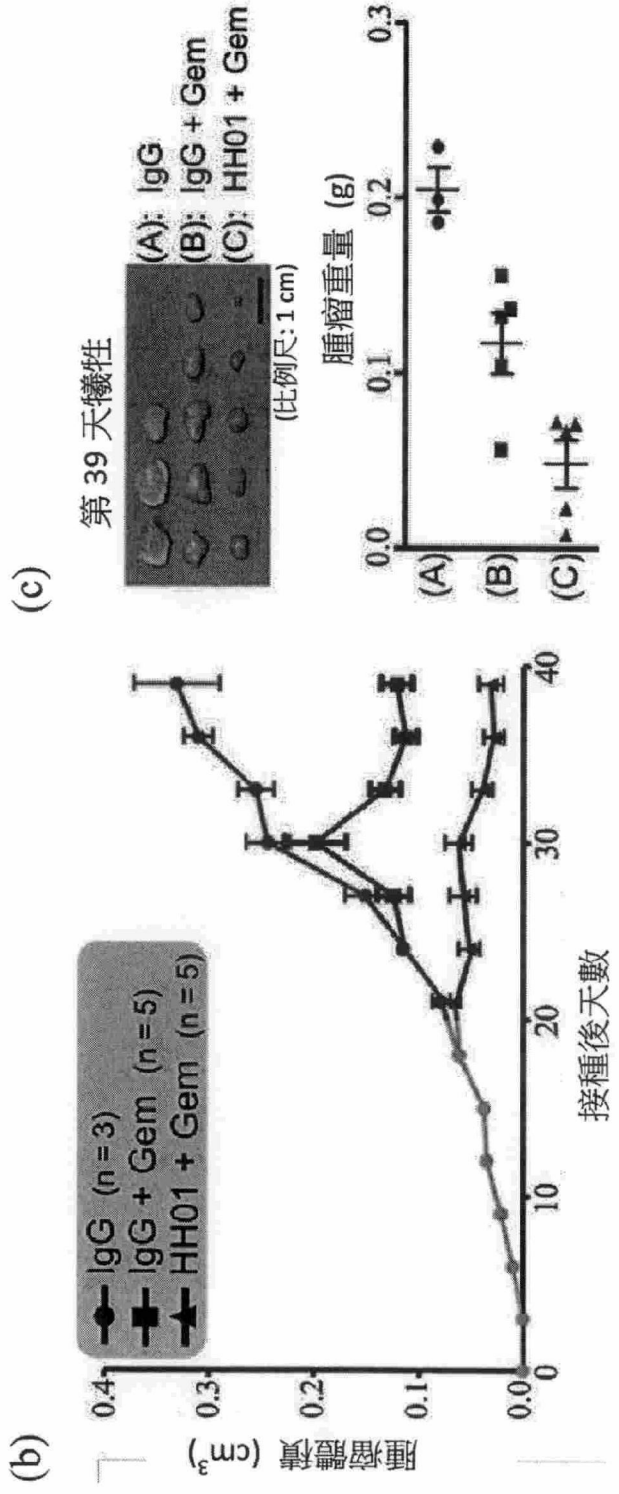
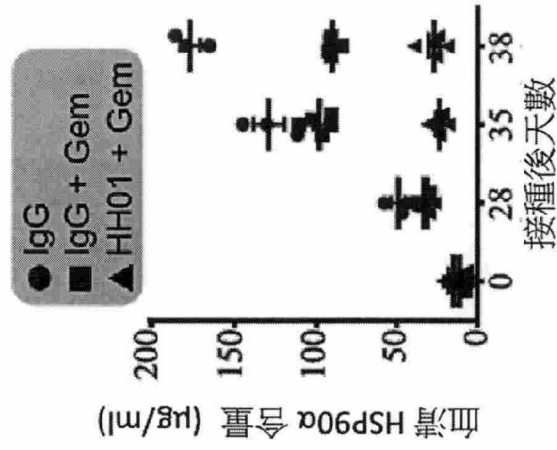


圖6 (續)

(e)



(d)

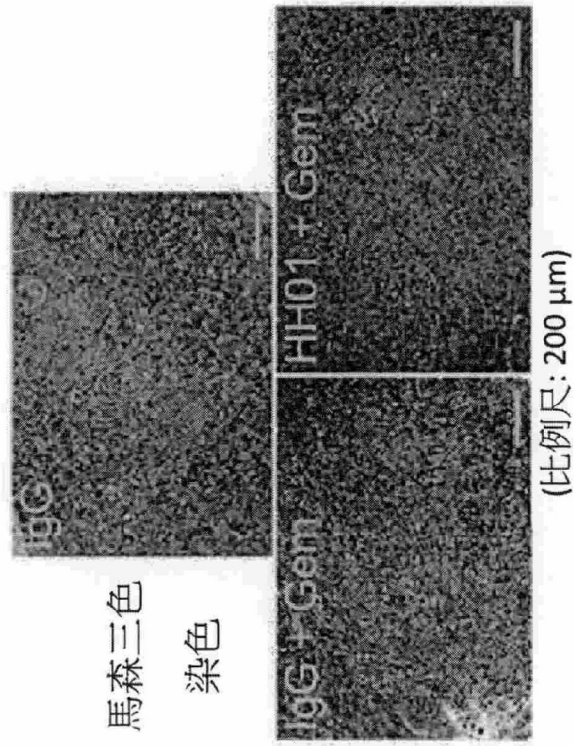


圖 6 (續)

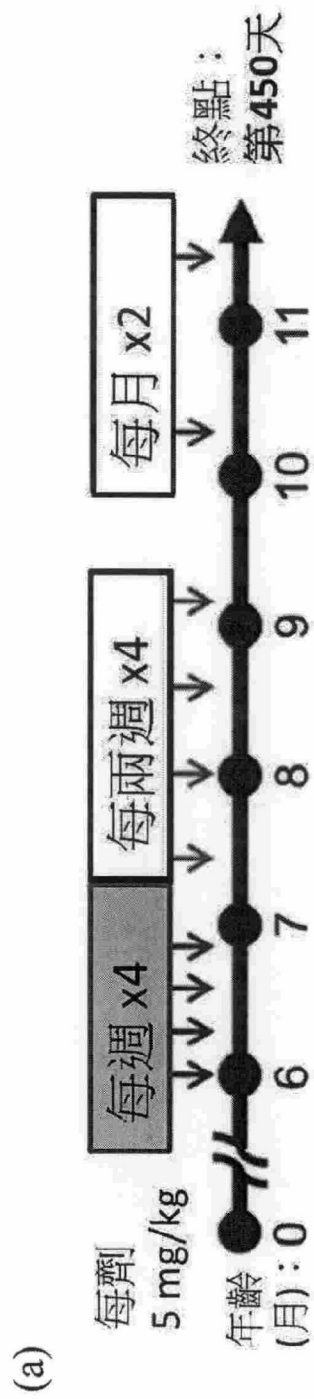


圖 7

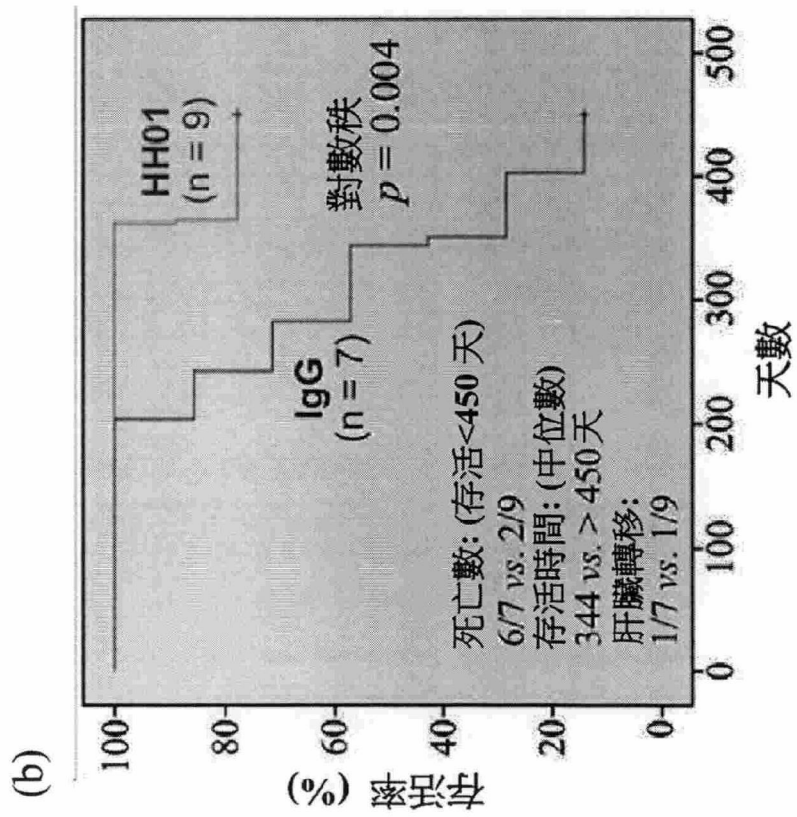


圖 7 (續)

(c)

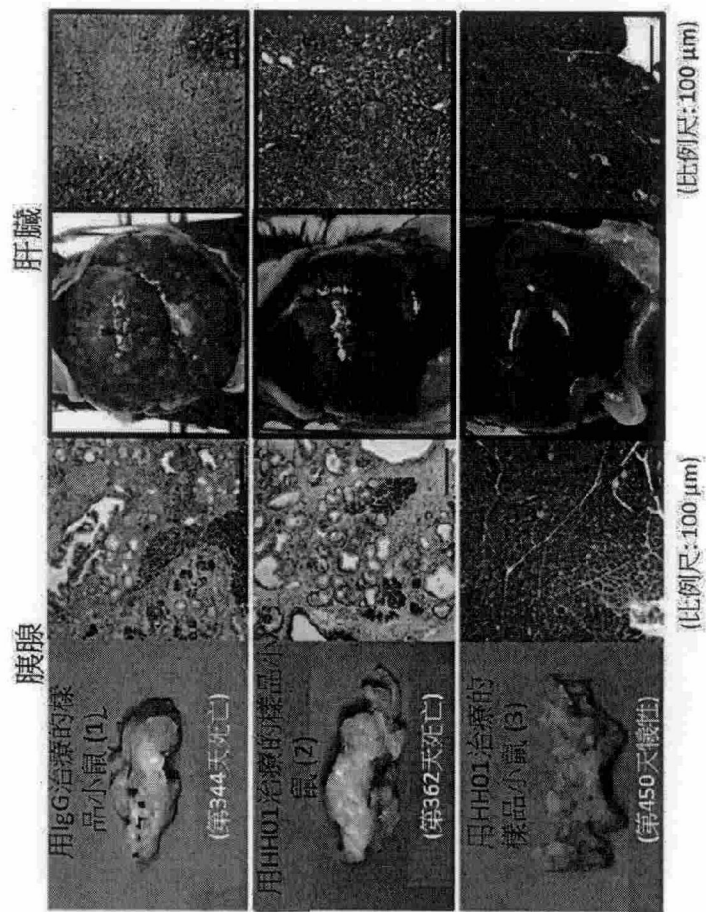


圖 7 (續)

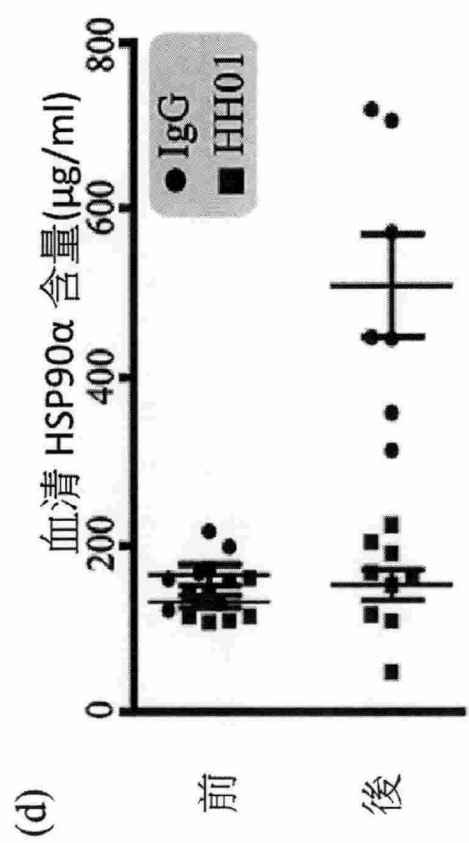


圖 7 (續)

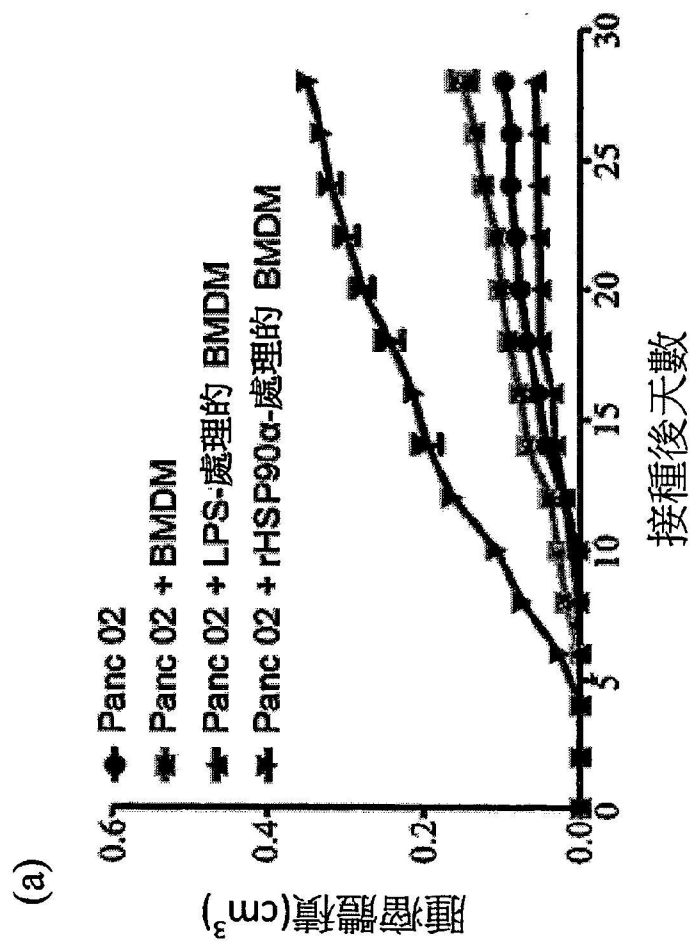
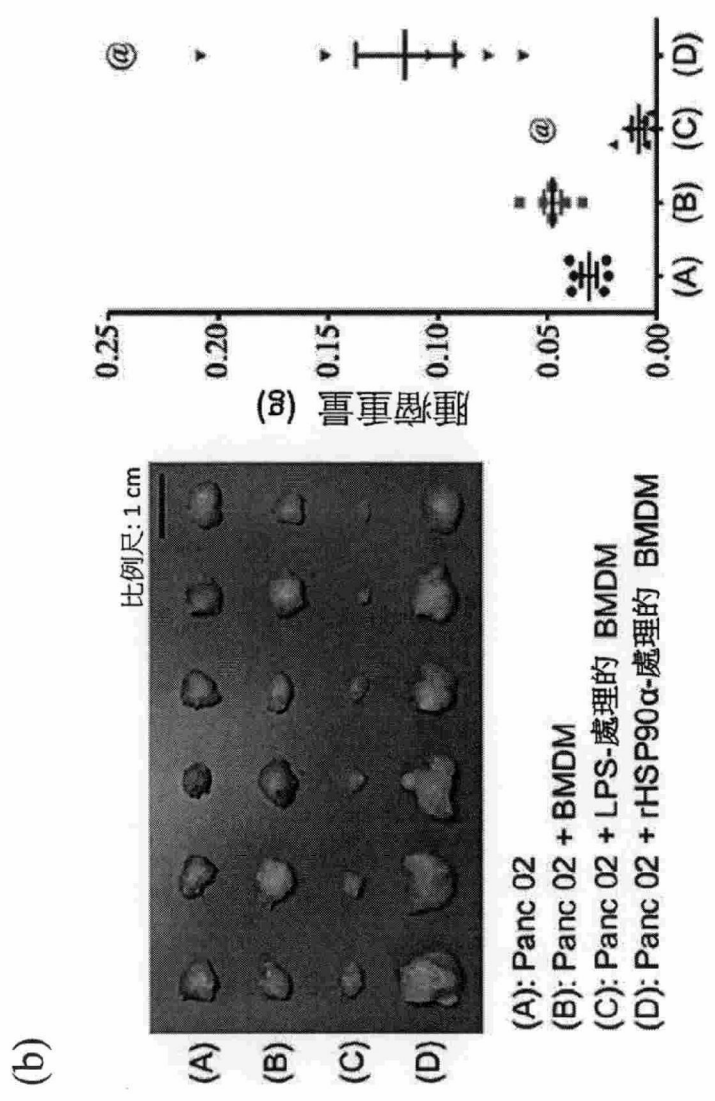


圖 8



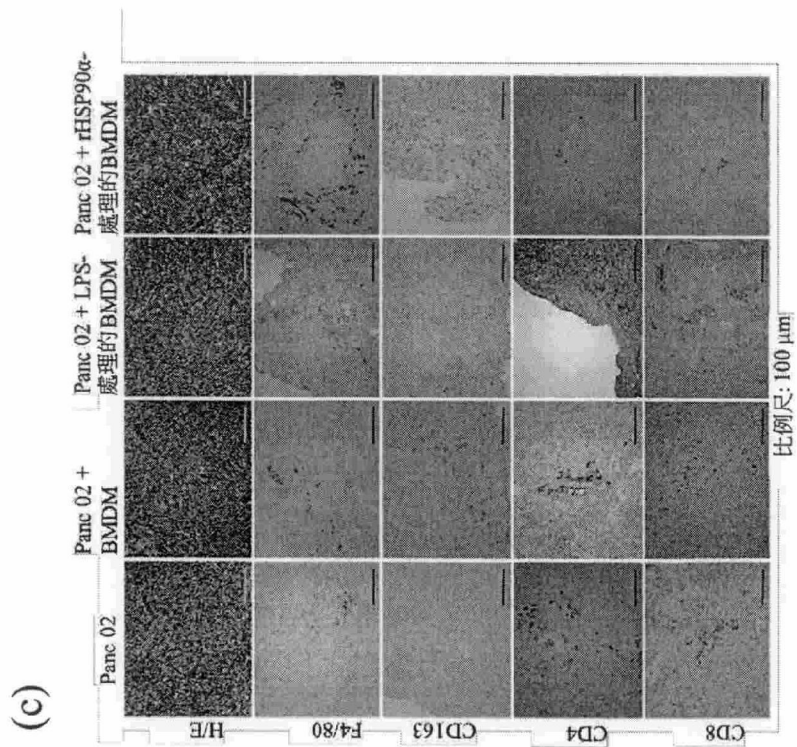


圖 8 (續)

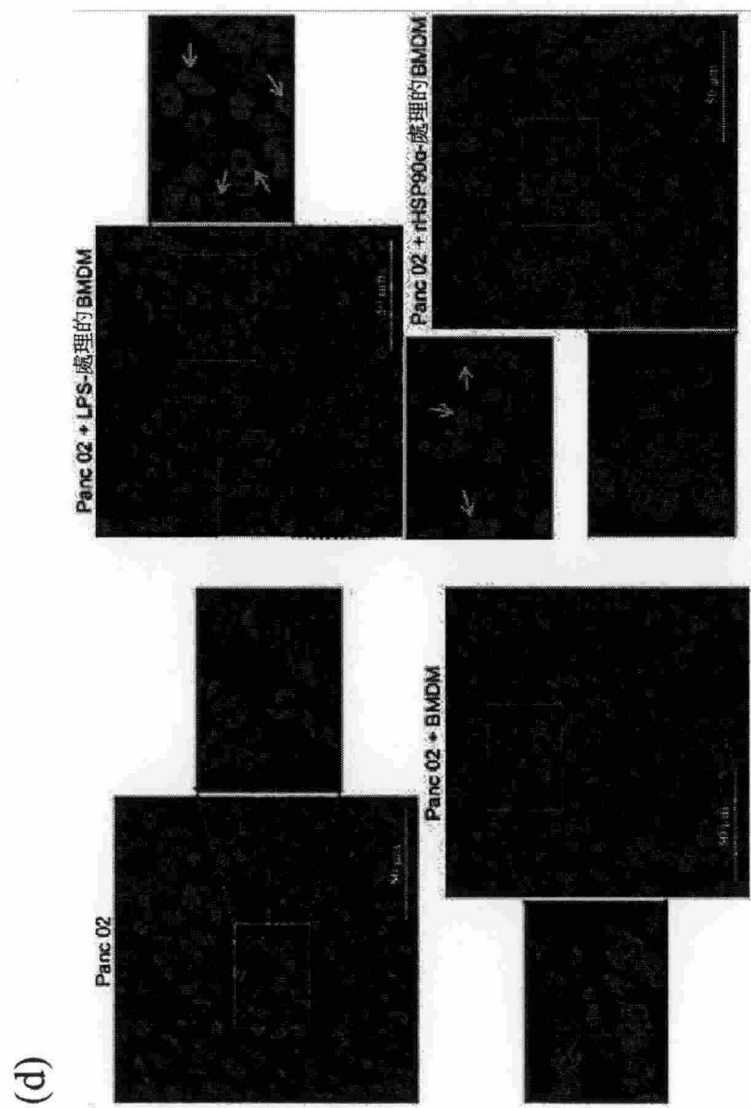


圖 8 (續)

FIG. 9

(a)

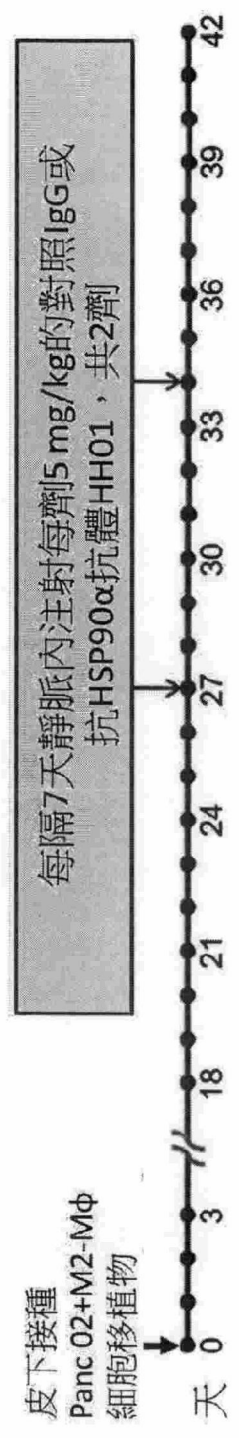


圖 9

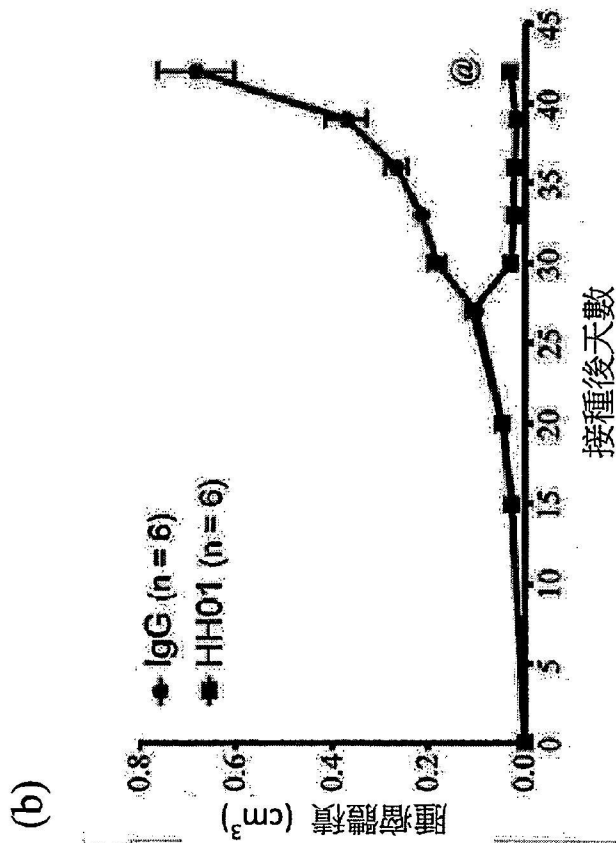


圖9 (續)

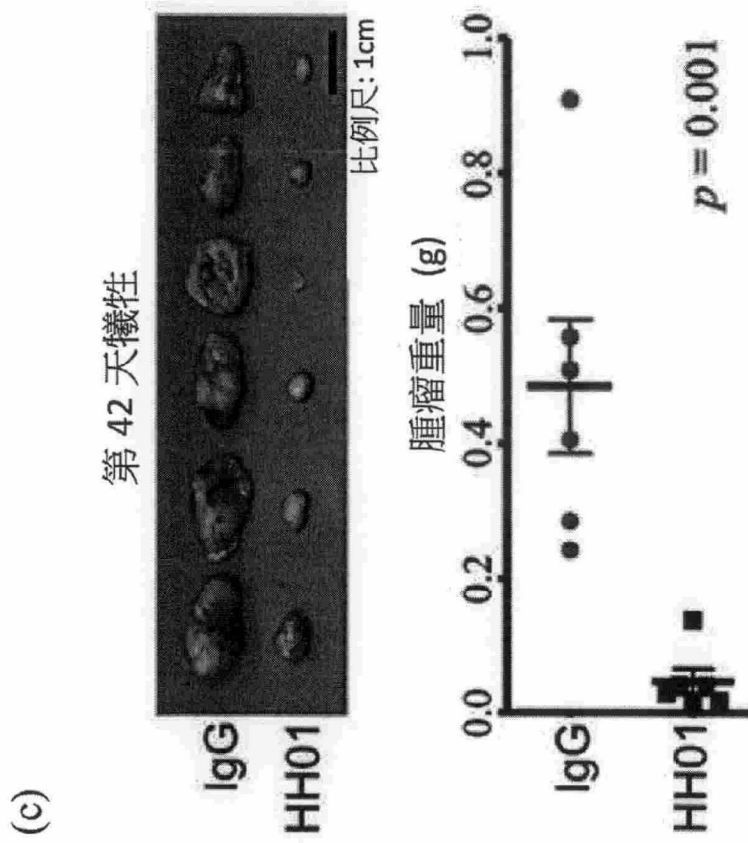


圖 9 (續)

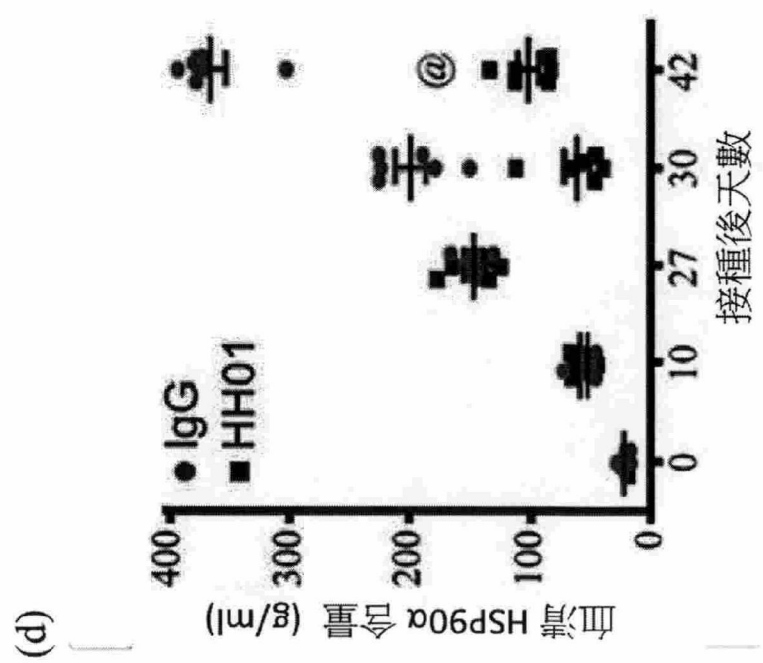


圖 9 (續)

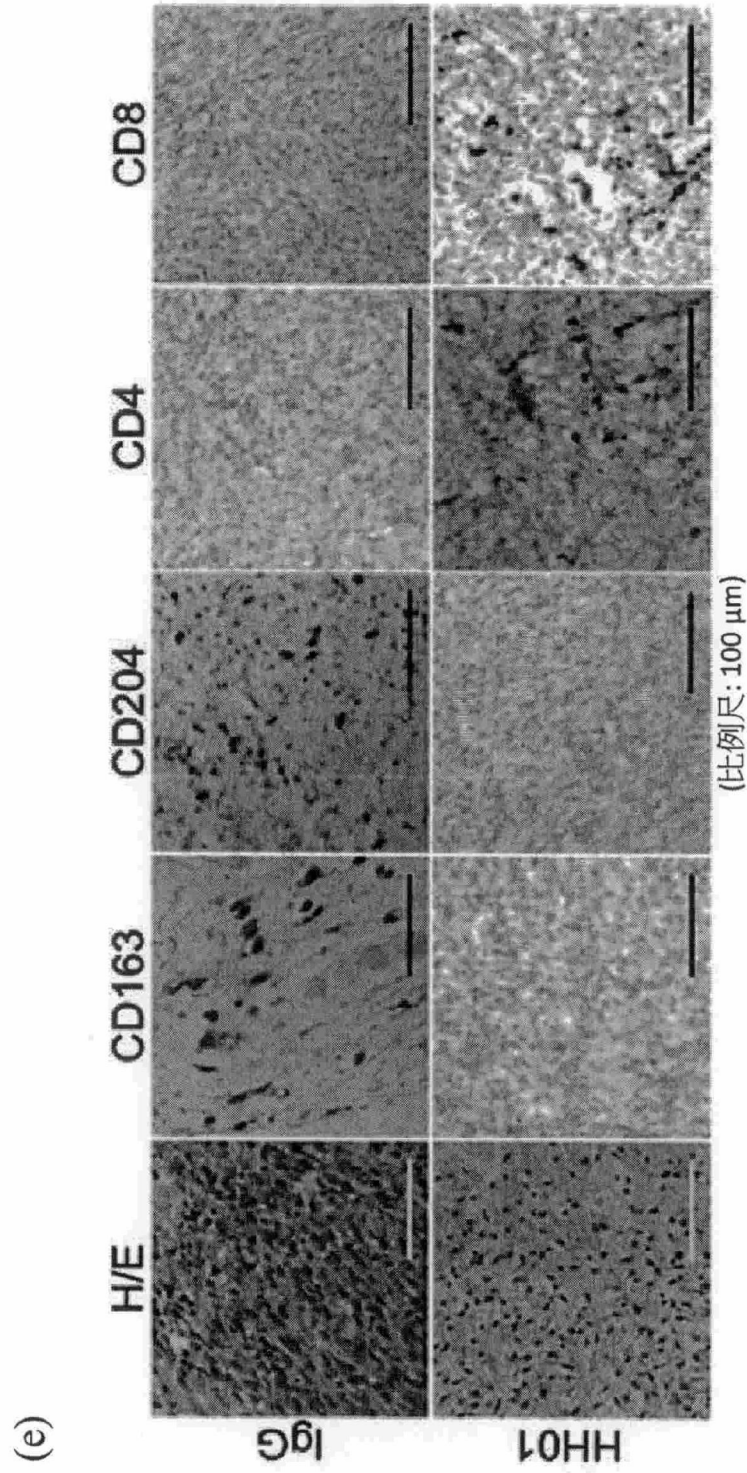


圖 9 (續)

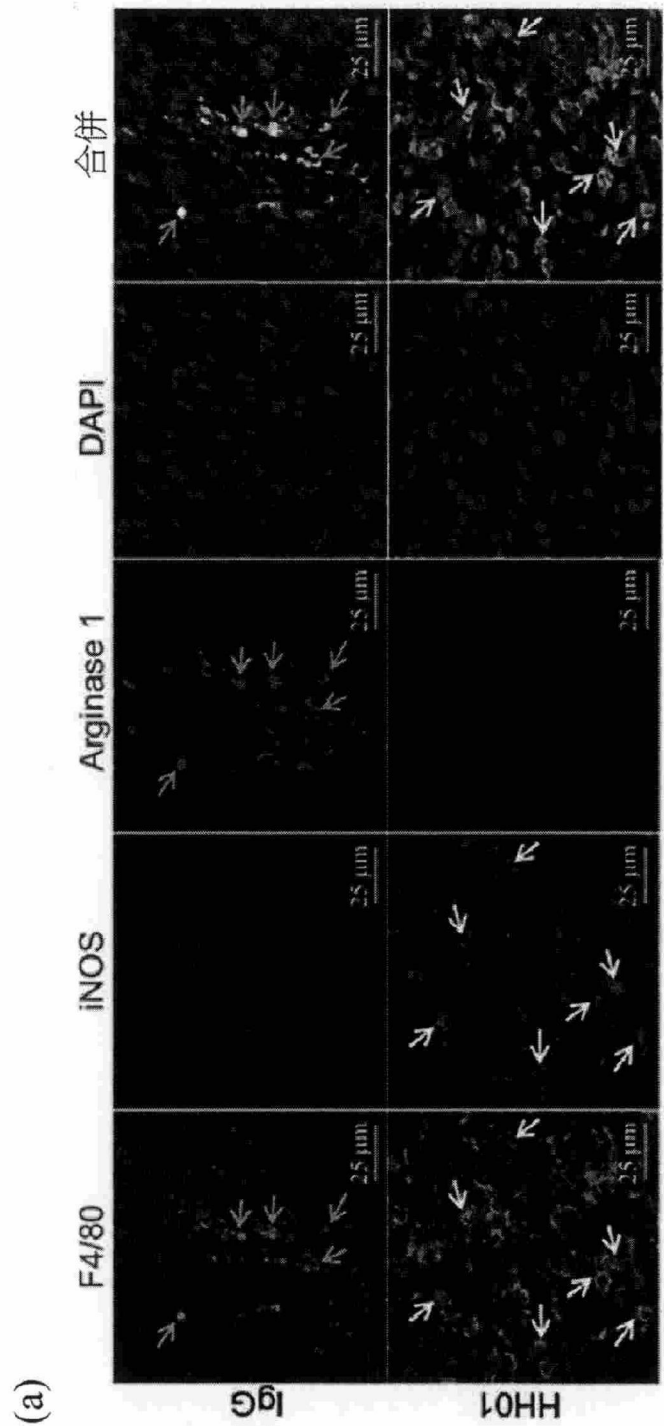


圖 10

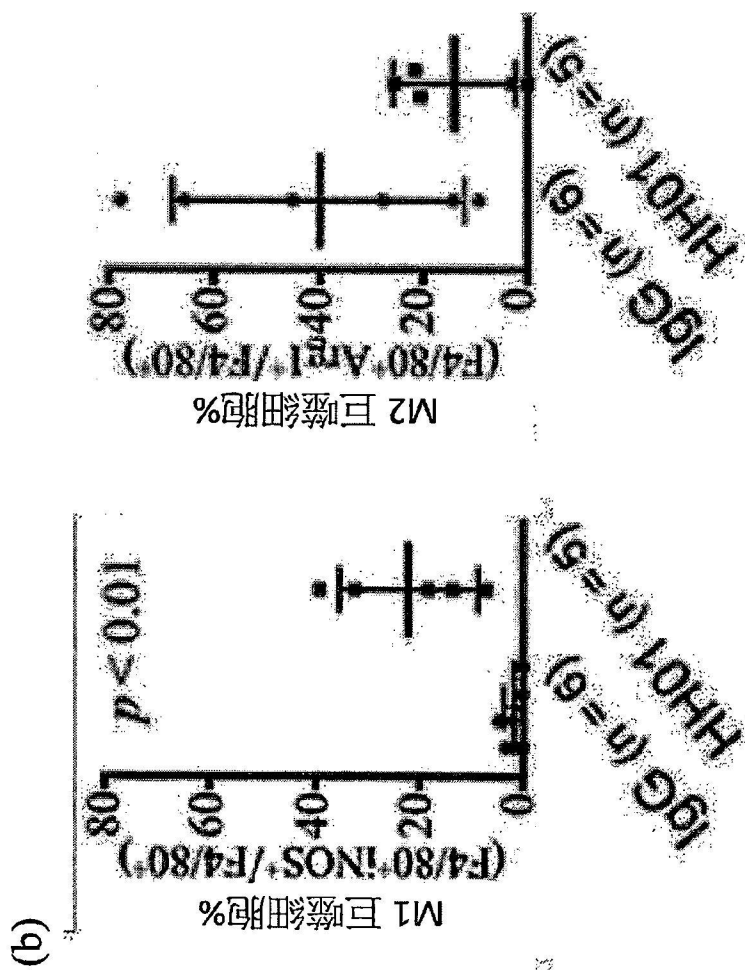


圖 10 (續)

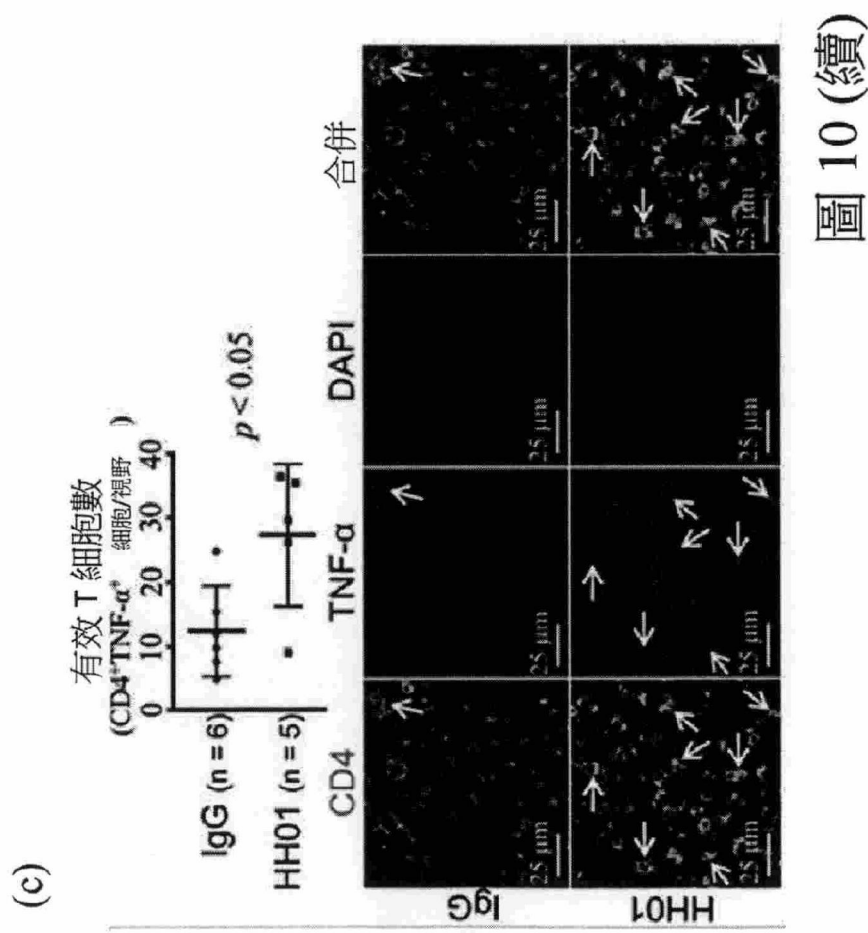


圖 10 (續)

(d)

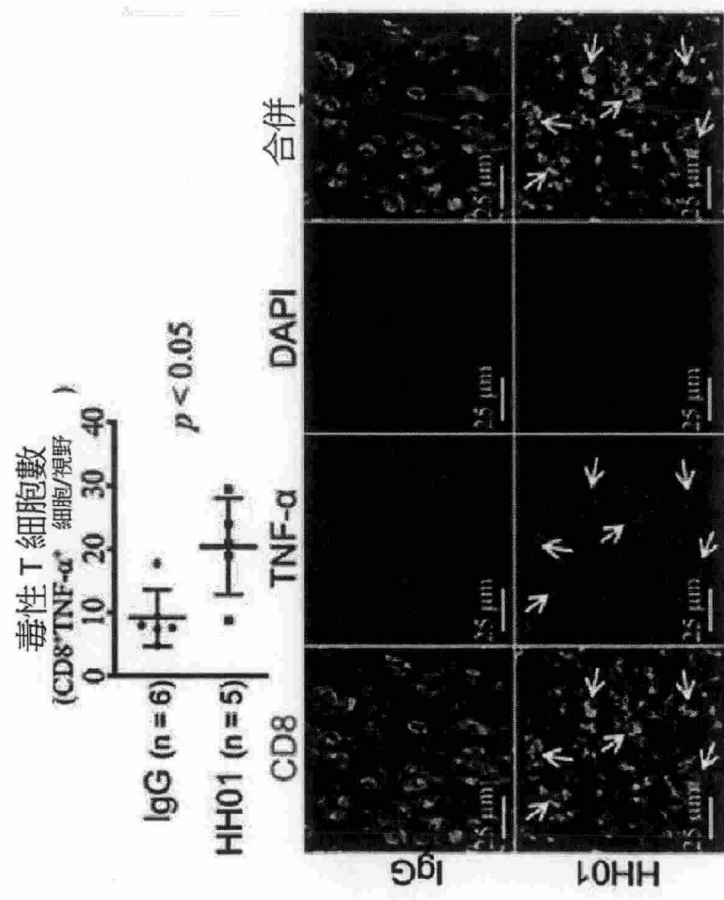


圖 10 (續)