201716084

(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 201716084 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：105116887 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 05 月 30 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *A61K31/7024 (2006.01)*
C07K16/46 (2006.01) *C07H13/04 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/08/06 美國 62/201,828
2015/10/28 美國 62/247,488
2016/02/26 美國 62/300,400
2016/04/15 美國 62/322,906

(71)申請人：葛蘭素史克智慧財產發展有限公司 (英國) GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED (GB)
英國

(72)發明人：法蘭西斯 克里斯托弗 FRANCIS, CHRISTOPHER JOHN (AU)；葉納曼卓 尼蘭詹 YANAMANDRA, NIRANJAN (US)；高華欣 GAO, HUA-XIN (CN)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：42 共 137 頁

(54)名稱

組合物及其用途與治療

COMBINATIONS AND USES AND TREATMENTS THEREOF

(57)摘要

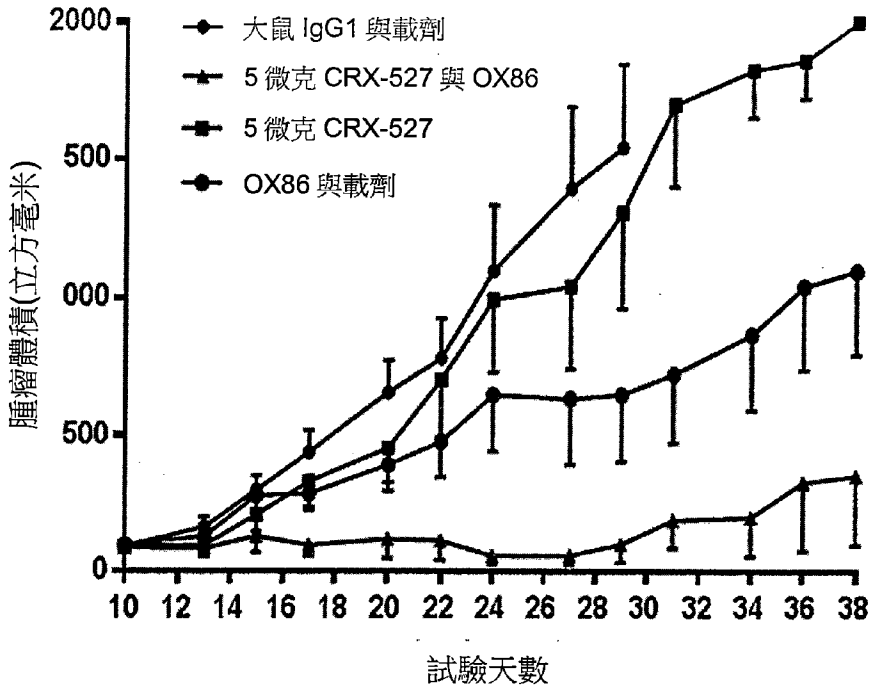
於此係揭示 OX40 調節子與 TLR4 調節子之組合物、其醫藥組成物、其用途、及治療方法，包含投予該組合物，包括於癌症之用途。

Disclosed herein are combinations of an OX40 modulator and a TLR4 modulator, pharmaceutical compositions thereof, uses thereof, and methods of treatment comprising administering said combination, including uses in cancer.

指定代表圖：

圖 2

OX40 與 TLR4 組合物於 CT-26 同基因型腫瘤模型



201716084

發明摘要

※ 申請案號：105116887

※ 申請日：105/05/30

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7024 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07H 13/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

組合物及其用途與治療

COMBINATIONS AND USES AND TREATMENTS THEREOF

【中文】

於此係揭示OX40調節子與TLR4調節子之組合物、其醫藥組成物、其用途、及治療方法，包含投予該組合物，包括於癌症之用途。

【英文】

Disclosed herein are combinations of an OX40 modulator and a TLR4 modulator, pharmaceutical compositions thereof, uses thereof, and methods of treatment comprising administering said combination, including uses in cancer.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(２)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

組合物及其用途與治療

COMBINATIONS AND USES AND TREATMENTS THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明相關於一種治療哺乳動物中癌症之方法，並相關於用於此種療法之組合物。具體而言，本發明相關於一種抗OX40抗原結合蛋白(ABPs)與一或多種TLR4調節子之組合物。

【先前技術】

【0002】 過度增生疾病包括癌症之有效治療，一直是癌症學領域之目標。一般而言，由控制細胞分裂、分化和凋亡性細胞死亡之正常過程之失調而引起之癌症，其特徵為惡性細胞的增殖，其具有無限生長、局部擴張和全身轉移的潛力。正常過程的失調包括訊息傳導途徑之異常，以及對正常細胞中所發現不同之因子的反應。

【0003】 免疫療法為治療過度增生疾病的方法之一。科學家和臨床醫生在各種癌症免疫療法的發展上已遇到的主要障礙為自我抗原(癌症)之耐受性，為了產生強大的抗腫瘤反應，使腫瘤消退。不像標靶為腫瘤的小分子與大分子藥劑之傳統發展，癌症免疫療法的標靶為免疫系統之細胞，其具有可能會產生效應細胞記憶池之潛力，以誘發更持久的效應並降低復發。

【0004】 OX40為涉及免疫系統之多種過程之共刺激分子。結合至OX40受體並調節OX40訊息傳遞之抗原結合蛋白與抗體，為技術上已知，並已揭示用於如癌症之免疫療法。

【0005】 胺基烷基葡萄胺糖苷磷酸鹽(AGPs)為類鐸受體4 (TLR4)之合成配位基。AGPs已知可使用作為疫苗佐劑且用於刺激細胞介素產生、活化巨噬體、促進先天免疫反應，並擴增免疫化動物之抗體產生。

【0006】 儘管最近在癌症治療上已有許多進展，但仍需要更有效及/或增強治療患有癌症的個體之療法。此述相關於結合增強抗腫瘤免疫性之組合物與方法，便可解決此需求。

【發明內容】

【0007】 於此係提供一種抗OX40抗原結合蛋白(ABP)與一或多種TLR4調節子之組合物。亦提供一種使用本發明組成物治療人體癌症之方法，以及用於該療法之組合物，如癌症療法。更提供一種調節有癌症治療需求個體，如人體，免疫反應之方法，包含投以該個體有效量之組合物，如一或多種醫藥組成物。

【0008】 在一實施例中，該OX40抗原結合蛋白為揭示於WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，中者。在另一實施例中，該抗原結合蛋白包含WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之抗體CDRs，或與該揭示之CDR序列具90%同一性之CDRs。在其他實施例中，該抗原結合蛋白包含WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之抗體之VH、VL或二者，或與所揭示之VH或VL序列具90%同一性之VH或 VL。

【0009】 在另一實施例中，OX40抗原結合蛋白為揭示於WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日2012年2月9日，中者。在另一實施例中，該抗原結合蛋白包含WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日2012年2月9日，所揭示之抗體CDRs，或與該揭示之CDR序列具90%同一性之CDRs。在其他實施例中，該抗原結合蛋白包含WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日2012年2月9日，所揭示之抗體之VH、VL或二者，或與所揭示之VH或VL序列具90%同一性之VH或VL。

【0010】 在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含CDRs

或VH或VL序列之一或多者，或與圖示具90%同一性之序列。

【0011】 在一實施例中，本發明之ABP或抗體包含106-222抗體之CDR，如圖6-7所示，如CDRH1、CDRH2與CDRH3，具有SEQ ID NOs 1、2與3所示之胺基酸序列，如圖6所揭示，以及如CDRL1、CDRL2與CDRL3，分別具有如SEQ ID NOs 7、8與9所示之序列。在一實施例中，本發明之ABP或抗體包含WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之106-222、Hu106或Hu106-222抗體之CDRs。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含106-222抗體之VH與VL區域，如圖6-7所示，如具有如SEQ ID NO:4所示之胺基酸序列之VH，以及具有如SEQ ID NO：10所示之胺基酸序列之VL，如圖7所示。在另一實施例中，本發明之ABP或抗體包含一具有如圖6之SEQ ID NO:5所示之胺基酸序列之VH，以及一具有如圖7之SEQ ID NO:11所示之胺基酸序列之VL。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之Hu106-222抗體或106-222抗體或Hu106抗體 之VH與VL區域。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體為106-222、Hu106-222或Hu106，如WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日所揭示。在其他實施例中，本發明之ABP或抗體包含與此段落所述之序列具90%同一性之CDRs或VH或VL或抗體序列。

【0012】 在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含圖10-11所示之119-122抗體之CDRs，如CDRH1、CDRH2與CDRH3，分別具有如SEQ ID NOs 13、14與15所示之胺基酸序列。在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含如WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之119-122或Hu119或Hu119-222抗體之CDRs。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體，包含一具有如圖10之SEQ ID NO:16所示之胺基酸序列之VH，以及一具有如圖11之SEQ ID NO:22所示之胺基酸

序列之VL。在另一實施例，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含一具有SEQ ID NO:17所示之胺基酸序列之VH，以及一具有如SEQ ID NO:23所示之胺基酸序列之VL。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含如WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之119-122或Hu119或Hu119-222抗體之VH與VL區域。在其他實施例中，本發明之ABP或抗體為如WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日2011年8月23日，所揭示之119-222或Hu119或Hu119-222抗體。在其他實施例中，本發明之ABP或抗體包含與此段落所述之序列具90%同一性之CDRs或VH或VL或抗體序列。

【0013】 在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含圖14-15所示之119-43-1抗體之CDRs。在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日2012年2月9日，所揭示之119-43-1抗體之CDRs。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含圖14-17所示之119-43-1抗體之一VH與一VL區域。在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日2012年2月9日，所揭示之119-43-1抗體之VH與VL區域。在其他實施例中，本發明之ABP或抗體為圖14-17所示之119-43-1或119-43-1嵌合體。在其他實施例中，本發明之ABP或抗體為如WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日2012年2月9日，所揭示者。在其他實施例中，此段揭示之ABPs或抗體之任一者皆為人源化。在其他實施例中，此段揭示之ABPs或抗體之任一者皆經改造，以製造人源化抗體。在其他實施例中，本發明之ABP或抗體包含與此段落所述之序列具90%同一性之CDRs或VH或VL或抗體序列。

【0014】 在另一實施例中，本發明抗OX40 ABP或抗體之任一小鼠或嵌合序列皆經改造，以製造人源化抗體。

【0015】 在一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含：(a)一重

鏈可變區域CDR1，包含如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列；(b)一重鏈可變區域CDR2，包含如SEQ ID NO：2所示之胺基酸序列；(c)一重鏈可變區域CDR3，包含如SEQ ID NO：3所示之胺基酸序列；(d)一輕鏈可變區域CDR1，包含如SEQ ID NO：7所示之胺基酸序列；(e)一輕鏈可變區域CDR2，包含如SEQ ID NO：8所示之胺基酸序列；以及(f)一輕鏈可變區域CDR3，包含如SEQ ID NO：9所示之胺基酸序列。

【0016】 在另一實施例中，，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含：(a)一重鏈可變區域CDR1，包含如SEQ ID NO：13所示之胺基酸序列；(b)一重鏈可變區域CDR2，包含如SEQ ID NO：14所示之胺基酸序列；(c)一重鏈可變區域CDR3，包含如SEQ ID NO：15所示之胺基酸序列；(d)一輕鏈可變區域CDR1，包含如SEQ ID NO：19所示之胺基酸序列；(e)一輕鏈可變區域CDR2，包含如SEQ ID NO：20所示之胺基酸序列；(f)一輕鏈可變區域CDR3，包含如SEQ ID NO：21所示之胺基酸序列。

【0017】 在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含：一重鏈可變區域CDR1，包含如SEQ ID NO：1或13所示之胺基酸序列；一重鏈可變區域CDR2，包含如SEQ ID NO：2或14所示之胺基酸序列；及/或一重鏈可變區域CDR3，包含如SEQ ID NO：3或15所示之胺基酸序列，或一重鏈可變區域CDR，具90%同一性。

【0018】 在又一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含：一輕鏈可變區域CDR1，包含如SEQ ID NO：7或19所示之胺基酸序列；一輕鏈可變區域CDR2，包含如SEQ ID NO：8或20所示之胺基酸序列；及/或一輕鏈可變區域CDR3，包含如SEQ ID NO：9或21所示之胺基酸序列，或一重鏈可變區域，具90%同一性。

【0019】 在其他實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含：一輕鏈可變區域(“VL”)，包含如SEQ ID NO：10、11、22或23所示之胺基酸序列，或與SEQ ID NO：10、11、22或23所示之胺基酸序列具90%同一性之胺基酸

序列。在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含一重鏈可變區域(“VH”)，包含如SEQ ID NO：4、5、16與17所示之胺基酸序列，或與SEQ ID NO：4、5、16與17所示之胺基酸序列具90%同一性之胺基酸序列。在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含一如SEQ ID NO:5所示之可變重鏈序列，以及一如SEQ ID NO:11所示之可變輕鏈序列，或具90%同一性之序列。在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含一如SEQ ID NO:17所示可變重鏈序列，以及一如SEQ ID NO:23所示之可變輕鏈序列，或具90%同一性之序列。

【0020】 在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含一可變輕鏈，其由SEQ ID NO：12或24所示之核酸序列，或與SEQ ID NO：12或24所示之核苷酸序列具90%同一性之序列所編碼。在另一實施例中，本發明之抗OX40 ABP或抗體包含一可變重鏈，其由SEQ ID NO：6或18所示之核苷酸序列，或與SEQ ID NO：6或18所示之核苷酸序列具90%同一性之序列所編碼。

【0021】 於此亦提供單株抗體。在一實施例中，該單株抗體包含一可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO：10或22所示之胺基酸序列，或與SEQ ID NO：10或22所示之胺基酸序列具90%同一性之胺基酸序列。於此亦提供單株抗體，其包含一可變重鏈，其包含如SEQ ID NO：4或16所示之胺基酸序列，或與SEQ ID NO：4或16所示之胺基酸序列具90%同一性之胺基酸序列。

【0022】 本發明實施例包括下列與序列表中揭示之CDRs、VH區域與VL區域與抗體，以及編碼其之核酸。

【圖式簡單說明】

圖1A係TLR4促效劑(CRX-527)於結腸癌CT-26同基因型(syngeneic)小鼠模型之劑量依賴性抗腫瘤活性顯示圖(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。其結果代表10隻動物之平均值。

圖1B係大鼠抗小鼠OX40受體抗體(殖株OX-86)於結腸癌CT-26同基因

型小鼠模型之劑量依賴性抗腫瘤活性顯示圖(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。其結果代表10隻動物之平均值；圖1A之對照組治療方式與圖1B者相同。

圖 2 係大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)、5 微克之 TLR4 促效劑(CRX-527)、及兩者之組合物於結腸癌 CT-26 同基因型小鼠模型之抗腫瘤活性顯示圖(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。其結果代表 10 隻動物之平均值。

圖 3 係大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)、25 微克之 TLR4 促效劑(CRX-527)、及兩者之組合物於結腸癌 CT-26 同基因型小鼠模型之劑量依賴性抗腫瘤活性顯示圖，其係測定 38 天(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。其結果代表 10 隻動物之平均值；圖 2 之對照組治療方式呈現與圖 3 者相同之動物。

圖 4A–4F 係對照組抗體(IgG)、大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)、5 或 25 微克之 TLR4 促效劑(CRX-527)、及 OX86 與 CRX-527 之組合物於一組結腸癌 CT-26 同基因型小鼠模型之個別小鼠劑量依賴性抗腫瘤活性顯示圖，其係測定 42 天(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。以圖 4A-4F 研究之殘存小鼠平均組別腫瘤體積繪製圖 2-3。

圖 5 係 4、20、或 100 微克之 TLR4 促效劑(CRX-601)於結腸癌 CT-26 同基因型小鼠模型之劑量依賴性抗腫瘤活性顯示圖(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。

圖 6-12 顯示本發明 ABPs 與抗體之序列，如 CDRs 及 VH 與 VL 序列。

圖 13-17 顯示本發明 ABPs 與抗體之序列，如 CDRs 及 VH 與 VL 序列。

圖 18 係腫瘤注射投劑 TLR4 促效劑 CRX-601 於 CT-26 同基因型小鼠腫瘤模型之劑量依賴性抗腫瘤活性顯示圖(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)。

圖 19 係以 TLR4 促效劑 CRX-601 腫瘤注射投劑治療 CT-26 同基因型小

鼠腫瘤模型之小鼠存活曲線顯示圖(*p 值≤0.05)。

圖 20 係 TLR4 促效劑 CRX-601 於 CT-26 同基因型小鼠腫瘤模型之劑量依賴性抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(*p 值≤0.05)。

圖 21 係 TLR4 促效劑 CRX-601 靜脈注射投劑治療 CT-26 同基因型小鼠腫瘤模型之小鼠存活曲線顯示圖(*p 值≤0.05)。

圖 22 係針對 CT-26 同基因型小鼠模型，每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 抗體殖株 OX-86 之抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)、每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 抗體殖株 OX-86，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、每隻小鼠 10 微克或 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物之經投劑抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(*p 值≤0.05)。

圖 23 係以每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、10 微克或 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物治療 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠存活曲線顯示圖(*p 值≤0.05)。

圖 24 係每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物於 CT-26 同基因型小鼠模型之抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(*p 值≤0.05)。

圖 25 顯示以每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物治療 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠存活曲線(*p 值≤0.05)。

圖 26 A-C 係以 10 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601、25 微克之大鼠抗小

鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)、及兩者之組合物治療結腸癌 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠白血球增加及免疫活化顯示圖，其係於投劑後 8 天測定。

圖 27 A-B 係以 10 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601、大鼠抗小鼠 OX40R 受體抗體(殖株 OX-86)、及兩者之組合物治療結腸癌 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠免疫活化型細胞介素 TNFα (A)與 IL-12p70 (B)增加之顯示圖，其係於投劑後 1 與 8 天測定。

圖 28 係每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物於 CT-26 同基因型小鼠模型之抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601)(*p 值<0.05)。

圖 29 係每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次腫瘤注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物於 CT-26 同基因型小鼠模型之抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601)(*p 值<0.05)。

圖 30 係以每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物治療 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠存活曲線顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601)(*p 值< 0.05)。

圖 31 係以每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次腫瘤注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物治療 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠存活曲線顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601)(*p 值< 0.05)。

圖 32 係無腫瘤小鼠於試驗 6 之 CT-26 腫瘤再激發(tumor re-challenge)顯示圖。於第一劑後 68 天，無腫瘤小鼠以 CT-26 腫瘤細胞再激發。亦包括空白對照組小鼠(naïve control mice)。儘管對照組空白小鼠之腫瘤生長至預期大小時，但治療組腫瘤被排斥且無腫瘤生長。

圖 33 係每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物於 CT-26 同基因型小鼠模型之抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601 靜脈注射投劑)(*p 值<0.05)。

圖 34 係每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次腫瘤注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物於 CT-26 同基因型小鼠模型之抗腫瘤活性(係以腫瘤隨時間之生長抑制進行測定)顯示圖(DOPC/CHOL 微脂體調配物用於 CRX-601 腫瘤注射投劑)(*p 值<0.05)。

圖 35 係以每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物治療 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠存活曲線顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601 靜脈注射投劑)(*p 值< 0.05)。

圖 36 係以每隻小鼠 25 微克之大鼠抗小鼠 OX40 受體抗體(殖株 OX-86)，其每週二次腹腔內注射共投劑 6 劑、或每隻小鼠 25 微克之 TLR4 促效劑 CRX-601，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑、及兩者之組合物治療 CT-26 同基因型小鼠模型之小鼠存活曲線顯示圖(0.5%甘油/4%葡萄糖載劑用於 CRX-601 靜脈注射投劑)(*p 值< 0.05)。

圖 37 係無腫瘤小鼠於試驗 7 之 CT-26 腫瘤再激發顯示圖 CT-26 腫瘤再激發。於第一劑後 80 天，所有無腫瘤小鼠以 CT-26 腫瘤細胞再激發。亦包

括空白對照組小鼠。儘管對照組空白小鼠之腫瘤生長至預期大小時，但治療組腫瘤被排斥且無腫瘤生長。

圖 38 係組 7 之個別小鼠之腫瘤生長顯示圖：每隻小鼠 25 微克 CRX-601 (溶於 0.5%甘油/4%葡萄糖)，其每週一次靜脈注射共投劑 3 劑+每隻小鼠 25 微克 OX86，其每週二次經腹膜內共投劑 6 劑。

圖 39 係組 8 之個別小鼠之腫瘤生長顯示圖：每隻小鼠 25 微克 CRX-601 (溶於 0.5%甘油/4%葡萄糖)，其每週一次腫瘤注射投劑於左腹側(left flank)腫瘤共 3 劑+每隻小鼠 25 微克 OX86，其每週二次經腹膜內共投劑 6 劑。

圖 40 係組 12 之個別小鼠之腫瘤生長顯示圖：每隻小鼠 25 微克 CRX-601 (溶於 DOPC/CHOL 微脂體)，其每週一次腫瘤注射投劑於左腹側腫瘤共 3 劑+每隻小鼠 25 微克 OX86，其每週二次經腹膜內共投劑 6 劑。

圖 41A-41D 係試驗 8 中所有治療組別之存活曲線顯示圖。於第 60 天研究中仍存活之小鼠皆完全無腫瘤。

圖42A-C係於體外細胞培養中，以一濃度範圍之CRX601 (0.01-1000奈克/毫升)治療人類CD4+T細胞(A)、樹狀細胞(B)、及單核球(C) 24小時誘發OX40表現向上調節之顯示圖。

【實施方式】

組成物與組合物

【0023】 免疫系統功能增進為癌症免疫療法的目標之一。雖然不受理論束縛，一般認為，對於要激活並有效地引起腫瘤消退或消除的免疫系統，必須在免疫系統的各部分之間以及腫瘤病灶進行有效溝通。毒殺腫瘤效應取決於一或多個步驟，如，抗原被未成熟樹狀細胞吸收，並由成熟樹狀細胞分別呈現經MHC I與II加工之抗原給原始CD8 (細胞毒殺性)與CD4 (輔助性)淋巴細胞，在引流淋巴結中。原始T細胞會表現分子如CTLA-4與CD28，其接合至抗原呈現分子(APCs)如樹突細胞上之B7家族共刺激分子。為了在免疫監視過程中維持T細胞，APCs上之B7較佳結合至CTLA-4，一種T淋巴

球上之抑制性分子。然而，一旦T細胞受體(TCR)與MHC第I或II類受體經由APC上呈現出的共價性胜肽結合，共刺激分子便會離開CTLA-4，而結合至較低親和性之刺激分子CD28，導致T細胞活化與增生。此經啟動之T淋巴細胞擴增族群會保留其呈現出之抗原記憶，當它們移動至遠端腫瘤位置時。一旦遇到帶有同源抗原(cognate antigen)之腫瘤細胞，它們便會藉由細胞毒性介質如顆粒酶B (granzyme B)和穿孔素(perforins)消除該腫瘤。此明顯簡單之事件順序高度依賴於數個細胞介素、共刺激分子與檢查點調節子，以活化並分化這些T淋巴細胞為可消除腫瘤的細胞之記憶池。

【0024】 因此，一種新興的免疫治療策略為標靶T細胞共刺激分子，如OX40。OX40 (如hOX40或hOX40R)為腫瘤壞死因子受體家族之一成員，其表現於，在其他細胞中，經活化之CD4與CD8 T細胞。其功能之一為在這些細胞中分化與長期存活。OX40 (OX40L)之配體係由經活化抗原-呈現細胞表現。在一實施例中，本發明ABPs與抗體調節OX40並促進T細胞的生長及/或分化，並增加長期記憶T-細胞群，如於OX40L之重疊機制中，藉由“接合至” OX40。因此，在另一實施例中，本發明之ABPs與抗體結合並接合至OX40。在另一實施例中，本發明ABPs與抗體調節OX40。在又一實施例中，本發明ABPs與抗體藉由模擬OX40L而調節OX40。在另一實施例中，本發明之ABPs與抗體為促效劑抗體。在另一實施例中，本發明ABPs與抗體調節OX40，並導致T細胞增生。在其他實施例中，本發明ABPs與抗體調節OX40，並改善、擴大、加強或增加CD4 T細胞之增生。在另一實施例中，本發明ABPs與抗體改善、擴大、加強或增加CD8 T細胞之增生。在其他實施例中，本發明ABPs與抗體改善、擴大、加強或增加CD4與CD8 T細胞之增生。在另一實施例中，本發明ABPs增進T細胞，如CD4或CD8 T細胞，或CD4與CD8 T細胞二者之功能。在其他實施例中，本發明ABPs與抗體會增強T細胞功能。在另一實施例中，本發明ABPs與抗體改善、擴大、加強或增加CD8 T細胞之長期存活。在其他實施例中，前述效應之任一者皆可在腫

瘤微環境下發生。

【0025】 同樣重要的是在腫瘤處的潛在強免疫抑制反應阻斷，藉由T調節細胞(Tregs)以及腫瘤細胞本身之媒介物(如轉形生長因子(TGF-β)與介白素-10 (IL-10))。癌症之重要免疫致病機制涉及Tregs，其發現於腫瘤病灶與發炎位置。一般而言，Treg細胞天然發生於循環系統，並可幫助免疫系統回復靜默，儘管是在警覺狀態，在遇到並消除外來致病原後。Treg細胞可幫助維持自體抗原之耐受性，且為天然抑制性功能，其表型特徵為CD4+、CD25+、FOXP3+細胞。為了削減耐受性以有效治療某些癌症，治療之一模式係傾向於腫瘤位置消除Tregs。會導致抗腫瘤反應之靶定與消除Tregs，與較差免疫原性者相較，在產生免疫原性之腫瘤上已更成功。許多腫瘤會分泌細胞介素，如TGF-β，其會藉由導致前驅物CD4+25+細胞獲得FOXP3+表型與Tregs功能，而阻礙免疫反應。

【0026】 使用於此之"調節"關於例如受體或其他標靶時，代表改變該受體之自然或現存功能，如其代表影響影響天然或人工配體結合至該受體或標靶上；其包括啟動部分或全部構形變化或通過受體或標靶之訊息傳遞，亦包括防止該受體或標靶與其天然或人工配體部分或完全結合。膜結合受體或標靶亦包括於此，為受體或標靶與膜內其他蛋白或分子作用改變，或在膜隔室之內的任何定位改變(或與其他分子共定位)，與其自然或未改變的狀態相較。因此，調節子為可調節標靶或受體之化合物或配體或分子。"調節"包括促效(agonizing)如訊息傳遞，以及拮抗或阻斷訊息傳遞，或與配體或化合物或分子作用，其在未改變或未調節狀態時發生。因此，調節子可為促效劑或拮抗劑。此外，熟習此技術領域者應了解到並非所有調節子皆對特定標靶或受體具有絕對選擇性，而是視為該標靶或受體之調節子；例如，TLR4調節子可接合至另一TLR，但仍視為TLR4調節子。其他調節子已知具有多重專一性，如TLR7/8調節子，其可同時調節TLR7與TLR8。具有此已知之雙重或三重專一性之分子視為其標靶之每一者之調節子；亦

即TLR7/8調節子為此述之TLR7調節子，且TLR7/8調節子亦為此述之TLR8調節子。

【0027】 標靶或受體之“促效劑”為模擬與該標靶或受體作用之天然配體或分子之一或多種功能之分子或化合物或配體，並包括啟動經由該受體之一或多個訊息傳遞事件、模擬天然配體之一或多種功能、啟動一或多個部分或完全構型變化，其可見於已知之經由該受體的功能或訊息傳遞中。

【0028】 因此，在一實施例中，該OX40 ABP或抗體會抑制Treg細胞對於其他T細胞之抑制作用，如在腫瘤環境下。

【0029】 累積的證據顯示腫瘤中Tregs比T效應細胞之比例與抗腫瘤反應相關。因此，在一實施例中，本發明之OX40 ABPs或抗體可調節OX40，以擴增T效應子(effector)數目與功能，並抑制Treg功能。

【0030】 增強、擴增、增進、增加或者改變OX40之抗腫瘤作用為本發明目標。於此描述本發明抗OX40 ABP或抗體與另一化合物例如此述之TLR調節子之組合物。

【0031】 因此，使用於此之術語“本發明之組合物”係指包含抗OX40 ABP或抗體與TLR4調節子例如AGP之組合物，如本文所述，其各可分開或同時投藥。

【0032】 使用於此之術語"癌症"、"瘤"與"腫瘤"可互相交換使用，且可為單一或複數形式，係指正在進行惡性轉化或正在進行細胞變化，其導致異常或無調控生長或過度增生之細胞。此種變化或惡性轉化通常會使此類細胞對宿主有致病性，因此亦欲包括會或可能會變成致病性且需要或受益於干預之前期癌變或癌前細胞。原發性癌細胞(即，從惡性轉化部位附近取得的細胞)可藉由已建立之技術例如組織學檢查而由非癌細胞辨別出。癌細胞之定義，使用於此，不僅包括原發性癌細胞，亦包括衍生自癌細胞祖先的任何細胞。此包括轉移性癌細胞、體外培養物和衍生自癌症細胞之細胞株。當提及通常為實體瘤之癌症類型時，"臨床上可偵測"的腫瘤為在腫瘤

塊之基礎上可檢測者；例如藉由流程如CAT掃描、MR影像化、X-光、超音波或觸診，及/或可偵測由病患取得之樣本中一或多種癌症專一性抗原之表現。換言之，此述之術語包括細胞、腫瘤、癌症，和任何階段的腫瘤，包括臨床所指稱之癌前病變、腫瘤、原位生長，以及晚期轉移性生長。腫瘤可為血液腫瘤，例如血液細胞腫瘤或類似腫瘤，即為液體腫瘤。基於此類腫瘤的臨床病症之具體實例包括白血病，例如慢性髓細胞性白血病或急性髓細胞性白血病；骨髓瘤如多發性骨髓瘤；淋巴瘤，以及類似病症。

【0033】 使用於此，術語“試劑”代表可在組織、系統、動物、哺乳動物，人類或其他個體中，產生希望之作用的物質。因此，術語“抗腫瘤試劑”代表在組織、系統、動物、哺乳動物，人，或其他個體中，產生抗腫瘤作用的物質。術語“試劑”可為單一化合物或二或多種化合物之組合物或組成物。

【0034】 使用於此之術語“治療”與其衍生詞係指治療性療法。就特定病症而言，治療係指：(1)改善該病症或該病症的一或多種生物表現(2)干擾(a)導致或對應於該病症之生物訊息級聯之一或多點，或(b)該症狀之一或多種生物表現；(3)減輕一或多種症狀、與病症或一或多種症狀相關的作用或副作用，或與該病症或其治療相關的一或多種症狀、作用或副作用；或(4)減緩該病症之進展，或該病症之一或多種生物表現。

【0035】 使用於此之“預防”係指藥物預防性投藥，以實質上降低症狀或其生物表現的可能性或嚴重性，或延緩此病症發作或其生物表現。本領域技術人員應了解，“預防”並不是絕對的術語。預防性治療是適當的，例如，當個體被認為具癌症發展高風險，如當個體具有明顯癌症家族史，或當個體已暴露於致癌物質。

【0036】 本文使用的術語"有效量"是指引起例如研究人員或臨床醫師所研究的組織、系統、動物或人類的生物或醫學反應的藥物或藥劑的量。此外，術語"治療有效量"是指：與未接受此劑量的相應患者相比較的任何劑

量，此劑量可導致疾病、病症或副作用的治療改善、治癒率提高、改善預防或增強改善，或降低疾病或病症的發展速率。該術語範圍還包括有效增進正常生理功能的劑量。

【0037】 本文使用的術語"有效量"是指引起例如研究人員或臨床醫師所研究的組織、系統、動物或人類的生物或醫學反應的藥物或藥劑的量。此外，術語"治療有效量"是指：與未接受此劑量的相應患者相比較的任何劑量，此劑量可導致疾病、病症或副作用的治療改善、治癒率提高、改善預防或增強改善，或降低疾病或病症的發展速率。該術語範圍還包括有效增進正常生理功能的劑量。

【0038】 如本文所使用的術語“組合物”及其文法變化詞表示同時投予或者以任何分開的連續投予治療有效量的化合物A (OX-40 ABP)與化合物B (TLR4促效劑)，或其醫藥上可接受之鹽類。此外，化合物是否以相同的劑型投予是無關緊要的，例如一個化合物可靜脈內投予，另一個化合物可腫瘤內投予。

【0039】 如本文所使用的術語“組合物套組”係指用於投予本發明化合物A或其醫藥上可接受之鹽類以及本發明化合物B或其醫藥上可接受之鹽類之醫藥組成物。當該兩種化合物同時投予時，所述組合物套組可含有化合物A或其醫藥上可接受之鹽類、以及化合物B或其醫藥上可接受之鹽類於單一醫藥組成物中，如藥錠，或於分開之醫藥組成物中。該組合物套組可包括化合物A或其醫藥上可接受之鹽類，以及化合物B或其醫藥上可接受之鹽類，於單一包裝之分開醫藥組成物中，或分開包裝之分開醫藥組成物中。

【0040】 在一實施例中，本發明提供一種組合物套組，包含下列成分：

化合物A，或其醫藥上可接受之鹽類，與醫藥上可接受之載劑結合；以及

化合物B，或其醫藥上可接受之鹽類，與醫藥上可接受之載劑結合。

【0041】 在另一實施例中，該組合物套組，包含下列成分：

化合物A，或其醫藥上可接受之鹽類，與醫藥上可接受之載劑結合；以及

化合物B，或其醫藥上可接受之鹽類，與醫藥上可接受之載劑結合，

其中各成分係以適於依序、分開及/或同時投予之形式提供。

【0042】 在另一實施例中，該組合物套組包含：

第一容器，其包含化合物A，或其醫藥上可接受之鹽類，與醫藥上可接受之載劑結合；

第二容器，其包含化合物B，或其醫藥上可接受之鹽類，與醫藥上可接受之載劑結合，以及用於容納所述第一容器和第二容器的容器裝置。

【0043】 所述“組合物套組”還可以提供說明書，如劑量和投藥說明書。這些劑量和投藥說明書可以為向醫師提供的資料，例如藥物產品標籤，或者它們可以為由醫師提供的資料，如向患者提供的說明書。

【0044】 使用於此，術語“化合物A^2”表示人類OX-40單株抗體或其抗原結合部分。適當地，化合物A^2代表具有一如SEQ ID NO:5所示之重鏈可變區域，與一如SEQ ID NO:11所示之輕鏈可變區域之人源化單株抗體。

【0045】 使用於此之術語“化合物B^2”代表如式I或式Ia之TLR4促效劑。適當地，化合物B^2代表TLR4促效劑CRX-601。

【0046】 適當地，本發明之組合物可在“規定的期間內”投予。

【0047】 如本文所使用的術語“規定的期間”及其文法變化詞係表示給藥化合物A^2和化合物B^2中的一個以及投予化合物A^2和化合物B^2中的另一個之間的時間間隔。除非另有說明，規定的期間可以包括同時投予。除非另有說明，規定的期間為在一天內投予化合物A^2與化合物B^2。

【0048】 適當地，如果在“規定的期間”內投予所述化合物而並非同時投予，它們均可以在彼此相隔約24小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約24小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約12小時內投予-在該情

況中，所述規定的期間將為約12小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約11小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約11小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約10小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約10小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約9小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約9小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約8小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約8小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約7小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約7小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約6小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約6小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約5小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約5小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約4小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約4小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約3小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約3小時；適當地，它們可以在彼此相隔約2小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約2小時；適當地，它們均可以在彼此相隔約1小時內投予-在該情況中，所述規定的期間將為約1小時。如本文所使用的，化合物A^2和化合物B^2的投予相隔小於約45分鐘視為同時投予。

【0049】 適當地，當本發明的組合物投予一段“規定的期間”時，各化合物共同投予一段“持續時間”。

【0050】 如本文所使用的術語“持續時間”及其文法變化詞係表示投予本發明的兩個化合物指定數目的連續天數。除非另有說明，連續天數不需在治療起點開始或治療終點結束，它只需要在治療過程中的特定時間點的連續天數。

【0051】 關於“規定的期間”投予：適當地，兩個化合物在規定的期間內投予至少一天-在該情況中，所述持續時間為至少一天；適當地，在治療過程中，兩個化合物在規定的期間內投予至少連續3天-在該情況中，所述持續時間為至少3天；適當地，在治療過程中，兩個化合物在規定的期間內給

藥至少連續5天-在該情況中，所述持續時間為至少5天；適當地，在治療過程中，兩個化合物在規定的期間內投予至少連續7天-在該情況中，所述持續時間為至少7天；適當地，在治療過程中，兩個化合物在規定的期間內投予至少連續14天-在該情況中，所述持續時間為至少14天；適當地，在治療過程中，兩個化合物在規定的期間內投予至少連續30天-在該情況中，所述持續時間為至少30天。

【0052】 適當地，如果所述化合物不在“規定的期間”投予，則它們就依序投予。如本文所使用的術語“依序投予”及其文法衍生詞係表示一天一次投予化合物A^2和化合物B^2中的一者一天或連續多天，接著一天一次投予化合物A^2和化合物B^2中的另一者連續兩天或更多天。同樣地，本發明還包括在依序投予化合物A^2和化合物B^2中的一者，以及投予化合物A^2和化合物B^2中的另一者之間所使用的休藥期。如本文所使用的，休藥期為在依序投予化合物A^2和化合物B^2中的一者之後和在投予化合物A^2和化合物B^2中的另一者之前不投予化合物A^2也不投予化合物B^2的間隔天數。休藥期為選自以下的間隔天數：1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天和14天。

【0053】 關於依序投予(sequential administration)：適當地，投予化合物A^2和化合物B^2中的一個連續1至30天，接著任擇地休藥期，接著投予化合物A^2和化合物B^2中的另一個連續1至30天。適當地，投予化合物A^2和化合物B^2中的一個連續1至21天，接著任選的休藥期，接著投予化合物A^2和化合物B^2中的另一個連續1至21天。適當地，投予化合物A^2和化合物B^2中的一個連續1至14天，接著14天的休藥期，接著投予化合物A^2和化合物B^2中的另一個連續1至14天。適當地，投予化合物A^2和化合物B^2中的一個連續1至7天，接著1至10天的休藥期，接著投予化合物A^2和化合物B^2中的另一個連續1至7天。

【0054】 適當地，化合物B^2首先連續投予，接著任選的休藥期，接著

投予化合物A^2。適當地，投予化合物B^2連續3至21天，接著任選的休藥期，接著投予化合物A^2連續3至21天。適當地，投予化合物B^2連續3至21天，接著14天的休藥期，接著投予化合物A^2連續3至21天。適當地，投予化合物B^2連續3至21天，接著3至14天的休藥期，接著投予化合物A^2連續3至21天。適當地，投予化合物B^2連續21天，接著任選的休藥期，接著投予化合物A^2連續14天。適當地，投予化合物B^2連續14天，接著1至14天的休藥期，接著投予化合物A^2連續14天。適當地，投予化合物B^2連續7天，接著3至10天的休藥期，接著投予化合物A^2連續7天。適當地，投予化合物B^2連續3天，接著3至14天的休藥期，接著投予化合物A^2連續7天。適當地，投予化合物B^2連續3天，接著3至10天的休藥期，接著投予化合物A^2連續3天。

【0055】 應當理解，“規定的期間”投予和“依序”投予可以接著重複投予，或者可接著交替投予方案，休藥期可以在重複投予或交替投予方案之前。

【0056】 本發明方法亦可與其他用於癌症治療之治療方法一同使用。

【0057】 儘管對於治療應用而言，治療有效量的本發明組合物可以粗化學品(raw chemical)投予，但是較佳該組合物以一種或多種醫藥組成物呈現。因此，本發明進一步提供醫藥組成物，其包括化合物A^2和/或化合物B^2，以及一種或多種醫藥上可接受之載劑。本發明的組合物如上文所述。所述載劑在以下意義上必須是可接受的：與製劑中其他成分相容，能夠形成醫藥調配物，以及對其接受者無害。根據本發明的另一觀點，尚提供了製備藥物調配物的方法，該方法包括混合化合物A^2和/或化合物B^2與一種或多種醫藥上可接受之載劑。如上文所示，所用藥物組合物中的這些成分可以分開的醫藥組成物存在，或者共同配製成一種醫藥調配物。

【0058】 醫藥調配物可以以含有預定量的活性成分/單位劑量的單位劑型存在。如本領域技術人員所已知的，活性成分的量取決於待治療的病症、投予途徑和患者的年齡、體重和狀況。較佳的單位劑量製劑為那些含

有每日劑量或亞劑量或其合適部分的活性成分的單位劑量。此外，這些醫藥調配物可以通過藥物領域公知的任何方法製備。

【0059】 化合物A^2和化合物B^2可以通過任何適合的途徑投予。合適的途徑包括經口、經直腸、經鼻、局部(包括含服(buccal)和舌下)、經腫瘤內、經陰道和腸胃外(包括皮下、肌內、靜脈內、真皮內、鞘內和硬膜外)。可以理解較佳途徑可隨著例如該組合的受治療者的病症和待治療的癌症而變化。還可以理解各個藥物可通過相同或不同的途徑投予，化合物A^2和化合物B^2可共同配製成醫藥組成物/調配物。

【0060】 治療有效量之本發明組合物(或該組合物中治療有效量之每一成分)之投予，較佳可使該組合物中之每一成分化合物可提供一或多種下列增進特性，當與單獨投予治療有效量之成分化合物：i)較高之抗癌作用，與最有效之單一試劑相較；ii)協同或高度協同抗癌活性；iii)一種劑量方案，其可提供增進的抗癌活性並降低副作用型態；iv)毒性作用型態降低，v)治療視窗增加；或vi)該成分化合物之一或二者之生物可利用性增加。

【0061】 本發明更提供醫藥組成物，其包括一或多種此述成分，以及一或多種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。本發明組合物可包含兩種醫藥組成物，一種包含本發明ABP或抗體，另一種包含TLR4調節子，每一種皆具有相同或不同之載劑、稀釋劑或賦形劑。該載劑、稀釋劑或賦形劑必須與製劑中其他成分相容，能夠形成藥用製劑，以及對其接受者無害。在一實施例中，該調配物可為水性或微脂體。在一實施例中，該微脂體可為DOPC/CHOL微脂體調配物。

【0062】 本發明組合物之成分，以及包含這些成分之醫藥組成物，可以任何順序以及不同途徑投予；包含這些之成分與醫藥組成物可同時投予。

【0063】 依據本發明之另一觀點，係提供一種製備醫藥組成物之方法，包括混合本發明組合物中之一成分與一或多種醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0064】 本發明成分可以任一適當途徑投予。就某些成分而言，適當之途徑包括經口、經直腸、經鼻、局部(包括含服(buccal)和舌下)、經陰道和腸胃外(包括皮下、肌內、靜脈內、真皮內、鞘內和硬膜外)。較佳途徑可隨著例如該組合的受治療者的病症和所治療的癌症而變化。各個藥物可以通過相同或不同的途徑投予，各成分可以一起配製/或位於單獨醫藥組成物中。

【0065】 在一實施例中，本發明組合物中之一或多種成分係經靜脈內投予。在另一實施例中，本發明組合物中之一或多種成分係經腫瘤內投予。在另一實施例中，本發明組合物中之一或多種成分係全身性投予，如經靜脈內，以及本發明組合物中之一或多種成分係經腫瘤內投予。在另一實施例中，本發明組合物中之所有種成分係全身性投予，如經靜脈內。在另一實施例中，本發明組合物中之所有成分係經腫瘤內投予。在該實施例之任一者中，如在此段中，本發明之各成分係以一或多種醫藥組成物方式投予。

結合至OX40之抗原結合蛋白與抗體

【0066】 “抗原結合蛋白(ABP)”代表結合至抗原之蛋白，包括抗體或基因改造分子，其功能類似於抗體。此替代抗體形式包括三抗體、四抗體、微型抗體，和一個微抗體。亦包括另一支架，其中本揭示任一分子之一或多個CDRs可排列為適當之非免疫球蛋白支架或骨架，如親和體、SpA支架、LDL受體群A區域、avimer (請見如美國專利申請公開號2005/0053973、2005/0089932、2005/0164301)或EGF區域。ABP亦包括此抗體或其他分子之抗原結合片段。此外，ABP可包含本發明全長抗體之VH區域、(Fab')2片段、Fab片段、雙專一性或雙變位分子或其等效物(如scFV、雙-、三-或四-抗體、Tandabs等)，當與適當輕鏈配對時。ABP可包含一抗體，其為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4；或IgM；IgA、IgE或IgD或其經修飾變異體。抗體重鏈之恆定區域可依此選擇。輕鏈恆定區域可為kappa或lambda恆定區域。ABP亦可為WO86/01533中所描述類型之嵌合性抗體，其包含一抗原結合區域，以及一

非免疫球蛋白區域。

【0067】 因此，本發明之ABP或抗OX40抗原結合蛋白為可結合至OX40者，在某些實施例中，具下列一或多者：調節通過OX40之訊息傳遞、調節OX40功能、協同OX40訊息傳遞、刺激OX40功能，或共刺激OX40訊息傳遞。美國專利9,006,399之實施例1揭示OX40結合試驗。熟習此技術領域者應立即瞭解到，有多種其他已知試驗可建立此類功能。

【0068】 術語"抗體"使用於此係指具抗原結合區域之分子，以及任擇性地一免疫球蛋白-類似區域或其片段，並包括單株(如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE，及其經修飾之變異物)、重組性、多株、嵌合性、人源化、雙變位(biparatopic)、雙專一性與異共軛抗體，或密閉構形多專一性抗體。"抗體"包括異種的、同種異體的、同基因，或它們的其它修飾形式。抗體可為經分離或經純化。抗體亦可為重組性，即以重組方式製造；例如，90%等同於參考抗體之抗體，可藉由使用技術上已知之重組分子生物技術，將某些殘基突變而產生。因此，本發明抗體可包含重鏈可變區域與輕鏈可變，其可製備為天然抗體結構，或製備為全長重組性抗體、(Fab')2片段、Fab片段、雙專一性或雙變位分子，或其等效物(如scFV、雙-、三-或四-抗體、Tandabs等)，當與適當輕鏈配對時。該抗體可為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其經修飾變異體。抗體重鏈之恆定區域可依此選擇。輕鏈恆定區域可為kappa或lambda恆定區域。抗體亦可為WO86/01533中所描述類型之嵌合性抗體，其包含一抗原結合區域，以及一非免疫球蛋白區域。

【0069】 熟習此技術領域者應了解到本發明之ABPs與抗體可結合至OX40之表位。ABP之表位為ABP與抗原結合之區域。二ABPs可結合至相同或重疊的表位，若每一者互相競爭抑制(阻斷)結合至抗原。亦即1x、5x、10x、20x或100x過量的一種抗體，會抑制另一種抗體的結合至少50%、75%、90%或甚至99%，於競爭性結合試驗中測得，與對照組缺乏競爭抗體相較(參見例如，Junghans, *et al., Cancer Res.* 50:1495, 1990)。此外，如果抗原中基本

上所有降低或消除一種抗體結合的胺基酸突變，也降低或消除另一種的結合，則2種抗體具有相同的表位。此外，如果一部分降低或消除一種抗體結合的胺基酸突變也降低或消除另一種的結合，則2種抗體具有"重疊的表位"。

【0070】 結合強度對於本發明ABP或抗體之劑量與投予相當重要。在一實施例中，本發明之ABP或抗體以高親和性結合至OX40，較佳為人類OX40。例如，當以Biacore®測量時，抗體結合至OX40，較佳為人類OX40，具親和度1-1000nM或500nM或更低，或親和度200nM或更低，或親和度100nM或更低，或親和度50 nM或更低，或親和度500pM或更低，或親和度400pM或更低，或親和度300pM或更低。在其他觀點中，該抗體結合至OX40，較佳為人類OX40，當以BIACORE®之測量值介於約50nM至約200nM之間，或介於約50nM至約150nM之間。在本發明之一觀點中，該抗體結合至OX40，較佳為人類OX40，具親和度小於100nM。

【0071】 在其他實施例中，結合係以BIACORE®測量。親和度為一分子，如本發明抗體，與另一分子，如標靶抗原結合之強度，於單一結合為點。抗體結合至標靶之結合親和度可以平衡法測定(如酵素連結免疫吸收試驗(ELISA)或放射線免疫試驗(RIA))，或動力學(如BIACORE®分析)。例如，BIACORE®法為技術上已知，可用於測量結合親和度。

【0072】 親和力是兩分子在多個位點之結合強度總和，如考慮到的相互作用的價數。

【0073】 在一觀點中，本發明ABP或抗體與OX40，較佳為人類OX40之平衡解離常數(KD)為100 nM或更低、10 nM或更低、2 nM或更低，或1 nM或更低。此外，該KD可介於5至10 nM之間；或介於1至2 nM之間。KD可介於1 pM至500 pM之間；或介於500 pM至1 nM。此技術領域者應了解到，KD數值愈小，結合愈強。KD的倒數(即1/KD)為平衡解離常數(KA)，單位為M-1。此技術領域者應了解到KA數值愈大，結合愈強。

【0074】 解離速率常數(kd)或"脫離-速率(off-rate)"描述一方之ABP或

抗體與另一方OX40，較佳為人類OX40之複合物的穩定性，即，該複合物每秒衰變之部分。例如kd值0.01 s-1相當於每秒1%複合物衰變。在一實施例中，該解離速率常數(kd)為1x10-3 s-1或更低、1x10-4 s-1或更低、1x10-5 s-1或更低，或1x10-6 s-1或更低。Kd值介於1x10-5 s-1與1x10-4 s-1之間；或介於1x10-4 s-1與1x10-3 s-1之間。

【0075】 本發明抗OX40 ABP或抗體、參考抗體，如用於結合OX40、OX40之表位，或OX40之片段間之競爭，可以競爭性ELISA、FMAT或BIAcore®測得。在一觀點中，該競爭試驗係以BIAcore®進行。有數個理由解釋此種競爭：該二蛋白可結合至相同或重疊之表位，其可為結合空間障礙抑制，或第一蛋白之結合會誘發抗原之構形變化，而其阻止會降低第二蛋白之結合。

【0076】 本文所使用之"結合片段"係指本發明ABPs或抗體之一部分或片段，其包括抗原-結合位置，並可結合至OX40，如此述定義，如但不限於，可結合至原始或全長抗體之相同表位。

【0077】 本發明ABPs與抗體之功能性片段亦包含於此。

【0078】 因此，"結合片段"與"功能性片段" 可為Fab與F(ab')2片段，其缺乏完整抗體的Fc片段，其在循環系統中會更快被清除，並具有較低的非專一性組織結合，與完整抗體相較(Wahl, *et al., J. Nuc. Med.* 24:316-325 (1983))。亦包括Fv片段(Hochman, *et al., Biochemistry* 12:1130-1135 (1973); Sharon, et al, *Biochemistry* 15:1591-1594(1976))。這些不同片段係使用傳統技術製造，如蛋白酶切割，或化學切割(請見如Rousseaux, *et al., Meth. Enzymol.*, 121:663-69(1986))。

【0079】 "功能性片段"，使用於此，係指本發明ABPs或抗體之一部分或片段，其包括抗原-結合位置，並可與原始ABP或抗體之相同標靶結合，如但不限於，結合至相同表位，且亦維持此述或技術上已知之一或多種調節或其他功能。

【0080】 由於本發明ABPs與抗體可包含重鏈可變區域與輕鏈可變區域，其可製備為天然抗體結構，功能性片段為維持此述全長ABP或抗體之一或多種功能者。因此，本發明ABP或抗體之結合片段包含VL或VH區域、(Fab')2 片段、Fab 片段、雙專一性或雙變位分子或其等效物(如scFV、雙-、三-或四-抗體、Tandabs等)，當與適當輕鏈配對時。

【0081】 術語"CDR"，使用於此，係指抗原結合蛋白之互補性決定區域之胺基酸序列。這些可為免疫球蛋白重鏈與輕鏈之高度可變區域。這些為免疫球蛋白可變部分之三重鏈與三輕鏈CDRs(或CDR區域)。

【0082】 此技術領域者應了解到，CDR序列有各種編號約定；Chothia (Chothia et al.(1989)Nature 342：877-883)、Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987))、AbM (University of Bath)與Contact (University College London)。可決定使用Kabat、Chothia、AbM與contact法之至少二者所得的最小重疊區域，以提供"最小結合單位"。最小結合單位可為CDR之次部分。抗體之結構與蛋白質摺疊代表其他殘基視為CDR序列之部分，且可由技術人員所理解。應注意到，某些CDR定義會隨著所使用之文獻而不同。

【0083】 除非另有指出，及/或缺乏具體指出之序列，於此提及"CDR"、"CDRL1"、"CDRL2"、"CDRL3"、"CDRH1"、"CDRH2"、"CDRH3"，係指胺基酸序列依據任何以之約定編號；此外，CDRs 指稱為可變輕鏈之"CDR1"、"CDR2"與"CDR3"，以及可變重鏈之"CDR1"、"CDR2"與"CDR3"。在某些實施例中，編號約定為Kabat約定。

【0084】 術語"CDR變異體"，使用於此，係指CDR經如取代、刪去或加入之至少1、2或3種胺基酸基修飾，其中該經修飾之抗原結合蛋白包含CDR變異體，實質上維持抗原結合蛋白修飾前的生理特性。應瞭解到，可修飾之每一CDR可單獨修飾或與另一CDR組合。在一觀點中，該修飾為取

代，尤其是保守性取代，如表1所示。

表1

側鏈	**成員**
疏水性	Met, Ala, Val, Leu, Ile
中性親水性	Cys, Ser, Thr
酸性	Asp, Glu
鹼性	Asn, Gln, His, Lys, Arg
影響鏈位向之殘基	Gly, Pro
芳香性	Trp, Tyr, Phe

【0085】 例如，在一變異體CDR中，最小結合單元之胺基酸殘基可維持相同，但包含該CDR作為Kabat或Chothia定義部分之側接殘基，可經一保守性胺基酸殘基取代。

【0086】 此類抗原結合蛋白包含經修飾之CDRs或最小結合單元，如上所述，可稱之為“功能性CDR變異體”或“功能性結合單元變異體”。

【0087】 該抗體可為任何物種，或經修飾而適於投予至另一物種。例如，來自小鼠之CDRs可人源化，以投予至人體。在任一實施例中，該抗原結合蛋白可任擇地為人源化抗體。

【0088】 "人源化抗體"係指經改造之抗體，其具衍生自非人類提供者免疫球蛋白之CDRs，而該分子其餘的免疫球蛋白-衍生部分則衍生自一(或多)人類免疫球蛋白。此外，框架支撐殘基可經改變，以保留結合親和度(請見如Queen, *et al., Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, *et al., Bio/Technology*, 9:421 (1991))。適當之人類受體抗體可為選自於保守性數據庫如KABAT®數據庫、Los Alamos數據庫，與Swiss蛋白數據庫之一者，藉由與提供者抗體之核苷酸與胺基酸序列之同一性。特徵為等同於提供者抗體之框架區域(在胺基酸基礎上)之人類抗體，適用於提供重鏈恆定區域及/或重鏈可變框架區域，以插入提供者CDRs。可提供輕鏈恆定或可變框架區

域之適當接受者抗體，可以類似方式選擇。應注意到，該接受者抗體重與輕鏈並不須源自於相同接受者抗體。先前技藝描述數種製造此類人源化抗體之方法- 請見如EP-A-0239400與EP-A-054951。

【0089】 在其他實施例中，該人源化抗體具人類抗體恆定區域，其為IgG。在另一實施例中，該IgG為上述參考文獻或專利公開案所揭示之序列。

【0090】 就核苷酸與胺基酸序列而言，術語“等同於"或“同一性”表示在對兩種核酸或其設計的序列進行最佳化排列和比較時，在具有適當的核苷酸插入和缺失情況下之相同程度。

【0091】 兩種序列之間的同一性百分比是這兩種序列所共有的相同位元點的數量的函數(即%同源性=相同位點的數量/位點的總數量X100)，考慮到了為了對這兩種序列進行最佳化比對而需要引入的空位數量和每一個空位的長度。兩種序列之間的序列比較和相同性百分比的確定，可以利用在下述的數學演算法完成。

【0092】 詢問核酸序列與主要核酸序列之同一性百分比為以百分比表示之“同一性”值，當主要核酸序列與詢問核酸序列具100%詢問覆蓋率，在以BLASTN比對進行配對時，其以BLASTN運算法計算。在詢問核酸序列與主要核酸序列之間的此種配對BLASTN對齊，係使用BLASTN運算法之預設值，可得自National Center for Biotechnology Institute網頁，低複雜度之過濾器關閉。重要的是，詢問核酸序列可描述為由申請專利範圍中所辨識出之核酸序列。

【0093】 詢問核酸序列與主要核酸序列之同一性百分比為“同一性”值，表示為百分比，其以BLASTP運算法計算，當主要核酸序列與詢問核酸序列具100%詢問覆蓋率，在以BLASTP比對進行配對時。在詢問核酸序列與主要核酸序列之間的此種配對BLASTP對齊，係使用BLASTN運算法之預設值，可得自National Center for Biotechnology Institute網頁，低複雜度之過濾器關閉。重要的是，詢問核酸序列可描述為由申請專利範圍中所辨識出

之核酸序列。

【0094】 在本發明任一實施例中，該ABP或抗體可為CDRs、VH、VL之一者或全部，與如此述SEQ ID NO所定義之參考序列具100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、或90百分比同一性。

【0095】 於此提供與人類OX40受體結合之ABPs與抗體(即抗OX40 ABP與抗人類OX40受體(hOX40R)抗體，本文有時稱之為"抗OX40 ABP或抗OX40抗體"及/或同一者之其他變異物)。這些抗體可用於治療或預防急性或慢性疾病或症狀，其病理學涉及OX40訊息傳遞。在一觀點中，抗原 結合蛋白，或分離出之人類抗體，或此蛋白或抗體之功能性片段，其結合至人類OX40R，並可有效作為癌症治療或對抗此述疾病之治療，例如與另一化合物如TLR4調節子或TLR4促效劑組合。於此揭示之抗原結合蛋白或抗OX40抗體之任一者皆可使用作為藥物。抗原結合蛋白或抗OX40抗體之任一或多種，可用於方法或組成物中，以治療癌症，如於此揭示者。

【0096】 此述之抗體可結合至OX40，且可結合至由下列基因編碼之OX40：NCBI Accession Number NP_003317、Genpept Accession Number P23510，或具有90%同源性或具有90%同一性者。於此提供分離出之抗體，可更進一步結合至OX40受體，其具下列GenBank Accession Numbers之一：AAB39944、AE11757或AAI05071。

【0097】 結合及/或調節OX40受體之抗原結合蛋白與抗體為技術上已知。本發明示範性ABPs與抗體係揭示於，如國際公開號WO2013/028231 (PCT/US2012/024570)，國際申請日為2012年2月9日，以及WO2012/027328 (PCT/US2011/048752)，國際申請日為2011年8月23日。(內文中若有任何定義衝突，將依據此申請案)。在一實施例中，本發明之OX40抗體係揭示於美國專利號9,163,085。

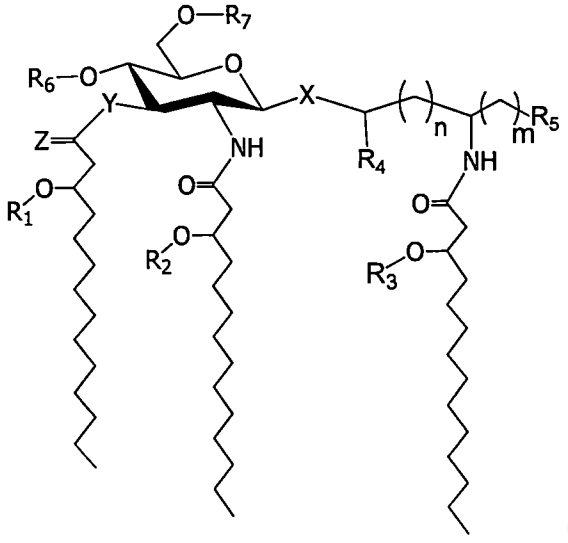
TLR4調節子

【0098】 本發明組何物包含TLR4 "調節子"，亦即，可調節TLR4之分

子，例如，藉由結合並啟動構形變化，或藉由接合TLR4之訊息傳遞、阻斷與TLR4配體結合之分子。

【0099】 在一實施例中，TLR4調節子為胺基烷基葡萄胺糖苷磷酸鹽化合物(AGPs)。TLR4會辨識細菌LPS (脂聚糖)，當活化啟動內生性免疫反應時。AGPs為細菌LPS之脂質A蛋白之單醣模擬物，並已在該化合物之"醯基鏈"發展出醚類與酯類連結。製備這些化合物之方法為已知並揭示於如WO 2006/016997、美國專利號7,288,640與6,113,918，以及WO 01/90129。其他AGPs與相關方法係揭示於美國專利號7,129,219、美國專利號6,525,028，與美國專利號6,911,434。使用於本發明之醯基鏈上有醚類鍵結之AGPs為已知並揭示於WO 2006/016997。AGP化合物依據式(III)闡釋並描述於WO 2006/016997中段落[0019]至[0021]，可用於本發明申明之方法與組合物中。

【0100】 使用於本發明之AGP化合物具下式1之結構：



(式1)

其中

m 為 0 至 6

n 為 0 至 4；

X 為 O 或 S，較佳為 O；

Y 為 O 或 NH；

Z 為 O 或 H；

R1、R2、R3 各獨立地選自於由 C1-20 醯基與 C1-20 烷基組成之族群；

R4 為 H 或 Me；

R5 獨立地選自於由-H、-OH、-(Cl-C4)烷氧基、-PO3R8R9、-OPO3R8R9、-SO3R8、-OSO3R8、-NR8R9、-SR8、-CN、-NO2、-CHO、-CO2R8，與–CONR8R9 組成之族群，其中 R8 與 R9 每一者獨立選自於 H 與(Cl-C4)烷基；以及

R6與R7每一者獨立地為H或PO3H2。

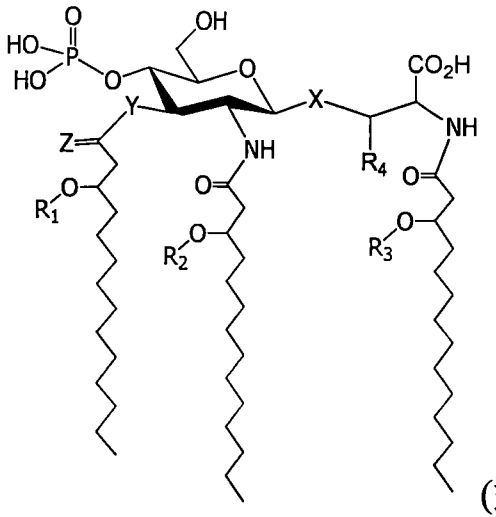
【0101】 在式1中，一般脂肪醯基殘基所連結之3'空間中心構形(亦即，二級醯基氧基或烷氧基殘基，如R1O、R2O與R3O)為R或S，較佳為R(依據Cahn-Ingold-Prelog優先規則定義)。R4與R5連結之醣苷配基幾何空間中心之構形可為R或S。所有空間異構物，對映體與非對映體，及其混合物，皆視為落於本發明範疇中。

【0102】 雜原子X與醣苷配基氮原子間之碳原子數目，係由變數"n"決定，其可為整數0至4，或整數0至2。

【0103】 一般脂肪酸R1、R2與R3之鏈長度可為約6至16個碳，或約9至14個碳。鏈長度可為相同或不同 。某些實施例包括鏈長度，其中R1、R2與R3為6或10或12或14。

【0104】 式1包含的L/D絲胺酸基、-蘇胺酸基、-半胱胺酸基醚類和酯類脂質AGPs、兩者之促效劑和拮抗劑和它們的類似物(n =1-4)，以及各種羧酸生物類性體(即R5是能夠形成鹽的酸性基團；磷酸鹽可位於葡糖胺單元的4-或6-位置，較佳地在4位置上)。

【0105】 在本發明之一實施例中，使用式1之AGP化合物，n為0，R5為CO2H，R6為PO3H2，以及R7為H。此AGP化合物如下式1a所示:



(式1a)

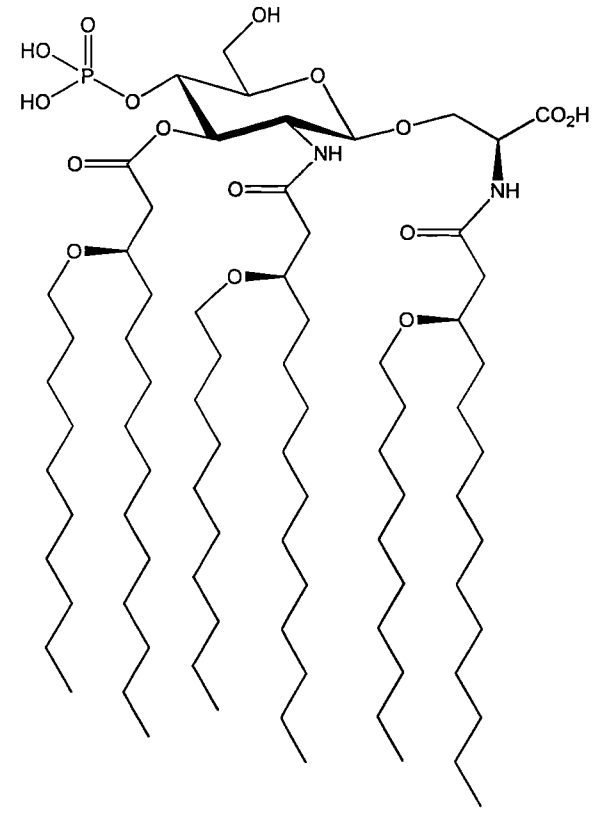
其中X為O或S；Y為O或NH；Z為O或H；R1、R2、R3各獨立地選自於由C1-20醯基與C1-20烷基組成之族群；以及R4為H或甲基。

【0106】 在式1a中，一般脂肪醯基殘基所連結之3'空間中心構形(亦即，二級醯基氧基或烷氧基殘基，如R1O、R2O與R3O)為R或S，較佳為R (依據Cahn-Ingold-Prelog優先規則定義)。R4與CO2H連結之醣苷配基幾何空間中心之構形可為R或S。所有空間異構物，對映體與非對映體，及其混合物，皆視為落於本發明範疇中。

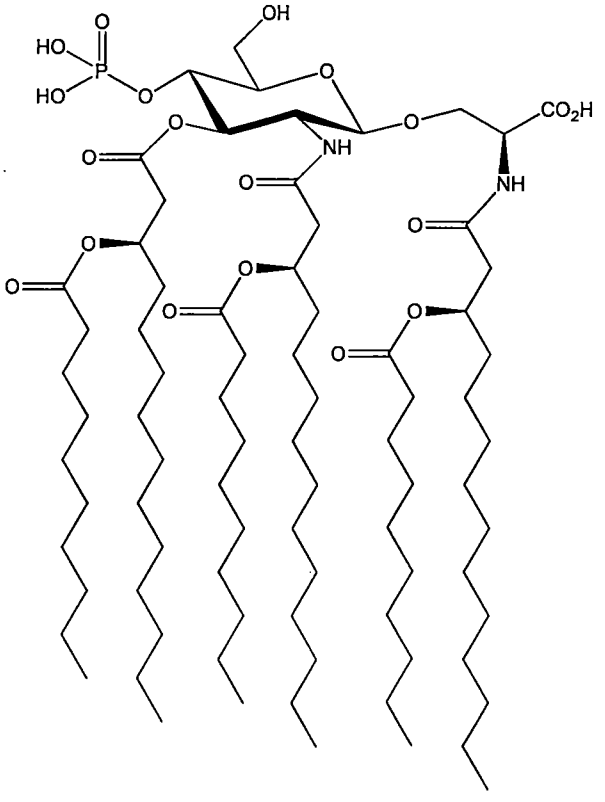
【0107】 式1a包含的L/D絲胺酸基、-蘇胺酸基、-半胱胺酸基醚類和酯類脂質AGPs、兩者之促效劑和拮抗劑。

【0108】 在式1與式1a中，Z為O，以雙鍵連結，或二氫原子，其以單鍵互相連結。亦即，該化合物為酯類連結，當Z=Y=O；醯胺連結，當Z =O，且Y=NH；以及酯類-連結，當Z=H/H且Y=O。

【0109】 式1化合物稱之為CRX-601與CRX-527。其結構如下:

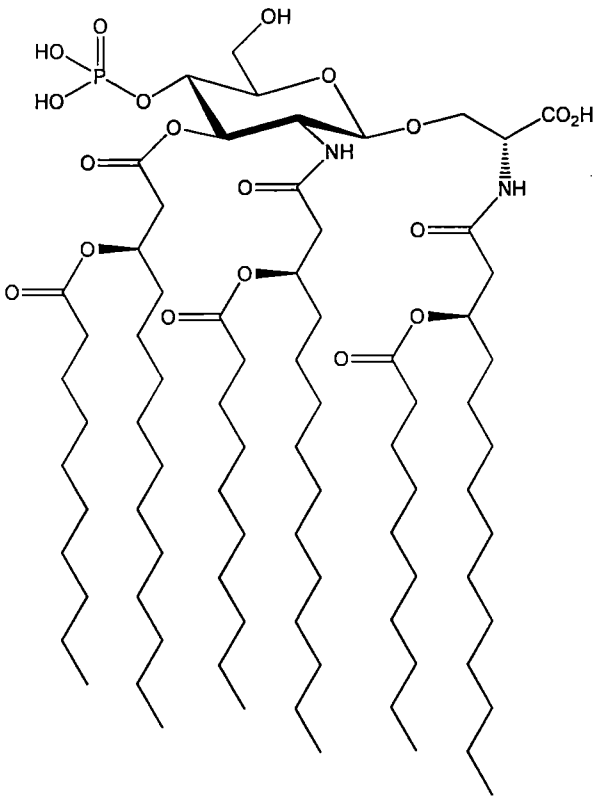


CRX-601



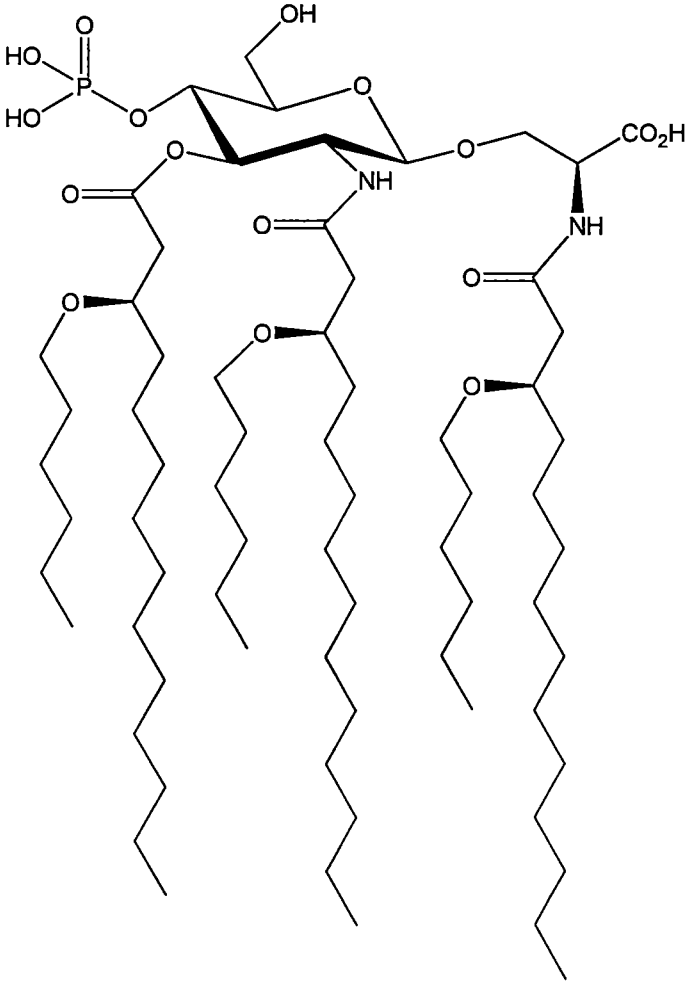
CRX-527

【0110】 此外，另一較佳實施例使用CRX-547，其具結構CRX-547

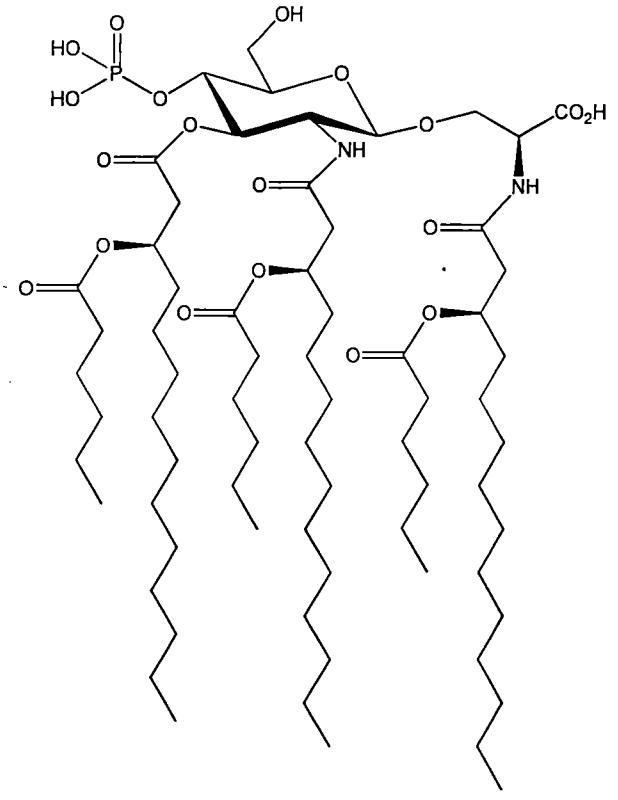


CRX-547

【0111】 其他實施例包括AGPs，如CRX-602或CRX-526，提供AGPs增進之穩定性，具較短之二級醯基或烷基鏈。



CRX-602



CRX-526

【0112】 在本發明其他實施例中，該TLR4調節子為促效劑。在其他實施例中，該作為促效劑之TLR4調節子選自於由：CRX-601、CRX-547與CRX-527組成之族群。

AGP緩衝液

【0113】 在本發明之一實施例中，該組成物包含TLR4調節子，如AGP，係使用兩性離子緩衝液緩衝。在本發明之一實施例中，該兩性離子緩衝液為胺基烷磺酸或適當之鹽類。胺基烷磺酸緩衝液之範例包括但不限於HEPES、HEPPS/EPPS、MOPS、MOBS與PIPES。在本發明之一實施例中，該緩衝液為醫藥上可接受之緩衝液，適用於人類，如用於市售注射產品者。在本發明之一實施例中，該緩衝液為HEPES。

治療方法

【0114】 一般相信本發明組合物可用於疾病，其中接合至OX40及/或TLR4是有益的。

【0115】 因此，本發明亦提供本發明之組合物，其係用於治療，尤其是治療其中接合至OX40及/或TLR4是有益的疾病，尤其是癌症。

【0116】 在一實施例中，本發明提供治療病患癌症之方法，使用TLR4促效劑組合物，如CRX-601，與人源化單株OX40抗體，其中該人源化OX40抗體係經靜脈內投予，以及該TLR4促效劑係經腫瘤內投予，於病患腫瘤內產生伴隨遠隔效應(abscopal effect)。

【0117】 使用於此，術語"伴隨遠隔效應"係指一現象，其中局部治療可導致腫瘤退化，不僅在治療位置，同時在遠端腫瘤位置亦可。Postow, *et al.*, *N Engl J Med* 366 (10)：925–31(2012).

【0118】 本發明之另一觀點係提供一種治療疾病之方法，其中接合至OX40及/或TLR4是有益的，包含投以本發明組合物。

【0119】 本發明之另一觀點係提供使用本發明組合物製造治療疾病之藥物，接合至OX40及/或TLR4有益於該疾病。在某些實施例中，該疾病為癌症。適當地，本發明提供使用本發明組合物治療癌症之用途。

【0120】 適用於以本發明組合物治療之癌症範例包括，但不限於原發性和轉移性形式之頭頸部癌、乳癌、肺癌、結腸癌、卵巢癌，和前列腺癌。適用之癌症選自於：腦癌(神經膠質瘤)、成膠質細胞瘤、星形細胞瘤、膠質母細胞瘤、Bannayan-Zonana症候群、考登病(Cowden disease)、里米特-杜克洛病(Lhermitte-Duclos disease)、乳癌、發炎性乳癌、腎母細胞瘤(Wilm's tumor)、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、橫紋肌肉瘤、室管膜瘤、髓母細胞瘤、結腸癌、頭頸癌、腎癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、骨肉瘤、骨巨細胞瘤、甲狀腺癌、淋巴母細胞T細胞白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、毛細胞白血病、急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓性白血病、AML、慢性中性粒細胞白血病、急性淋巴母細胞T細胞白血病、漿細胞瘤、免疫母細胞性大細胞白血病、套細胞白血病、多發性骨髓瘤巨核細胞白血病、多發性骨髓瘤，急性巨核細胞白血病、早幼粒細胞性白血病、紅血球性白血病、惡性淋巴瘤、何傑金氏淋巴瘤、非何傑金氏淋巴瘤、淋巴母細胞性T細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤

(Burkitt's lymphoma)、濾泡性淋巴瘤、神經母細胞瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、腎癌、間皮瘤、食道癌、唾腺癌、肝細胞癌、胃癌、鼻咽癌、頰癌、口腔癌、GIST(胃腸道間質瘤)；以及睪丸癌。

【0121】 此外，可治療之癌症範例包括巴瑞特腺癌(Barret's adenocarcinoma)；膽道癌；乳癌；子宮頸癌；膽管癌；中樞神經系統腫瘤，包括原發性CNS腫瘤如膠質母細胞瘤、星形細胞瘤(例如，成膠質細胞瘤多形性)和室管膜瘤，和繼發性CNS腫瘤(即，轉移到源自於中樞神經系統以外的腫瘤的中樞神經系統)；大腸癌包括大腸結腸癌；胃癌；頭頸癌，包括頭頸部鱗狀細胞癌；血液學癌症，包括白血病和淋巴瘤如急性淋巴母細胞性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、骨髓增生異常症候群、慢性骨髓性白血病、何傑金氏淋巴瘤、非何傑金氏淋巴瘤、巨核母細胞白血病、多發性骨髓瘤和紅血球性白血病；肝細胞癌；肺癌，包括小細胞肺癌和非小細胞肺癌；卵巢癌；子宮內膜癌；胰臟癌；腦下腺瘤；前列腺癌；腎癌；肉瘤；皮膚癌，包括黑素瘤；和甲狀腺癌。

【0122】 適當地，本發明相關於一種治療或降低癌症嚴重度之方法，該癌症選自於：腦(神經膠質瘤)、成膠質細胞瘤、星形細胞瘤、膠質母細胞瘤、Bannayan-Zonana症候群、考登病(Cowden disease)、里米特-杜克洛病(Lhermitte-Duclos disease)、乳癌、結腸癌、頭頸癌、腎癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、肉瘤和甲狀腺癌。

【0123】 在一實施例中，本發明相關於一種治療或降低癌症嚴重度之方法，該癌症選自於卵巢癌、乳癌、胰臟癌與前列腺癌。

【0124】 在一實施例中，本發明相關於一種治療或降低哺乳動物包括人類的癌前症候群嚴重度之方法，其中該癌前症候群選自於：

子宮頸上皮內瘤、意義不明單株丙種球蛋白病(MGUS)、骨髓增生異常症候群、再生障礙性貧血、子宮頸病變、皮膚痣(前黑素瘤)、前列腺內上皮(導

管)瘤(PIN)、導管原位癌(DCIS)、結腸息肉、重度肝炎或肝硬化。

【0125】 本發明組合物可單獨使用，或與一或多種其他治療試劑組合。因此，在另一觀點中，本發明提供進一步之組合物，包含本發明組合物與其他治療試劑或試劑群、包含該組合物之組成物與藥物，以及使用該進一步組合物、組成物與藥物於治療之用途，尤其是治療易感於OX40及/或TLR4之接合的疾病。

【0126】 在實施例中，本發明組合物可與其他癌症治療方法組合。尤其是，在抗腫瘤治療中，與其他化療、激素、抗體試劑，以及手術及/或放射治療，除了以上提到的，之治療組合皆可考慮。因此，本發明之組合療法包括投予本發明抗OX40 ABP或抗體，及/或TLR4調節子，以及選擇性使用其他治療試劑，包括抗癌試劑。此類試劑組合可共同投予或分開投予，以及當分開投予時，此可同時發生或以任何順序投予，時間上接近與遠隔。在一實施例中，該醫藥組合物包括本發明抗OX40 AB或抗體與TLR4調節子，以及選擇性至少一額外之抗癌試劑。

【0127】 在一實施例中，該其他抗癌療法為手術及/或放射線療法。

【0128】 在一實施例中，該其他抗癌療法為至少一額外之抗癌試劑。

【0129】 對應待治療之易感性腫瘤之具活性抗腫瘤試劑可使用於組合物中。典型抗腫瘤劑包括，但不限於，抗微管劑如二萜類化合物和長春花生物鹼；鉑配位錯合物(platinum coordination complexes)；烷化劑如氮芥、氧氮磷雜環己烯(oxazaphosphorines)、烷基磺酸酯(alkylsulfonates)、亞硝基脲和三氮烯；抗生素(antibiotic agents)如蒽環黴素、放線菌素和博來黴素；拓撲異構酶II抑制劑如表鬼白毒素；抗代謝劑，如嘌呤和嘧啶類似物及抗葉酸化合物；拓撲異構酶I抑制劑如喜樹鹼；激素和激素類似物；信號轉導途徑抑制劑；非受體酪胺酸激酶血管生成抑制劑；免疫治療劑；促細胞凋亡劑(proapoptoticagents)；以及細胞週期信號抑制劑。

【0130】 抗微管或抗有絲分裂劑：抗微管或抗有絲分裂劑是週期相專

一性藥物(phase specific agent)，其對於細胞週期中的M期或有絲分裂期之腫瘤細胞微管具活性。抗微管劑的實例包括但不限於，二萜類化合物和長春花生物鹼。

【0131】 二萜類，其源於天然來源，是週期相專一性抗癌劑，其作用於細胞週期中的G2/M期。一般認為二萜類化合物經由與此蛋白結合，使微管的β-微管蛋白次單位穩定。之後此蛋白質的分解受到抑制，有絲分裂停止，接著發生細胞死亡。二萜類化合物的實例包括但不限於紫杉醇及其類似物多西紫杉醇(docetaxel)。

【0132】 紫杉醇，5β,20-環氧基-1,2α,4,7β,10β,13α-六-羥基紫杉烷-11-烯-9-酮4,10-二醋酸酯2-苯甲酸酯13-酯，具(2R,3S)-N-苯甲醯基-3-苯基異絲胺酸；其是從太平洋紫杉樹(Taxus brevifolia)中分離出來的天然二萜產物，市售名稱為TAXOL®，為可注射溶液。其為萜類紫衫烷屬的成員。在美國紫杉醇已經被批准臨床用於治療難治的卵巢癌(Markman, *et al., Yale Journal of Biology and Medicine*, 64:583(1991); McGuire, *et al., Ann. lntem, Med.*, 111:273(989)和用於治療乳癌(Holmes, *et al., J. Nat. Cancer Inst.*, 83:1797(1991))。它是具有潛力的用於治療皮膚腫瘤(Einzig, *et. al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20:46(2001)和頭頸癌(Forastire, *et. al., Sem. Oncol.*, 20:56,(1990))的候選物。該化合物也顯示出治療多囊性腎病(Woo, *et. al., Nature*, 368:750(1994))、肺癌和瘧疾的潛力。用紫杉醇治療患者會導致骨髓抑制(多細胞譜系，Ignoff, *et. al, Cancer Chemotherapy Pocket Guide*, 1998)，其涉及持續給予超過閾值濃度(50nM)(Kearns, *et. al., Seminars in Oncology*, 3(6)p.16-23(1995))。

【0133】 多西紫杉醇(docetaxel)，(2R,3S)- N-羧基-3-苯基異絲胺酸,N-第三-丁酯，13-酯，具5β-20-環氧基-1,2α,4,7β,10β,13α-六羥基紫杉烷-11-烯-9-酮4-醋酸酯 2-苯甲酸酯，三水合物；作為可注射溶液TAXOTERE®，為商業上可獲得的。多西紫杉醇被表明用於治療乳癌。多西紫杉醇是紫杉醇

的半合成衍生物，參見(q.v.)其使用從歐洲紫杉醇的針葉中萃取出的天然前體，10-脫乙醯-眾果赤黴素(baccatin)III而製備獲得的。

【0134】 長春花生物鹼類是衍生自長春花屬植物的週期相專一性抗腫瘤藥物。長春花生物鹼類，經由與微管蛋白專一性結合，作用於細胞週期中的M期(有絲分裂期)。因此，結合的微管蛋白分子無法聚合成微管。有絲分裂被認為停滯於中期，隨後細胞死亡。長春花生物鹼類實例包括，但不限於，長春鹼、長春新鹼和長春瑞濱(vinorelbine)。

【0135】 長春鹼(Vinblastine)、硫酸長春花鹼，市售名稱為VELBAN®，為可注射溶液。儘管已顯示它可能作為不同實體瘤的第二線治療療效，它主要被顯示用於治療睪丸癌和各種淋巴癌，包括霍奇金氏病；和淋巴細胞性以及組織細胞性淋巴瘤。就長春鹼而言，骨髓抑制是劑量限制副作用。

【0136】 長春新鹼(Vincristine)、硫酸22-酮基長春花鹼市售名為ONCOVIN®，為可注射溶液。長春新鹼具有治療急性白血病的療效，且被發現也可以用於作為霍奇金氏及非霍奇金氏惡性淋巴瘤的治療方案。脫髮和神經性作用是長春新鹼最常見的副作用，且骨髓抑制和胃腸黏膜發炎效應較小程度地發生。

【0137】 長春瑞濱(Vinorelbine)，3',4'-二脫氫-4'-去氧-C'-去甲長春花鹼[R-(R*,R*)-2, 3-二羥基丁二酸鹽(1:2)(鹽)]，市售命稱為(NAVELBINE®)，為酒石酸長春瑞濱可注射溶液，為半合成的長春花生物鹼。長春瑞濱作為單一藥物或與其它化療藥物(例如順鉑)組合，用於治療不同實體瘤，特別是非小細胞肺癌、晚期乳癌和激素難治性前列腺癌。骨髓抑制是長春瑞濱最常見的劑量限制副作用。

【0138】 鉑配位複合物：鉑配位複合物是非週期相專一性抗癌藥物，其與DNA相互作用。鉑複合物進入腫瘤細胞，進行水合反應，與DNA形成鏈內和鏈間的交聯，對腫瘤造成負面的生物效應。鉑配位錯合物的實例包

括，但不限於，奧沙利鉑、順鉑和卡鉑。

【0139】 順鉑，順式二胺二氯鉑，市售名稱為PLATINOL®，為可注射溶液。順鉑主要被顯示用於治療轉移性睪丸癌和卵巢癌以及晚期膀胱癌。

【0140】 卡鉑，二胺[1,1-環丁烷-二羧酸酯(2-)-O,O']，市售名為PARAPLATIN®，為可注射溶液。卡鉑的主要療效在於晚期卵巢癌的一線和二線治療

【0141】 烷化劑是非週期相專一性抗癌藥物和強親電子劑。一般而言，烷化劑，經由烷化反應，經DNA分子的親核部分例如磷酸根、胺基、巯基、羥基、羧基和咪唑基團，與DNA形成共價連接。這種烷化反應中斷核酸功能，導致細胞死亡。烷化劑的實例包括，但不限於，氮芥例如環磷醯胺、美法侖和苯丁酸氮芥；烷基磺酸酯例如白消安(busulfan)；亞硝基脲類例如卡莫司汀(carmustine)；和三氮烯類例如達卡巴嗪(dacarbazine)。

【0142】 環磷醯胺，2-[雙(2-氯乙基)胺基]四氫-2H-1,3,2-氧氮磷雜環己烷2-氧化物單水合物，市售名稱為GYTOXAN®，為可注射溶液或片劑。環磷醯胺可作為單一藥物或與其它化療藥物的組合，用於治療惡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤和白血病。

【0143】 美法侖(Melphalan)，4-[雙(2-氯乙基)胺基]-L-苯丙胺酸，市售名稱為ALKERAN®，為可注射溶液或片劑。美法侖被顯示是多發性骨髓瘤和無法切除的卵巢上皮癌的舒減療法。骨髓抑制是美法侖的最常見劑量限制副作用。

【0144】 苯丁酸氮芥(Chlorambucil)，4-[雙(2-氯乙基)胺基]苯丁酸，市售名為LEUKERAN®，為片劑。苯丁酸氮芥被顯示是慢性淋巴白血病，和惡性淋巴瘤例如淋巴肉瘤、巨濾泡型淋巴瘤和霍奇金氏病的舒減治療。

【0145】 白消安(Busulfan)，1,4-丁二醇二甲磺酸酯，市售名為MYLERAN® TABLETS。白消安(Busulfan)被顯示是慢性骨髓性白血病的舒減治療。

【0146】 卡莫司汀(Carmustine)，1,3-[雙(2-氯乙基)-1-亞硝基脲，是可商業獲得的市售名稱為BiCNU®，為凍乾物質單瓶。卡莫司汀被顯示是作為單一藥物或與其它藥物的組合，用於腦瘤、多發性骨髓瘤、霍奇金氏病和非霍奇金氏淋巴瘤的舒減治療。

【0147】 達卡巴嗪(Dacarbazine)，5-(3,3-二甲基-1-三氮烯基)-咪唑-4-甲醯胺，市售名為DTIC- Dome®，為單瓶材料。達卡巴嗪被顯示是治療轉移性惡性黑色素瘤和與其它藥劑組合用於霍奇金氏病的二線治療。

【0148】 抗生素抗腫瘤藥物：抗生素抗腫瘤藥物是非週期相專一性的藥物，其結合或插入DNA。一般而言，這類作用導致穩定的DNA複合物產生或鏈斷裂，這中斷了核苷酸的常規功能而導致細胞死亡。抗生素抗腫瘤藥物的實例包括，但不限於，放線菌素類例如更生黴素、蒽環類例如柔紅黴素和多柔比星(doxorubicin)；和博來黴素類(bleomycins)。

【0149】 更生黴素(Dactinomycin)，也被稱為放線菌素D(Actinomycin D)，市售名為COSMEGEN®，為可注射溶液。更生黴素被顯示用於治療維爾姆氏瘤和橫紋肌肉瘤。

【0150】 柔紅黴素，(8S-順式)-8-乙酸基-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧-α-L-lyxo-己吡喃糖基)氧基]-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-1-甲氧基-5,12萘並萘二酮鹽酸化物，市售名為DAUNOXOME®，為可注射脂質體，或市售名為CERUBIDINE®，為可注射形式。柔紅黴素被顯示用於治療急性非淋巴性白血病和晚期HIV併發之卡波西氏肉瘤中導致緩解。

【0151】 多柔比星(Doxorubicin)，(8S, 10S)-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧-α-L-來蘇(lyxo)-己吡喃糖基)氧基]-8-乙醇酸基，7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-1-甲氧基-5,12萘並萘二酮鹽酸化物，市售名為RUBEX®或ADRIAMYCIN RDF®，為可注射形式。多柔比星主要被顯示用於治療急性淋巴母細胞性白血病和急性骨髓母細胞性白血病，但是也是適用於治療某些實體瘤和淋巴瘤的成分。

【0152】 博來黴素(Bleomycin)，一種輪枝鏈黴菌(*Streptomyces verticillus*)菌株中分離出的細胞毒性糖肽抗生素的混合物，市售名為BLENOXANE®。博來黴素被顯示作為單一藥物或與其它藥物的組合，用於鱗狀細胞癌、淋巴瘤和睪丸癌的舒減治療。

【0153】 拓撲異構酶II抑制劑：拓撲異構酶II抑制劑包括，但不限於，表鬼白毒素。

【0154】 表鬼白毒素(Epipodophyllotoxins)是衍生自曼陀羅植物的週期相專一性抗腫瘤藥物。表鬼白毒素通常作用於細胞週期中的S和G2期細胞，通過與拓撲異構酶II和DNA形成三元錯合物而造成DNA鏈斷裂。該鏈斷裂累積且細胞隨之死亡。表鬼臼毒素的實例包括，但不限於，依託泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide)。

【0155】 依託泊苷(etoposide)，4'-去甲表鬼臼毒素9[4,6-0-(R)-亞乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷]，市售名稱為VePESID®，為可注射溶液或膠囊，通常稱為VP-16。依託泊苷被顯示是作為單一藥物或與其它化療劑的組合用於睪丸癌和非小細胞肺癌的治療。

【0156】 替尼泊苷(teniposide)，4'-去甲表鬼臼毒素9[4,6-0-(R)-亞噻吩基-β -D-吡喃葡萄糖苷]，市售名為VUMON®，為可注射溶液，通稱為VM-26。替尼泊苷被顯示是作為單一藥物或與其它化療劑的組合用於兒童的急性白血病治療。

【0157】 抗代謝腫瘤藥物是週期相專一性的抗腫瘤藥物，其作用於細胞週期的S期(DNA合成)，抑制DNA合成或抑制嘌呤或嘧啶鹼合成，且因此限制DNA合成。因此，S期無法繼續進行和細胞隨之死亡。抗代謝藥抗腫瘤物的實例包括，但不限於，氟尿嘧啶、甲胺蝶呤、阿糖胞苷、硫醇嘌呤、硫鳥嘌呤和吉西他濱(gemcitabine)。

【0158】 5-氟尿嘧啶、5-氟-2,4-(1H,3H)嘧啶二酮，市售名稱為氟尿嘧啶。5-氟尿嘧啶的投予導致胸苷酸合成抑制，並且加入RNA和DNA。結果

通常是細胞死亡。5-氟尿嘧啶被顯示是作為單一藥物或與其它化療劑的組合用於治療乳癌、結腸癌、直腸癌、胃癌和胰臟癌。其它氟嘧啶類似物包括5-氟去氧尿苷(氟尿苷)和單磷酸5-氟去氧尿苷。

【0159】 阿糖胞苷(Cytarabine)，4-胺基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基-2(IH)-嘧啶酮，市售名稱為CYTOSAR-U®，通常稱為Ara-C。一般相信，阿糖胞苷具有S期的細胞週期的專一性，通過阿糖胞苷末端插入生長的DNA鏈而抑制DNA鏈伸長。阿糖胞苷被顯示是作為單一藥物或與其它化療劑的組合，用於治療急性白血病。其它胞苷類似物包括5-氮雜胞苷和2',2-二氟去氧胞苷(吉西他濱(gemcitabine))。

【0160】 巯嘌呤，1,7-二氫-6H-嘌呤-6-硫酮單水合物，市售名為PURINETHOL®。巯嘌呤顯示出在S期的細胞週期專一性，通過目前還沒有明確的機制而抑制DNA合成。巯嘌呤被顯示是作為單一藥物或與其它化療劑的組合用於治療急性白血病。適用的巯嘌呤類似物是硫唑嘌呤。

【0161】 硫鳥嘌呤，2-胺基-1,7-二氫-6H-嘌呤-6-硫酮，市售名稱為TABLOID®。硫鳥嘌呤顯示出在S期的細胞週期的專一性，通過目前還沒有明確的機制而抑制DNA合成。硫鳥嘌呤被顯示作為單一藥物或與其它化療劑的組合用於治療急性白血病。其它嘌呤類似物包括噴司他丁(pentostatin)、赤式羥基壬基腺嘌呤(erythrohydroxynonyladenine)、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate)和克拉屈濱(cladribine)。

【0162】 吉西他濱(Gemcitabine)，2'-去氧-2',2'-二氟胞苷單氫氯化物(β-異構體)，市售名稱為GEMZAR®。吉西他濱顯示出在S期的細胞週期的專一性，阻斷通過G1/S邊界的細胞進展。吉西他濱被顯示與順鉑組合，可治療局部晚期的非小細胞肺癌和單獨用於治療局部晚期的胰臟癌。

【0163】 甲胺蝶呤，N-[4[[(2,4-二胺基-6-蝶啶基)甲基]甲胺基]苯甲醯基]-L-穀胺酸，市售名稱為甲胺蝶呤鈉。甲胺蝶呤顯示出在S期的細胞週期的專一性，通過由嘌呤核苷酸和胸苷酸合成所需的二氫葉酸還原酶的抑制

而抑制DNA合成、修復和/或複製。甲胺蝶呤被顯示作為單一藥物或與其它化療藥物組合治療絨毛膜癌、腦膜白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、以及乳癌、頭癌、頸癌、卵巢癌和膀胱癌。

【0164】 拓撲異構酶I抑制劑：樹鹼類，包括喜樹鹼和喜樹鹼衍生物是可獲得的或在研發中的拓撲異構酶I抑制劑。喜樹鹼類細胞毒活性被認為是與其拓撲異構酶I抑制活性相關。喜樹鹼類的實例包括，但不限於伊立替康(irinotecan)、托泊替康(topotecan)和下文所述的7-(4-甲基六氫吡嗪基-亞甲基)-10,11-亞乙二氧基-20-喜樹鹼的各種光學形式。

【0165】 伊立替康(irinotecan) HCl，(4S)-4,11-二乙基-4-羥基-9-[(4-哌啶並哌啶基)羰氧基]-1H-吡喃並[3',4',6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14(4H,12H)-二酮鹽酸化物，市售名為CAMPTOSAR®，為可注射溶液。伊立替康是喜樹鹼的衍生物，連同其活性代謝物SN-38結合至拓撲異構酶1-DNA複合物上。人們認為產生細胞毒性的原因是，通過拓撲異構酶1:DNA:伊立替康或SN-38三元複合物與複製酶的相互作用造成無可修復的雙鏈斷裂。伊立替康顯示用於治療結腸或直腸的轉移性癌症。

【0166】 托泊替康(Topotecan) HCl，(S)-10-[(二甲胺基)甲基]-4-乙基-4,9-二羥基-1H-吡喃並[3',4',6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14-(4H,12H)-二酮單氫氯化物，市售名稱為HYCAMTIN®，為可注射溶液。托泊替康是喜樹鹼的衍生物，其結合至拓撲異構酶1-DNA錯合物和預防單鏈斷裂的再連接，所述斷裂由拓撲異構酶I回應DNA分子的旋轉應變所造成。托泊替康顯示用於卵巢癌和小細胞肺癌的轉移性癌的第二線治療。

【0167】 激素類和激素類似物是用於治療癌症的適用化合物，其中這些激素與癌的生長和/或不生長有關係。可用於治療癌症的激素類和激素類似物的實例包括，但不限於，腎上腺皮質類固醇類例如潑尼松(prednisone)和潑尼松龍(prednisolone)，其適用於治療兒童惡性淋巴瘤和急性白血病；胺魯米特和其它芳香酶抑制劑例如阿那曲唑(anastrozole)、來曲唑(letrazole)、

伏氯唑(vorazole)和依西美坦(exemestane)，適用於治療腎上腺皮質癌和含有雌性激素受體的激素依賴性乳癌；黃體酮類(progestrins)例如醋酸甲地孕酮，適用於治療激素依賴性乳癌和子宮內膜癌；雌激素、雄激素和抗雄激素例如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、醋酸環丙孕酮(cyproterone acetate)，和5a-還原酶例如非那雄胺(finasteride)和度他雄胺(dutasteride)，適用於治療前列腺癌和良性前列腺肥大；抗雌激素例如他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、碘昔芬(iodoxyfene)，以及選擇性雌性激素受體調節劑(SERMS)，例如描述於美國專利號5,681,835, 5,877,219與6,207,716中者，適用於治療激素依賴性乳癌和其它易感癌；和促性腺激素釋放激素(GnRH)和其類似物，其刺激促黃體生成激素(LH)和/或濾泡刺激激素(FSH)的釋放，用於治療前列腺癌，例如，LHRH激動劑和拮抗劑例如乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)和亮丙瑞林(luprolide)。

【0168】 訊息傳遞路徑抑制劑：訊息傳遞路徑抑制劑可阻斷或抑制引起細胞內變化的化學過程。如本文所使用的，此變化是細胞增生或分化。適用於本發明的訊息傳遞抑制劑包括受體酪胺酸激酶、非受體酪胺酸激酶、SH2/SH3結構域阻斷劑、絲胺酸/蘇胺酸激酶、磷脂醯肌醇-3激酶、肌醇信號傳遞和Ras致癌基因的抑制劑。

【0169】 若干種蛋白質酪胺酸激酶催化涉及細胞生長調控的各種蛋白質內特定酪胺醯基殘基的磷酸化。這種蛋白質酪胺胺酸激酶可以廣義分為受體或非受體激酶。

【0170】 受體酪胺酸激酶是具有細胞外配體結合結構域、跨膜結構域和酪胺酸激酶結構域的跨膜蛋白。受體酪胺酸激酶涉及細胞生長的調控，通常被稱為生長因子受體。諸多這些激酶的不恰當的或未受控制的活化，即異常的激酶生長因子受體活性，例如由過度表現或突變所造成的，已顯示導致不受控制的細胞生長。因此，這類激酶的異常活性已經與惡性組織

生長相聯繫。因而，這類激酶的抑制劑可以提供癌症治療方法。生長因子受體包括，例如，表皮生長因子受體(EGFr)、血小板衍生的生長因子受體(PDGFr)、erbB2、erbB4、ret、血管內皮生長因子受體(VEGFr)、具有免疫球蛋白樣和表皮生長因子同源區域(TIE-2)的酪胺酸激酶、胰島素生長因子-1(IGFI)受體、巨噬細胞集落刺激因子(cfms)、BTK、ckit、cmet、成纖維細胞生長因子(FGF)受體、Trk受體(TrkA、TrkB和TrkC)、肝配蛋白(eph)受體，以及RET原致癌基因。生長受體的若干抑制劑在研發中，包括配體拮抗劑、抗體、酪胺酸激酶抑制劑和反義寡核苷酸。抑制生長因子受體功能的生長因子受體和藥物記載於，例如Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents(2000)10(6):803-818；Shawver, *et al DDT*, Vol 2, No. 2(February 1997)；以及Lofts, F. J., *et al,* GROWTH FACTOR RECEPTORS AS TARGETS", NEW MOLECULAR TARGETS FOR CANCER CHEMOTHERAPY (Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London)。

【0171】 非生長因子受體激酶之酪胺酸激酶，被稱為非受體酪胺酸激酶。適用於本發明的非受體酪胺酸激酶，其是抗癌藥物的標靶點或潛在標靶點，包括cSrc、Lck、Fyn、Yes、Jak、cAbl、FAK (黏著斑激酶)、布魯頓氏(Brutons)酪胺酸激酶、以及Bcr-Abl。這種非受體激酶和抑制非受體酪胺酸激酶功能的藥物記載於Sinh, *et al., Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 8(5)：465–80 (1999)；以及Bolen, *et al., Annual review of Immunology*, 15：371-404 (1997)。

【0172】 SH2/SH3結構域阻斷劑是中斷多種酶或銜接蛋白中SH2或SH3結構域結合性質的藥物，所述多種酶或銜接蛋白包括，PI3-K p85次單元、Src族激酶、接頭分子(She、Crk、Nek、Grb2)和Ras-GAP。SH2/SH3結構域作為抗癌藥物的標靶討論於Smithgall, T.E., *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,* 34(3)125-32(1995)。

【0173】 絲胺酸/蘇胺酸激酶的抑制劑包括MAP激酶級聯阻斷劑，其

包括Raf激酶(rafk)、促細胞分裂原或細胞外調節激酶(MEKs)，以及細胞外調節激酶(ERKs)的阻斷劑；以及蛋白激酶C族成員阻斷劑，其包括PKCs(α、β、ρ、ε、μ、λ、t、ζ)。IkB激酶家族(IKKa、IKKb)、PKB族激酶、akt激酶族成員和TGF β受體激酶的阻斷劑。此類絲胺酸/蘇胺酸激酶和它們的抑制劑記載於Yamamoto, *et al., Journal of Biochemistry,* 126(5)799-803(1999)；Brodt, *et al., Biochemical Pharmacology*, 60. 1101-1107(2000)；Massague, *et al., Cancer Surveys,* 27:41-64(1996)；Philip, *et al., Cancer Treatment and Research,* 78：3-27(1995), Lackey, *et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*,(10)223-226(2000)；美國專利號6,268,391；以及 Martinez-Iacaci, *et al, Int. J. Cancer*, 88(1), 44-52(2000)。

【0174】 磷脂醯肌醇-3激酶家族成員的抑制劑(包括PI3-激酶、ATM、DNA-PK和Ku的阻斷劑)也適用於本發明。這種激酶討論於Abraham, R.T.(1996), *Current Opinion in Immunology.* 8(3)412-8；Canman, C.E., Lim, D.S.(1998), *Oncogene* 17(25)3301-3308；Jackson, S.P.(1997), *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29(7):935-8；以及Zhong, H., *et al, Cancer Res.*,(2000)60(6), 1541-1545。

【0175】 肌醇訊息傳遞抑制劑例如磷脂酶C阻斷劑和肌醇類似物，亦適用於本發明。這種訊息傳遞抑制劑記載於Powis, G., and Kozikowski A.,(1994)NEW MOLECULAR TARGETS FOR CANCER CHEMOTHERAPY ED.(Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London)。

【0176】 另一組訊息傳遞途徑抑制劑是Ras致癌基因的抑制劑。這種抑制劑包括法尼基(farnesyl)轉移酶、香葉草基-香葉草基轉移酶和CAAX蛋白酶以及反義寡核苷酸、核糖酶和免疫治療的抑制劑。這種抑制劑已顯示出在含有野生型突變ras的細胞中可阻斷ras活化，因而作為抗增生劑。Ras 致癌基因的抑制討論於Scharovsky, *et al* .(2000), *Journal of Biomedical Science.* 7(4)292-8；Ashby, M.N. (1998), *Current Opinion in Lipidology*. 9 (2) 99 –

102；以及*BioChim. Biophys. Acta*, (1989) 1423(3):19-30。

【0177】 如前文所提及的，受體激酶配體結合的抗體拮抗劑也可以用作訊息傳遞抑制劑。這組訊息傳遞途徑抑制劑包括受體酪胺酸激酶的胞外配體結合結構域的人源化抗體的應用。例如Imclone C225EGFR專一性抗體(請見Green, *et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev.*,(2000), 26(4), 269-286)；Herceptin® erbB2抗體(請見"Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases", *Breast Cancer Res.*, 2000, 2(3), 176-183)；以及2CB VEGFR2 專一性抗體(請見Brekken, et al., "Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice", *Cancer Res.*(2000) 60, 5117-5124)。

【0178】 包括非受體激酶血管生成抑制劑的抗血管生成藥物也是適用的。抗血管生成藥物例如抑制血管內皮生長因子的效應的那些藥物(例如抗血管內皮細胞生長因子抗體貝伐珠單抗(bevacizumab)[Avastin™]，和經由其它機制作用的化合物(例如利諾胺(linomide)、整聯蛋白αvβ3功能的抑制劑、內皮抑素及血管抑制素)；

【0179】 免疫治療試劑：用於免疫治療方案的藥物，也可以用於與式(I)化合物的組合。免疫治療方法包括例如增加患者腫瘤細胞的免疫原性(immunogenecity)的體外和體內方法，例如以細胞介素如白介素2、白介素4或粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子進行轉染，降低T-細胞無反應性的方法，使用經轉染的免疫細胞(例如經細胞介素轉染的樹突細胞)的方法，使用經細胞介素轉染的腫瘤細胞系的方法和使用抗遺傳型抗體的方法。

【0180】 促細胞凋亡(proapoptotoc)試劑：用於促細胞凋亡治療方案的藥物(例如，bcl-2反義寡核苷酸)也可以用於本發明組合物中。

【0181】 細胞週期訊息抑制劑：細胞週期訊息抑制劑可抑制涉及控制細胞週期的分子。被稱為依賴於細胞週期蛋白的激酶(CDKs)之蛋白激酶家

族，與稱為細胞週期蛋白家族的蛋白質相互作用，而控制了真核細胞週期的發展。不同細胞週期蛋白/CDK複合物的配位活化和失活，為細胞週期的正常發展所必須的。若干種細胞週期信號抑制劑正在研發中。例如，依賴細胞週期蛋白的激酶的實例，包括CDK2、CDK4與CDK6與其抑制劑記載於，例如Rosania, et al., *Exp. Opin. Ther. Patents*(2000) 10(2):215-230。

【0182】 在一實施例中，本發明組合物包含抗OX40 ABP或抗體與TLR4調節子，以及至少一抗癌試劑，選自於抗微管劑、鉑配位複合物、烷基化劑、抗生素、拓撲異構酶II抑制劑、抗代謝物、拓撲異構酶I抑制劑、激素和激素類似物、訊息傳遞路徑抑製劑、非受體酪胺酸MEK生成抑制劑、免疫治療劑、促細胞凋亡劑和細胞週期訊息抑制劑。

【0183】 在一實施例中，本發明組合物包含抗OX40 ABP或抗體與TLR4調節子，以及至少一抗癌試劑，其為抗微管試劑，選自於二萜類化合物和長春花生物鹼。

【0184】 在其他實施例中，該抗癌試劑為二萜類化合物。

【0185】 在其他實施例中，該抗癌試劑為長春花生物鹼。

【0186】 在一實施例中，本發明組合物包含抗OX40 ABP或抗體與TLR4調節子，以及至少一抗癌試劑，其為鉑配位錯合物。

【0187】 在其他實施例中，該抗癌試劑為紫杉醇、卡鉑，和長春瑞濱(vinorelbine)。

【0188】 在一實施例中，本發明組合物包含抗OX40 ABP或抗體與TLR4調節子，以及至少一抗癌試劑，其為訊息傳遞路徑抑制劑。

【0189】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為受體生長因子激酶抑制劑、VEGFR2、TIE2、PDGFR、BTK、erbB2、EGFr、IGFR-1、TrkA、TrkB、TrkC或c-fms。

【0190】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑rafk、akt或PKC-ζ。

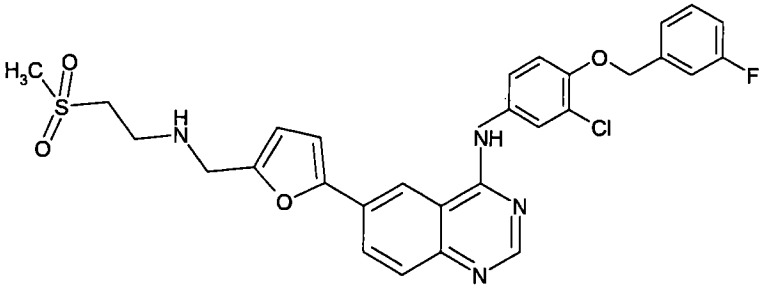
【0191】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為非-受體酪胺酸激酶抑制劑，選自於激酶之src家族。

【0192】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為c-src之抑制劑。

【0193】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為Ras致癌基因之抑制劑，選自於法尼基(farnesyl)轉移酶、香葉草基-香葉草基轉移酶之抑制劑。

【0194】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑，選自於由PI3K組成之族群。

【0195】 在其他實施例中，該訊息傳遞路徑抑制劑為雙重EGFr/erbB2抑制劑，例如N-{3-氯-4-[(3-氟化苄基)氧基]苯基}-6-[5-({[2-(甲烷磺基)乙基]胺基}甲基)-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺(下列結構)：



【0196】 在一實施例中，本發明組合物包含式I化合物或鹽類或媒合物，與至少一抗癌試劑，其為細胞週期訊息抑制劑。

【0197】 在其他實施例中，細胞週期訊息抑制劑為CDK2、CDK4或CDK6之抑制劑。

【0198】 在一實施例中，本發明方法與用途中之哺乳動物為人類。

【0199】 如上所述，治療有效量之本發明組合物(抗OX40 ABP或抗體與TLR4調節子)，係投予至人體。一般而言，本發明投予試劑之治療有效量取決於因素包括如個體之年齡和體重、需要治療的精確條件、病症的嚴重程度、製劑的性質，和投藥途徑。最終，治療有效量將由主治醫師判斷。

【0200】 下列範例僅用於說明，而非限制本發明範疇。

實施例

實施例1：OX86單一療法治療CT-26結腸癌同基因小鼠模型

【0201】 CT26小鼠結腸癌(CT26.WT; ATCC #CRL-2638)細胞株得自ATCC。其為N-亞硝基-N-甲基胺基甲酸乙酯(NNMU)誘發，為技術上已知之未分化結腸癌。例如，其描述於：Wang M, et al. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. J. Immunol. 154：4685-4692, 1995 (PubMed：7722321)。大鼠IgG1得自Bioxcell。OX86(融合瘤134)細胞得自European Cell Culture collection，並由Harlan製造；OX86為抗OX40 單株抗體群名稱，用於嚙齒動物；其為嚙齒動物抗體，可結合至嚙齒動物OX40，如小鼠OX40(受體)。

【0202】 OX86與大鼠IgG1係以經稀釋之DPBS稀釋。

【0203】 用於製備腫瘤細胞，CT-26(小鼠結腸癌細胞)冷凍管(-140°C)，得自ATCC (cat# CRL-2638, lot# 59227052)係解凍並培養於基礎RPMI(具10% FBS)培養液中一整週。

【0204】 CT-26細胞(第12代)係收獲自完整培養液培養瓶中。細胞離心並再懸浮於RPMI(不含FBS)，此步驟重複3次。細胞密度與存活率經台盼藍(trypan blue)排除法確認。之係細胞稀釋至希望之密度($5x10^5$ 細胞每毫升)並保存於冰上。

【0205】 遞增劑量之OX40單株抗體(mAb) OX86係評估其降低腫瘤生長之效率。在第0天，動物稱重並在右後肢接種$0.5x10^5$ CT26腫瘤細胞每隻小鼠。總共有130隻小鼠接種腫瘤細胞- 假設有30%失敗率(在試驗開始時太大或太小)，目標為n=10每組。在接種腫瘤細胞之後，腫瘤生長與總體重每週測量3次，在試驗期間。在第10或11天進行隨機分組，當平均腫瘤體積接近100立方毫米。在隨機分組開始之日，動物經腹膜內投予OX86 mAb或

大鼠IgG1同基因型體，每二週一次，共投予6次。小鼠維持於試驗中，直到二次連續測量皆得腫瘤達到>2000立方毫米，小鼠因其他理由(即重量損失>20%、腫瘤潰瘍等)自試驗中移除，或直至試驗結束日。安樂死後，腫瘤被移出，並進行分解，進行流式分析及/或IHC分析之FFPE。

治療	投予	小鼠數量
組1：每隻小鼠0.5x10^5個細胞	每隻小鼠400微克大鼠IgG1	10-13
組2：每隻小鼠0.5x10^5個細胞	每隻小鼠400微克OX86	10-13
組3：每隻小鼠0.5x10^5個細胞	每隻小鼠200微克OX86	10-13
組4：每隻小鼠0.5x10^5個細胞	每隻小鼠100微克OX86	10-13
組5：每隻小鼠0.5x10^5個細胞	每隻小鼠50微克OX86	10-13

第0天：皮下接種腫瘤細胞

第1、4、6、8天：動物稱重並檢查腫瘤，若有的話，測量腫瘤。

隨機分組日(約第10日)：動物隨機分組，並置於適當組別之籠中

投予，每二週一次至試驗結束：動物經腹膜內投予OX86或

抗大鼠IgG1，其中上述劑量係以每隻小鼠為基準。

測量，每三週一次，至試驗結束：動物稱重並測量腫瘤

【0206】 來自約10隻動物之平均腫瘤重量係平均。誤差棒顯示SEM分析。依據下列計算P值：P值檢測虛無假設，其存活曲線在總族群中皆相等。換言之，虛無假設為該治療並不會改變存活率。經由Stepdown Bonferroni法調整原始P值，以進行多重比較。

【0207】 上述流程用於產生圖1B之結果，各小鼠之結果見於圖4。這些圖顯示接種CT-26細胞並以大鼠IgG1處理之小鼠，會發展出如預期成長之腫瘤，其中當與大鼠IgG1對照組相較時，投予OX40單株抗體(mAb)OX86會導致腫瘤生長之明顯抑制，並增加存活率。

實施例2：以TLR4治療之CT-26試驗結果(CRX-527)

【0208】 加入TLR4調節子如CRX-527至上述OX40單一療法流程

中，用於試驗TLR4單一療法，以及抗mOX40免疫療法與TLR4調節子之組合。

	治療	投予(每隻小鼠)	小鼠數量
組0：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	載劑	10-13
組a：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	4微克CRX-527	10-13
組b：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	20微克CRX-527	10-13
組c：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	100微克CRX-527	10-13

第0天：皮下接種腫瘤細胞

第1、4、6、8天：動物稱重並檢查腫瘤，若有的話，測量腫瘤。

隨機分組日(約第10日)：動物隨機分組，並置於適當組別之籠中投予，每二週一次至試驗結束：動物經腹膜內投予TLR化合物CRX-527，劑量如上所示(每隻小鼠)，或載劑。

測量，每三週一次，至試驗結束：動物稱重並測量腫瘤。

【0209】 上述流程用於產生圖1A與圖2-6之結果，於所示劑量。幾乎每個案例中，於右後肢接種有0.5x10^5 CT-26結腸直腸腫瘤細胞之Balb/c小鼠發展出腫瘤，當僅經腹膜內載劑(2%甘油)時，並如預期進展。當與經載劑治療之動物相較時，TLR 4促效劑CRX-527(圖2-5)與CRX-601(圖6)以劑量依賴性抑制腫瘤生長。劑量依賴性亦於該模式之存活中觀察到。

實施例3：以OX40(即OX-86，抗嚙齒動物OX40受體之抗體)與CRX-527組合治療

【0210】 進行下列治療行程：

	投予	治療1	治療2	小鼠數量
組1：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	大鼠IgG1	藥物載劑	10-13
組2：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	50微克OX86	藥物載劑	10-13
組3：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	大鼠IgG1	5微克CRX-527	10-13
組4：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	大鼠IgG1	25微克CRX-527	10-13
組5：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	50微克OX86	5微克CRX-527	10-13
組6：	每隻小鼠0.5x10^5個細胞	50微克OX86	25微克CRX-527	10-13

第0天：皮下接種腫瘤細胞

第1、4、6、8天：動物稱重並檢查腫瘤，若有的話，測量腫瘤。

試驗參與日(約第10天)：動物隨機分組並接受治療1。

參與後每二週：參與日開始，小鼠接受經腹膜內投予，每二週一次，共6次投予。

每三週一次，至試驗結束：動物稱重並測量腫瘤。

【0211】 當OX86治療與TLR4調節子治療(CRX-527)組合時，與單獨治療相較，小鼠表現出較高的腫瘤負荷減少且存活較久。

實施例4：單一療法以及抗mOX40R抗體與式I TLR4標靶分子組合治療

【0212】 小鼠投予OX40抗體；式1化合物(包括式Ia化合物、CRX-527、CRX-547與CRX-601(TLR4 促效劑)，或二者之組合。每一療法皆具有明顯的抗腫瘤活性。

【0213】 至少有兩個重大發現。首先，在小鼠中，抗OX40R或抗OX40抗體與TLR4促效劑之組合，每一者皆可延遲已建立之CT-26腫瘤之生長，相對於未經治療之對照組。其次，在小鼠中，在TLR4促效劑與抗OX40R抗體組合中，與單一療法相較，觀察到明顯的抗腫瘤效果。

實施例5：以OX40R ABS(即抗mOX40受體抗體株OX-86，嚙齒動物OX40受體之抗體)與CRX-601組合治療

材料與方法

體內抗腫瘤效果試驗

【0214】 TLR4促效劑(CRX601)之體內抗腫瘤效果試驗，係於鼠CT-26結腸癌同基因型實體瘤模式評估，作為單一療法，並與大鼠抗小鼠OX40抗體株OX86組合。七至八週大雌Balb/c小鼠(BALB/cAnNCrl, Charles River)用於這些試驗中。鼠CT-26結腸癌細胞(ATCC catalog number CRL-2638 lot# 59227052)係培養於RPMI生長培養液中，補充有10%胎牛血清(FBS)，潮濕之37°C培養箱中，具5% CO_2。CT-26細胞以對數成長，由組

織培養瓶中收穫，並離心5分鐘，於450xg，4°C，10分鐘，沉澱出細胞。上清液丟棄，細胞以不含鈣與鎂之冰磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)清洗，再次離心5分鐘，於450xg，4°C，10分鐘，沉澱出細胞。細胞再懸浮於不含FBS之無菌RPMI培養液中，並調整至細胞濃度500,000細胞/毫升。100微升之細胞儲存液經皮下植入至每隻Balb/c小鼠之右腹側。10或11日後，當平均腫瘤大小達到約100立方毫米，小鼠根據腫瘤大小和第一治療劑量，隨機分組為試驗組群。該TLR4促效劑(CRX601)或載劑係經由全身性經靜脈內或直接經腫瘤內投予，依據指示。用於經靜脈內與經腫瘤內投予之CRX-601載劑為0.5%，依據指示。就CRX-601微脂體經腫瘤內投予而言，係使用GSK Lot #1783-157-B製備之DOPC/CHOL微脂體。大鼠抗小鼠OX40受體抗體(OX86株)(經實驗室內表現並純化自大鼠融合瘤 Grits ID 50776, BP232 2013)或大鼠IgG1同基因型對照組抗體(BioXCell catalog # BE0088)，係經由腹腔內注射投予，每週二次，總共6次投予。卡尺測量每週三次，以評估腫瘤的生長，腫瘤<2,000立方毫米的小鼠留在試驗中30至約至多115天。具連續兩次測量腫瘤 >2,000 立方毫米之小鼠，或腫瘤形成開式性潰瘍之小鼠，自試驗中移除。腫瘤體積使用公式(0.52)x(長度)x(寬度^2)計算。在試驗6與7中，無腫瘤小鼠CT-26腫瘤再激發，如上所述，在原始接種位置對側腹部，並監測腫瘤生長，如上所述。所有試驗皆依據GSK Policy on the Care, Welfare and Treatment of Laboratory Animals導入，並由 Institutional Animal Care and Use Committee at GSK審查。

免疫分型與細胞介素分析

【0215】 腫瘤、血液與組織皆收獲自CT-26小鼠，於第一CRX-601投予後第0、1與8日。小鼠白血球與分解出之腫瘤單細胞，以表面或細胞內染色抗體進行新鮮染色，以進行多重顏色流式細胞分析，進行免疫分型(immunephenotyping)。進行多細胞介素分析，使用來自同一試驗之小鼠血漿樣本。

統計分析

【0216】 就試驗1-4，為了決定腫瘤生長抑制之顯著性，在第一次投予後11日(試驗1)、15日(試驗2與3)，或19日(試驗4)之腫瘤體積，係與不同治療組別相較。在分析之前，腫瘤體積進行自然對數轉換，由於不同治療組別中之變數不相等。配對比較後，對該對數轉換數據進行ANOVA。使用SAS 9.3與R 3.0.2分析軟體。Kaplan-Meier (KM)法係用於預測不同治療組之存活機率，於特定時間。存活分析事件為腫瘤體積2000立方毫米或腫瘤潰瘍，首度發生。到達截止體積之確切時間係以擬合腫瘤體積對數與兩次觀察天數之線性回歸直線而預測，第一次觀察為超過截止體積，另一次則為剛超過截止體積。計算至終點的中間時間，以及其對應之95%信賴區間。不論任兩組間的KM存活曲線是否有統計學差異性，之後皆以對數-排名測試檢測。粗p值，以及偽發現率(FDR)調整之p值，由存活分析之天數對事件比較值而得，以及治療組之間於指定天數之對數轉換腫瘤體積比較而決定。具FDR調整p值≤0.05者判定為具統計學上之顯著性。

【0217】 就試驗6與7，為了決定腫瘤生長抑制之顯著性，在第一次投予後12日之腫瘤體積，係與不同治療組別相較。治療係以標準ANOVA法進行比較，在進行多樣性FDR調整之後。反應為體積之平方根，為了同方差(方差相等)原因(equal variance)。進行Kaplan-Meier (KM)法，以預測不同治療組的存活機率，於特定時間。就這些存活率分析，“死亡”代表超過腫瘤體積門檻(2000立方毫米)。“存活”代表未“死亡”小鼠之比例，“存活時間” 代表直至“死亡”之天數。若小鼠在二測量日之間超過門檻體積，則 “死亡”日以線性插值預估。若小鼠超過門檻體積一次以上，則使用第一次超過值。治療係以標準對數排名試驗比較二組治療。對數排名p值係使用多樣性FDR(偽發現率)法調整。顯著性定義為FDR <= 0.05。所有計算與圖表係使用R軟體，3.2.3版本完成。

結果

【0218】 係導入六個試驗(試驗1至4與試驗6至7)，以評估經CRX601與大鼠抗小鼠OX40受體抗體殖株OX86治療，分別單獨治療或組合治療，之腫瘤大小與存活時間。導入額外一試驗(以下試驗5)，以評估經CRX601 與大鼠抗小鼠OX40受體抗體株OX86，單獨或組合治療組之細胞介素釋放與T細胞活化。

試驗1

【0219】 為了決定經腫瘤內投予CRX-601單一療法之活性，小鼠係種入 $5x10^4$ CT-26細胞，並隨機分為下列10組，當腫瘤大小達到約100立方毫米，如材料與方法中所述。

組1：載劑經腫瘤內投予，每週二次，共6次投予

組2：CRX-601 0.1微克/小鼠經腫瘤內投予，每週二次，共6次投予

組3：CRX-601 1微克/小鼠經腫瘤內投予，每週二次，共6次投予

組4：CRX-601 10微克/小鼠經腫瘤內投予，每週二次，共6次投予

組5：CRX-601 50微克/小鼠單次投予

【0220】 藉由經腫瘤內投予，劑量依賴性抗腫瘤活性(以腫瘤生長抑制對時間測量)係於CT-26 同基因型小鼠腫瘤模式中，TLR4促效劑CRX-601觀察到。10微克與50微克投予之小鼠，在開始投予後11天，腫瘤生長抑制顯示出統計學上之顯著性(*p值≤0.05)，與載劑相較。結果顯示於圖18。

【0221】 在此試驗中，以TLR4促效劑CRX-601治療之小鼠顯示出存活時間明顯增加。投予50微克之小鼠在存活增加上，顯示出統計學上之顯著性(*p值≤0.05)，與載劑相較，在 CT26腫瘤細胞接種後42天，當試驗結束時。在此日，只有50微克與10微克CRX-601組的小鼠留在試驗中。50微克 組的4隻小鼠中，有3隻無腫瘤，第4隻小鼠顯示出腫瘤體積為854.19立方毫米。留在10微克組的唯一小鼠無腫瘤(請見圖19)。

試驗2

【0222】 為了決定CRX-601經靜脈內投予單一療法的活性，小鼠接種

$5x10^4$ CT-26 細胞，並隨機分為下列10組，當腫瘤大小達到約100立方毫米，如材料與方法中所述。

組1：載劑經靜脈內投予，每週二次，共6次投予

組2：CRX-601 1微克/小鼠經靜脈內投予，每週二次，共6次投予

組3：CRX-601 10微克/小鼠經靜脈內投予，每週二次，共6次投予

組4：CRX-601 100微克/小鼠，單次投予

【0223】 藉由經靜脈內投予，劑量依賴性抗腫瘤活性(以腫瘤生長抑制對時間測量)係於CT-26同基因型小鼠腫瘤模式中，TLR4促效劑CRX-601觀察到。10微克與100微克投予之小鼠，在開始投予後15天，腫瘤生長抑制顯示出統計學上之顯著性(*p值≤0.05)，與載劑相較(請見圖20)。

【0224】 在此CT-26同基因型小鼠腫瘤模式中，以TLR4促效劑CRX-601治療之小鼠顯示出存活時間，在統計學上明顯增加，與載劑相較。投予100微克之小鼠的存活在統計學上明顯增加(*p值≤0.05)，與載劑相較，在CT26腫瘤細胞接種後32天，當試驗結束時。留在此組的3隻小鼠中，有1隻無腫瘤，另二隻小鼠顯示出腫瘤體積為1500.49與962.61立方毫米。留在10微克組的唯一小鼠腫瘤體積為188.0立方毫米(請見圖21)。

試驗3

【0225】 為了決定CRX-601單獨投予，以及與抗OX40組合投予的活性，小鼠接種$5x10^4$個CT-26細胞，並隨機分為下列10組，當腫瘤大小達到約100立方毫米，如材料與方法中所述。

組1：載劑經靜脈內投予，每週一次，共3次投予

組2：大鼠IgG1 10微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組3：OX86 25微克/小鼠，每週二次投予，，共6次投予

組4：CRX-601 10微克/小鼠，經靜脈內投予，共3次投予

組5：CRX-601 25微克/小鼠，經靜脈內投予，每週一次，共3次投予

組6：CRX-601 10微克/小鼠，經靜脈內投予，每週一次，共3次投予

+OX86 25微克/小鼠，經靜脈內投予，每週二次，共6次投予

組7：CRX-601 25微克/小鼠，經靜脈內投予，每週一次，共3次投予 +OX86 25微克/小鼠，經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

【0226】 抗腫瘤活性係於25微克/小鼠之大鼠抗小鼠OX40受體抗體(植株OX-86)組評估(以腫瘤生長抑制對時間測量)，每週經靜脈內投予二次，共6次投予、10微克或25微克/小鼠之TLR4 促效劑CRX-601經靜脈內投予，每週一次，共3次投予，以及二者之組合，在此CT-26同基因型小鼠腫瘤模式中。次佳之單一療法CRX-601投予10微克/小鼠或25微克/小鼠，每週一次，並未顯示統計學上明顯之腫瘤生長抑制，當單獨投予時，與載劑相較，且OX86 25微克/小鼠亦無，與大鼠IgG1相較。然而，CRX601經靜脈內投予，每週一次，10微克或25微克/小鼠，共3次投予，而與25微克/小鼠OX86組合投予，每週二次，共6次投予，其腫瘤生長抑制顯示出統計學上之顯著性(*p值≤0.05)，在開始投予後15天，與載劑及大鼠IgG1對照組相較，並與CRX601及OX86單一療法相較(請見圖22)。

【0227】 在此CT-26同基因型小鼠腫瘤模式試驗中，存活優勢亦於以25微克/小鼠之大鼠抗小鼠OX40受體抗體(植株OX-86)治療之小鼠中測定，經靜脈內投予每週二次，共6次投予，10微克或25微克之TLR4促效劑CRX-601經靜脈內投予 每週一次，共3次投予，以及二者之組合。在CT-26腫瘤細胞接種後106天，當試驗結束時，CRX-601 10微克與25微克/小鼠經靜脈內投予 每週一次，共3次投予，與25微克/小鼠OX86投予每週二次，共6次投予組合，顯示在存活上有統計顯著增加(*p值≤0.05)，與載劑組及大鼠IgG1對照組二者相較，以及與OX86與CRX-601單一療法相較。留在CRX-601 25微克/小鼠+OX86組的3隻小鼠無腫瘤，而在CRX-601 10微克/小鼠+OX86組的1隻小鼠無腫瘤(請見圖23)。

試驗4

【0228】 重複試驗3，使用單獨25微克/小鼠之CRX-601，以及與抗

OX40組合。小鼠接種5x10^4 CT-26 細胞，並隨機分為下列10組，當腫瘤大小達到約100立方毫米，如材料與方法中所述。

組1：載劑經靜脈內投予每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組2：CRX-601 25微克/小鼠經靜脈內投予，每週一次，共3次投予。

組3：載劑經靜脈內投予每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組4：CRX-601 25微克/小鼠經靜脈內投予每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組5：CRX-601 25微克/小鼠經靜脈內投予每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

【0229】 抗腫瘤活性係於25微克/小鼠之大鼠抗小鼠OX40 受體抗體(植株OX-86)組觀察(以腫瘤生長抑制對時間測量)，每週經靜脈內投予二次，共6次投予，或25微克/小鼠之TLR4 促效劑 CRX-601經靜脈內投予 每週一次，共3次投予，以及二者之組合，在CT-26同基因型小鼠腫瘤模式中。CRX601經靜脈內投予每週一次，以25微克/小鼠，共投予3次，與25微克/小鼠 OX86 投予每週二次，共6次投予組合，顯示出腫瘤生長抑制之統計學顯著性(*p值≤0.05)，與CRX601及OX86單一療法相較(請見圖24)。

【0230】 存活曲線係於以25微克/小鼠之大鼠抗小鼠OX40受體抗體(植株OX-86)、經靜脈內投予每週二次，共6次投予，或25微克/小鼠之TLR4促效劑CRX-601經靜脈內投予每週一次，共3次投予，以及二者之組合，在CT-26同基因型小鼠腫瘤模式試驗中，治療之小鼠中測量。 CRX601 25微克/小鼠經靜脈內投予一次/週，共3次投予，與25微克/小鼠 OX86投予二次/週共6次投予組合，顯示出存活之統計學顯著性(*p值≤0.05)，與單一療法相較。此統計分析於腫瘤接種後64天導入，所有留下的小鼠皆無腫瘤。監測這些小鼠，至第111天試驗結束。在此日，組5 CRX-601 25微克/小鼠+OX86

之7隻小鼠維持無腫瘤，組3 CRX-601 25微克/小鼠+大鼠IgG1中的2隻小鼠維持無腫瘤，以及組4載劑+OX86 的1隻小鼠維持無腫瘤(請見圖25)。

試驗5

【0231】 結果為每組5隻動物之平均值。

【0232】 白血球與免疫激活係以10微克之TLR4促效劑CRX-601、25微克之大鼠抗小鼠OX40受體抗體(殖株OX-86)，以及二者之組合治療，並於投予後8日，在CT-26同基因型小鼠結腸癌腫瘤模式中評估。腫瘤浸潤白血球之明顯增加在以CRX-601與抗OX86組合治療之小鼠中觀察到。在循環CD4 T細胞中，T細胞活化標記物CD25之協同性增加，係於以CRX-601及抗OX86組合治療之小鼠中觀察到。在循環CD4 T細胞中，T細胞活化相關標記物CTLA4、PD1與ICOS之協同性增加，係於以CRX-601及抗OX86組合治療之小鼠中觀察到。結果顯示於圖26 A-C。

【0233】 免疫活化細胞介素TNFα與IL-12p70之增加係於以10微克TLR4促效劑CRX-601、大鼠抗mOX40R抗體(OX-86)，以及二者之組合治療，在CT-26同基因型小鼠結腸癌腫瘤模式中，於投予後1與8日測量。IL-12p70 僅於投予後8日偵測到，如圖27B所示。結果顯示於圖27 A-B。

試驗6

【0234】 為了比較CRX-601單獨以及與抗OX40組合之活性，當CRX-601於0.5%甘油/4%葡萄糖載劑中，經靜脈內(IV)或經腫瘤內(IT)投予時，小鼠係接種$5x10^4$個CT-26細胞，並隨機分為下列10組，當腫瘤大小達到約100立方毫米，如材料與方法中所述。

組1：載劑經靜脈內投予每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予。

組2：CRX-601 25微克/小鼠經靜脈內投予每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組3：OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組4：CRX-601 25微克/小鼠經靜脈內投予每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組5：載劑經腫瘤內投予每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組6：CRX-601 25微克/小鼠經腫瘤內投予每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組7：CRX-601 25微克/小鼠經腫瘤內投予每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

【0235】 係評估療組的抗腫瘤活性(以腫瘤生長抑制對時間測量)。次佳之單一療法CRX-601投予25微克/小鼠，並未顯示統計學上明顯之腫瘤生長抑制，當經靜脈內投予(組2)或經腫瘤內投予(組6)，與對應之對照組(分別為組1與組5)相較。單一療法OX86 25微克/小鼠投予並未顯示統計學顯著性之腫瘤生長抑制，與對照組1與5相較。然而，CRX601 25微克/小鼠靜脈投予與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組合(組4)，顯示出統計學顯著性之腫瘤生長抑制(*p值≤0.05)，在開始投予後12天，與對照組1及OX86單一療法組3相較。CRX601 25微克/小鼠經腫瘤內投予與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組合(組7)，亦顯示統計學顯著性之腫瘤生長抑制(*p值≤0.05)，在開始投予後12天，與對照組5及OX86單一療法組3相較。CRX601 25微克/小鼠經靜脈內投予(組4)或經腫瘤內投予(組7)，與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組並無統計學顯著性之腫瘤生長抑制，與CRX601單一療法組2或組6相較，於此試驗中(請見圖28與29)。

【0236】 在此CT-26同基因型小鼠腫瘤模式試驗中，亦測定存活優勢。第一次投予後68天，CRX601 25微克/小鼠經靜脈內投予(組4)或經腫瘤內投予(組7)與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組合，顯示具統計學顯著性之存活增加(*p值≤0.05)，分別與對照組1或組5相較。CRX-601經靜脈內投予與OX86經腹膜內投予組合(組4)，會導致10隻小鼠中有6隻無腫瘤，CRX-601

經腫瘤內投予與OX86經腹膜內投予組合(組7)，會導致10隻小鼠中有3隻無腫瘤。單一療法組並未顯示具統計學顯著性之存活增加，與對照組相較(請見圖30與31)。空白對照組以及完全退化無腫瘤小鼠，在第68天再次以CT26腫瘤細胞刺激。預期在空白對照組小鼠中會有CT26腫瘤生長，但在治療組小鼠則腫瘤被排斥，無腫瘤生長。此表示有持久抗腫瘤記憶免疫性，由於CRX-601或CRX-601與OX86治療之組合所致(請見圖32)。OX86單一療法組3的2隻小鼠，在第68天具有腫瘤體積27.86與1576.27立方毫米，且未接受再刺激。

試驗7

【0237】 為了比較單獨CRX-601以及與抗OX40組合之活性，當CRX-601(IV)使用0.5%甘油/4%葡萄糖載劑經靜脈內投予，或使用DOPC/CHOL微脂體調配物經腫瘤內投予(IT)，小鼠接種$5x10^4$個CT-26細胞並隨機分為下列10組，當腫瘤大小達到約 100 立方毫米，如材料與方法中所述。

組 1：載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)經靜脈內投予，每週一次，共 3 次投予+大鼠 IgG1 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組 2:CRX-601 25 微克/小鼠(於 0.5%甘油/4%葡萄糖中)經靜脈內投予，每週一次，共 3 次投予+大鼠 IgG1 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組 3：載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)經靜脈內投予，每週一次，共 3 次投予+OX86 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組 4：CRX-601 25 微克/小鼠(溶於 0.5%甘油/4%葡萄糖中)經靜脈內投予，每週一次，共 3 次投予+OX86 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組 5：載劑(DOPC/CHOL 微脂體)經腹膜內投予，每週一次，共 3 次投予+大鼠 IgG1 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組 6：載劑(DOPC/CHOL 微脂體)經腹膜內投予，每週一次，共 3 次投予+OX86 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組 7：CRX-601 25 微克/小鼠(溶於 DOPC/CHOL 微脂體中)經腹膜內投予，每週一次，共 3 次投予+大鼠 IgG1 25 微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共 6 次投予

組8：CRX-601 25微克/小鼠(溶於DOPC/CHOL微脂體中)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

【0238】 係於開始投予後12天評估治療組之抗腫瘤活性(以腫瘤生長抑制對時間測量)。次佳之單一療法CRX-601投予25微克/小鼠，顯示統計學上明顯之腫瘤生長抑制，當以經靜脈內投予(組2)或經腹膜內投予(組7，微脂體 調配物)與對應之對照組(分別為組1與組5)相較。單一療法OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組3與組7亦顯示統計學顯著性之腫瘤生長抑制(*p值≤0.05)與對照組1與5相較。CRX601 25微克/小鼠經靜脈內投予與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組合(組4)，顯示統計學顯著性之腫瘤生長抑制(*p值≤0.05)與對照組1與OX86單一療法組3相較。以DOPC/CHOL微脂體調配物之CRX601 25微克/小鼠經腹膜內投予與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組合(組8)，亦顯示統計學顯著性之腫瘤生長抑制(*p值≤0.05)，與對照組5相較。CRX601 25微克/小鼠經靜脈內投予(組4)或經腹膜內投予(組8)與OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予組合，並無腫瘤生長抑制統計學顯著性，與CRX601單一療法組2或組7相較，於此試驗中，在第12日(請見圖33與34)。

【0239】 在此CT-26同基因型小鼠腫瘤模式試驗中，在第一次投予後80天，亦測定存活優勢。CRX601單一療法經靜脈內投予(組2)，或經靜脈內投予與OX86經腹膜內投予(組4)組合，與對照組1相較，顯示具統計學顯著性之存活增加(*p值≤0.05)。組2與4，在10隻小鼠中有5隻皆顯示完全腫瘤退化(請見圖35)。CRX601單一療法，以DOPC/CHOL微脂體調配物經腹膜內投

予(組7)，以及OX86單一療法微脂體經腹膜內投予對照組(組6)，與對照組5相較，顯示具統計學顯著性之存活增加(*p值≤0.05)。經腹膜內投予CRX601之DOPC/CHOL微脂體調配物與OX86經腹膜內投予組合(組8)，與對照組5相較，以及與CRX601經腹膜內投予(組7)及OX86(組6)單一療法對照組相較，顯示具統計學顯著性之存活增加(*p值≤0.05)。經腹膜內投予CRX601 DOPC/CHOL微脂體與OX86經腹膜內投予組合，與經腹膜內投予單一療法對照組6與7的3隻與2隻相較，10隻小鼠中有9隻完全退化且無腫瘤。因此，CRX601微脂體調配物經腹膜內投予與OX86組合觀察到協同作用，與經腹膜內投予對照組單一治療組6與7相較(請見圖36)。空白對照組與完全退化無腫瘤小鼠於第80天以CT26腫瘤細胞再激發。在空白對照組小鼠中，CT26腫瘤如預期生長，但在治療組小鼠則腫瘤被排斥，無腫瘤生長。此表示有持久抗腫瘤記憶性，由於CRX-601或CRX-601與OX86治療之組合所致(請見圖37)。此無腫瘤生長表示有持久抗腫瘤記憶性，由於CRX-601或CRX-601與OX86治療之組合所致(請見圖37)。

試驗8

【0240】 伴隨遠隔效應(abscopal effect)係描述為在局部腫瘤療後，遠端的腫瘤退化。為了評估伴隨遠隔效應，小鼠接種$5x10^4$個CT-26細胞於左腹側，並如材料與方法中所述，於右腹側接種$5x10^4$個CT-26細胞，用於單一腫瘤接種。因此，在此試驗中，每一小鼠具有兩個腫瘤，一個在右腹側，另一個在左腹側。小鼠隨機分為以下10組，當右腹側腫瘤大小達約100立方毫米，且左腹側腫瘤大小類似時。為了決定CRX-601單獨以及與抗OX40組合之伴隨遠隔效應，CRX-601於左腹側經腫瘤內投予(IT)，僅使用DOPC/CHOL微脂體調配物或0.5%甘油/4%葡萄糖調配物。監測右側與左側兩側之腫瘤大小。此外，單獨CRX-601經靜脈內投予(IV)，使用0.5%甘油/4%葡萄糖載劑，以及與抗OX40組合，作為全身性活性之對照組(組7)。

組1：載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)經靜脈內投予，每週一次，共3次投予

+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組2：載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組3：CRX-601 25微克/小鼠(溶於0.5%甘油/4%葡萄糖中)經靜脈內投予，每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組4：CRX-601 25微克/小鼠(溶於0.5%甘油/4%葡萄糖中)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組5：載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)經靜脈內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組6：載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組7：CRX-601 25微克/小鼠(溶於0.5%甘油/4%葡萄糖中)經靜脈內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組8：CRX-601 25微克/小鼠(溶於0.5%甘油/4%葡萄糖中)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組9：載劑(DOPC/CHOL微脂體)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組10：載劑(DOPC/CHOL微脂體)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組11：CRX-601 25微克/小鼠(溶於DOPC/CHOL微脂體)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+大鼠IgG1 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

組12：CRX-601 25微克/小鼠(於DOPC/CHOL微脂體)經腹膜內投予每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予

【0241】 係評估治療組之抗腫瘤活性(以腫瘤生長抑制對時間測量)。試驗一側或二側的腫瘤體積達2,000立方毫米，該小鼠便移出試驗。在第一次投予後60日，所有留在試驗中的小鼠完全無腫瘤，決定伴隨遠隔效應與存活優勢。就全身性投予組合物組7，CRX-601 25微克/小鼠(於0.5%甘油/4%葡萄糖)經靜脈內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予，10隻小鼠中有7隻無腫瘤，右側與左側皆然(圖38)。就組合物組8，CRX-601 25微克/小鼠(於0.5%甘油/4%葡萄糖中)經腹膜內投予，每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予，10隻小鼠中有3隻顯示二側腫瘤完全退化，即使只有左腹側腫瘤接受經腹膜內投予注射(圖39)。就組合物組12，CRX-601 25微克/小鼠(於DOPC/CHOL微脂體)經腹膜內投予每週一次，共3次投予+OX86 25微克/小鼠經腹膜內投予，每週二次，共6次投予，10隻小鼠中有5隻顯示二側腫瘤完全退化，即使只有左腹側腫瘤接受經腹膜內投予注射(圖40)。因此，CRX-601調配物經腹膜內投予與OX86經腹膜內投予組合，會呈現出伴隨遠隔效應(組8與12)。局部左側腹腫瘤之經腫瘤內會產生遠端右側腫瘤退化。在三組合物組7、8與12中，其存活優勢無統計差異性。 組7在存活上呈現出統計顯著性增加，與所有載劑與同基因型對照組相較，且與所有CRX-601與OX86單一療法組相較(***p值≤0.006)。組12之組合物顯示在存活上呈現出統計顯著性增加，與組10經腫瘤內微脂體載劑+OX86(**p值= 0.006)相較，儘管其無統計學顯著性，對應於組11 CRX-601 25微克/小鼠微脂體調配物+大鼠IgG1 (p值= 0.119)。組8組合物在存活上呈現出統計顯著性增加，與組4經腫瘤內CRX-601 25微克/小鼠(於0.5%甘油/4%葡萄糖)+大鼠IgG1 (*p值= 0.013)相較，儘管其無統計學顯著性，對應於組6經腫瘤內載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)+OX86(p值= 0.5)。圖41顯示所有組別之存活曲線。

實施例6：人類CD4+T細胞(A)、樹狀細胞(B)，以及單核細胞(C)於體外培養細胞24小時後，經特定濃度範圍(0.01-1000奈克/毫升)之CRX601處理誘發OX40表現

實驗描述

【0242】 進行體外人類週邊血液單核細胞(PBMC)試驗，以評估CRX601對於OX40表現之影響。新鮮分離出之人類PBMCs係檢驗其存活，並培養於AIM-V無血清培養液中，密度為每孔二百萬個細胞，於24孔盤中，未經組織培養治療之培養盤。PBMCs以一系列濃度(0.01微克/毫升 – 1,000微克/毫升，包括載劑空白組)之CRX-601刺激24小時。培養結束後，收集細胞進行流式細胞儀分析，評估OX40之表現。CRX601快速上調OX40受體之表現，於T細胞、樹狀細胞與單核球上，表現CRX601可上調抗OX40抗體之標靶，其可賦予抗OX40抗體之治療活性，並可使TLR4+OX40組合於體內產生抗腫瘤協同活性。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

OX40 抗體序列表

<110> GlaxoSmithKline Intellectual
Property Development Limited
<120> 組合物及其用途與治療

<130> PU65949
<160> 47
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 1
Asp Tyr Ser Met His
1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 2
Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 3
Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 4
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

多胜肽

<400> 5

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

<210> 6

<211> 458

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

聚核苷酸

<400> 6

actagtacca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt 60

atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca 120

gtcaaggttt cctgcaaggc ttctggttat accttcacag actattcaat gcactgggtg 180

cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taaacactga gactggtgag 240

ccaacatatg cagatgactt caagggacgg tttgtcttct ctttggacac ctctgtcagc 300

actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct 360

aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actggggtca gggaaccacg 420

gtcaccgtct cctcaggtaa gaatggcctc tcaagctt 458

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 8

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 9

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
多胜肽
<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12
<211> 416
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成
聚核苷酸
<400> 12
gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct 60
ggtgttgacg gagacattca gatgacccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtggga 120
gacagggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctggtat 180
caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact 240

ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc 300
agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattatag tactcctcgg 360
acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 13
Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 14
Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15
Arg

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 15
His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60
Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成

多胜肽

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met

50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 451

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成

聚核苷酸

<400> 18

actagtacca ccatggactt cgggctcagc ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt 60

gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggagggtcc 120

ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggtc 180

cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tggtggtagc 240

acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300

tcactgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca 360
agacactatg atgattacta cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tatggtcact 420
gtctcttcag gtgagtccta acttcaagct t 451

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 19
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 20
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 21
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 23

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成

多胜肽

<400> 23

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

<210> 24

<211> 428

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

聚核苷酸

<400> 24

gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctgggttcca 60
ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta ccttatcttt gtctccaggg 120
gaaagggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 180
atgcactggt accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcatcc 240
aacctagaat ctggggtccc tgccaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc 300
ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg 360
gagcttccgc tcacgttcgg cggagggacc aaggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt 420
ctgaattc 428

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 26

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Asn Gly

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 27

Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 28

<211> 414

<212> DNA

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 28

atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctct taaatggtgt ccagagtgaa 60
gtgaagcttg aggagtctgg aggaggcttg gtgcaacctg gaggatccat gaaactctct 120
tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca 180
gagaaggggc ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacatac 240
tatgctgagt ctgtgaatgg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc 300
tacctgcaaa tgaacagctt aagagctgaa gacactggca tttattactg tacgtggggg 360
gaagtgttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 414

<210> 29

<211> 138

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 29

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr

65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 30

<211> 448

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

聚核苷酸

<400> 30

actagtacca ccatgtactt gggactgaac tatgtattca tagtttttct cttaaatggt 60

gtccagagtg aagtgaagct ggaggagtct ggaggaggct tggtgcaacc tggaggatcc 120

atgaaactct cttgtgctgc ctctggattc acttttagtg acgcctggat ggactgggtc 180

cgccagtctc cagagaaggg gcttgagtgg gttgctgaaa ttagaagcaa agctaataat 240

catgcaacat actatgctga gtctgtgaat gggaggttca ccatctcaag agatgattcc 300

aaaagtagtg tctacctgca aatgaacagc ttaagagctg aagacactgg catttattac 360

tgtacgtggg gggaagtgtt ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 420

tcctcaggtg agtccttaaa acaagctt 448

<210> 31

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

多胜肽

<400> 31

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr

65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 33

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 34

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Thr

1 5

<210> 35

<211> 378

<212> DNA

<213> 小鼠屬(Mus sp.)

<400> 35

atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgctcagtgt 60

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120

atcacttgca agtcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 180

ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca 240
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgataatc ttctcacgtt cggtgctggg 360
accaagctgg agctgaaa 378

<210> 36
<211> 126
<212> PRT
<213> 小鼠屬(Mus sp.)
<400> 36

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

<210> 37
<211> 413
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
聚核苷酸
<400> 37

gctagcacca ccatgagacc gtctattcag ttcctggggc tcttgttgtt ctggcttcat 60
ggtgctcagt gtgacatcca gatgacacag tctccatcct cactgtctgc atctctggga 120
ggcaaagtca ccatcacttg caagtcaagc caagacatta acaagtatat agcttggtac 180
caacacaagc ctggaaaagg tcctaggctg ctcatacatt acacatctac attacagcca 240
ggcatcccat caaggttcag tggaagtggg tctgggagag attattcctt cagcatcagc 300
aacctggagc ctgaagatat tgcaacttat tattgtctac agtatgataa tcttctcacg 360
ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa cgtaagtaca cttttctgaa ttc 413

<210> 38
<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

多胜肽

<400> 38

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

引子

<400> 39

cgctgttttg acctccatag 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

引子

<400> 40

tgaaagatga gctggaggac 20

<210> 41

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
引子
<400> 41
ctttcttgtc caccttggtg 20
<210> 42
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
引子
<400> 42
gctgtcctac agtcctcag 19
<210> 43
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
引子
<400> 43
acgtgccaag catcctcg 18
<210> 44
<211> 1407
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
聚核苷酸
<400> 44
atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctct taaatggtgt ccagagtgaa 60
gtgaagctgg aggagtctgg aggaggcttg gtgcaacctg gaggatccat gaaactctct 120
tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca 180
gagaaggggc ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacatac 240
tatgctgagt ctgtgaatgg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc 300
tacctgcaaa tgaacagctt aagagctgaa gacactggca tttattactg tacgtggggg 360
gaagtgttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcagcctcc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1407

<210> 45
<211> 469
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>人工序列描述：合成
多肽
<400> 45

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

130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Thr Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 46

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成

聚核苷酸

<400> 46

atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgctcagtgt 60

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120

atcacttgca agtcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 180

ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca 240

aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300

gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgataatc ttctcacgtt cggtgctggg 360

accaagctgg agctgaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 47

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成

多胜肽

<400> 47

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp

35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser

85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp

100 105 110

```
Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
       115                 120                 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
    130                 135                 140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145                 150                 155                 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                165                 170                 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
           180                 185                 190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
       195                 200                 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    210                 215                 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

            230
```

申請專利範圍

1. 一種抗原結合蛋白(ABP)之組合物，其結合至OX40與TLR4調節子，且其中該ABP調節OX40。

2. 如申請專利範圍第1項之組合物，其中該結合至OX40之ABP為人源化單株抗體，包含：一重鏈可變區域CDR1，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：1與SEQ ID NO：13之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；一重鏈可變區域CDR2，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：2與SEQ ID NO：14之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；一重鏈可變區域CDR3，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：3與SEQ ID NO：15之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；一輕鏈可變區域CDR1，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：7與SEQ ID NO：19之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；一輕鏈可變區域CDR2，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：8與SEQ ID NO：20之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；以及一輕鏈可變區域CDR3，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：9與SEQ ID NO：21之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列。

3. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該結合至OX40之ABP為人源化單株抗體，包含：(a)一重鏈可變區域CDR1，其包含如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列；(b)一重鏈可變區域CDR2，其包含如SEQ ID NO：2所示之胺基酸序列；(c)一重鏈可變區域CDR3，其包含如SEQ ID NO：3所示之胺基酸序列；(d)一輕鏈可變區域CDR1，其包含如SEQ ID NO：7所示之胺基酸序列；(e)一輕鏈可變區域CDR2，其包含如SEQ ID NO：8所示之胺基酸序列；以及(f)一輕鏈可變區域CDR3，其包含如SEQ ID NO：9所示之胺基酸序列。

4. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該結合至OX40之ABP為一抗體，包含一重鏈可變區域，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：4與SEQ

ID NO：5之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列，其中該抗體更包含一輕鏈可變區域，其包含具有與選自於：SEQ ID NO：10與SEQ ID NO：11之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列。

5. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該結合至OX40之ABP為一抗體，包含一重鏈可變區域，其包含如SEQ ID NO：5所示之胺基酸序列；以及一輕鏈可變區域，其包含如SEQ ID NO：11所示之胺基酸序列。

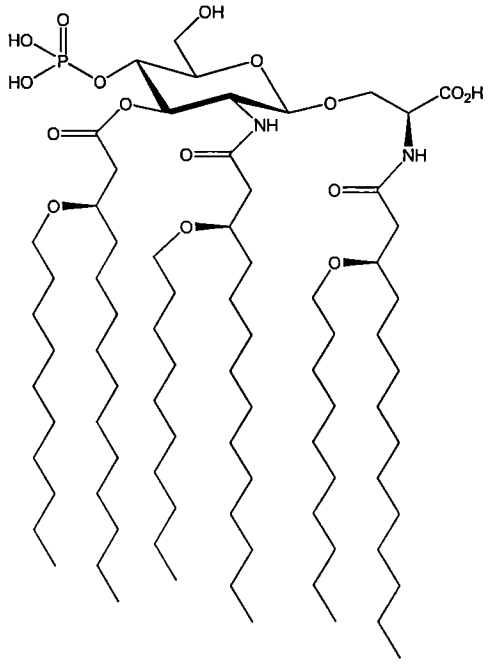
6. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該TLR4調節子為TLR4促效劑。

7. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該TLR4調節子為胺基烷基葡萄胺糖苷磷酸鹽(AGP)。

8. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該TLR4調節子選自於式I與式Ia之化合物。

9. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該TLR4調節子選自於：CRX-601；CRX-547；CRX-602；以及CRX-527。

10. 如申請專利範圍第1或2項之組合物，其中該TLR4調節子具下式CRX-601：



CRX-601。

11. 一種如申請專利範圍第1至10項中任一項之組合物之用途，連同至少下列一者：醫藥上可接受之載劑及醫藥上可接受之稀釋劑，其係用於製造治療有需求人類病患之癌症之藥劑。

12. 一種醫藥組成物，包含治療有效量之結合至人類OX40的OX40抗體，，以及第二醫藥組成物，其包含治療上有效量之TLR4促效劑。

13. 如申請專利範圍第12項之醫藥組成物，其中該結合至人類OX40之抗體包含一VH區域，其具有選自於下列之胺基酸序列：與SEQ ID NO：4之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；以及與SEQ ID NO：5之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列，以及VL，其具有選自於下列之胺基酸序列：與SEQ ID NO：10之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；以及與SEQ ID NO：11之胺基酸序列至少90%同一性之胺基酸序列；且其中該TLR4促效劑為CRX-601。

14. 一種如申請專利範圍第12或13項中任一項之醫藥組成物之用途，用於製造治療有需求人類病患之癌症之藥劑。

15. 如申請專利範圍第14項之用途，其中該抗體與該TLR4促效劑投予病患之途徑係選自於：同時；依序，以任何順序；全身性；經靜脈內內；以及經腫瘤內內。

16. 如申請專利範圍第14或15項之用途，其中該OX40抗體係經靜脈內投予，且該TLR4促效劑係經腫瘤內投予。

17. 如申請專利範圍第14或15項之用途，其中該癌症係選自於：黑色素瘤；肺癌；非小細胞肺癌(NSCLC)；腎癌；腎細胞癌(RCC)；乳癌；轉移性乳癌；三重陰性乳癌(TNBC)；頭頸癌；大腸癌；直腸癌(CRC)；卵巢癌；胰腺癌；肝癌；肝細胞癌(HCC)；前列腺癌；膀胱癌；胃癌；液體腫瘤；實體瘤；造血系統腫瘤；白血病；非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；淋巴瘤；以及慢性淋巴細胞白血病(CLL)。

18. 如申請專利範圍第17項之用途，其中人類患有一個以上之實體瘤，且其中該TLR4促效劑係經腫瘤內投予至該人類之單一腫瘤，且其中該TLR4未投予之至少一實體瘤之腫瘤大小未減少。
19. 一種如申請專利範圍第1至10項之組合物之用途，用於製造藥劑。
20. 一種如申請專利範圍第1至10項中任一項之組合物之用途，用於治療癌症。

圖式

圖 1A

CRX-527(TLR 4)對 CT-26 同基因型小鼠模型腫瘤生長之影響

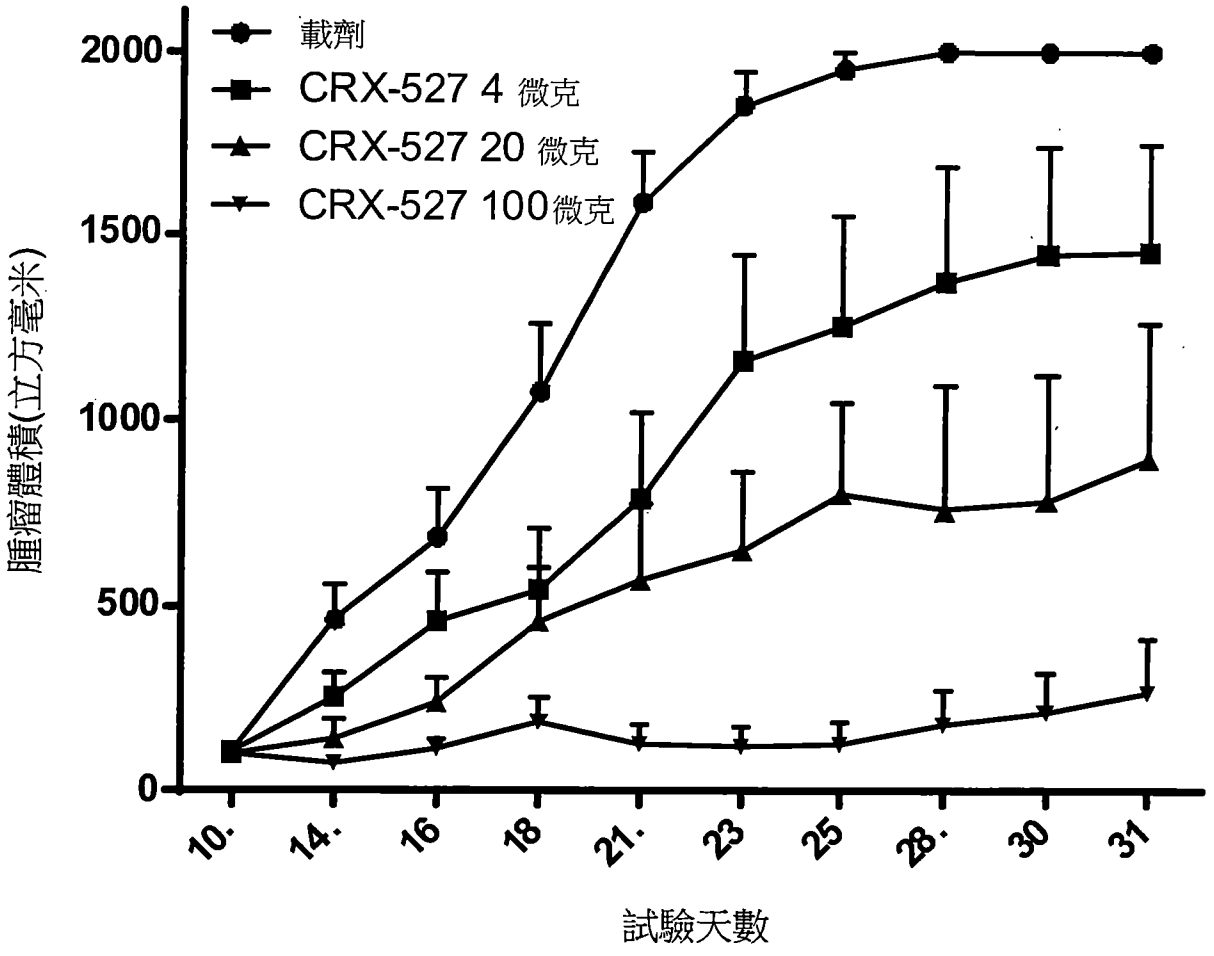


圖 1B

OX86 對 CT-26 同基因型小鼠模型腫瘤生長之影響

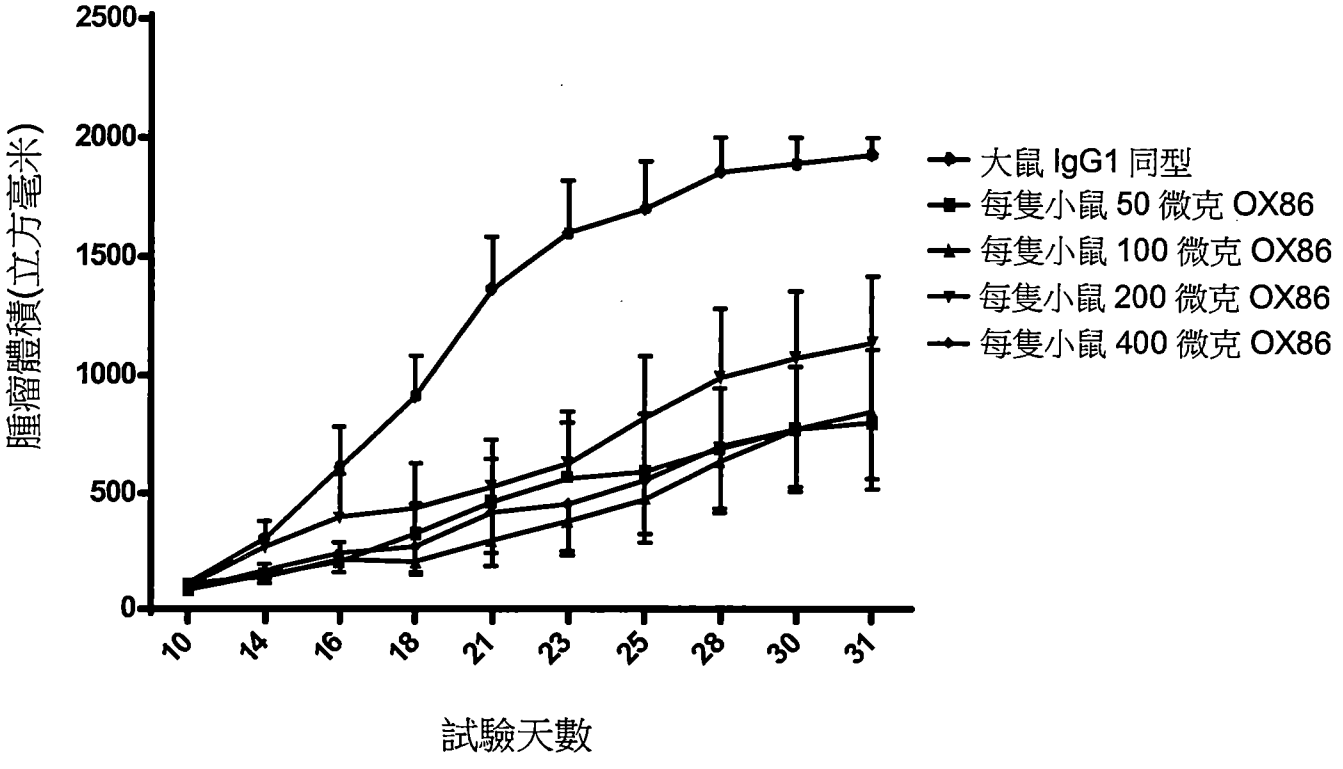


圖 2

OX40 與 TLR4 組合物於 CT-26 同基因型腫瘤模型

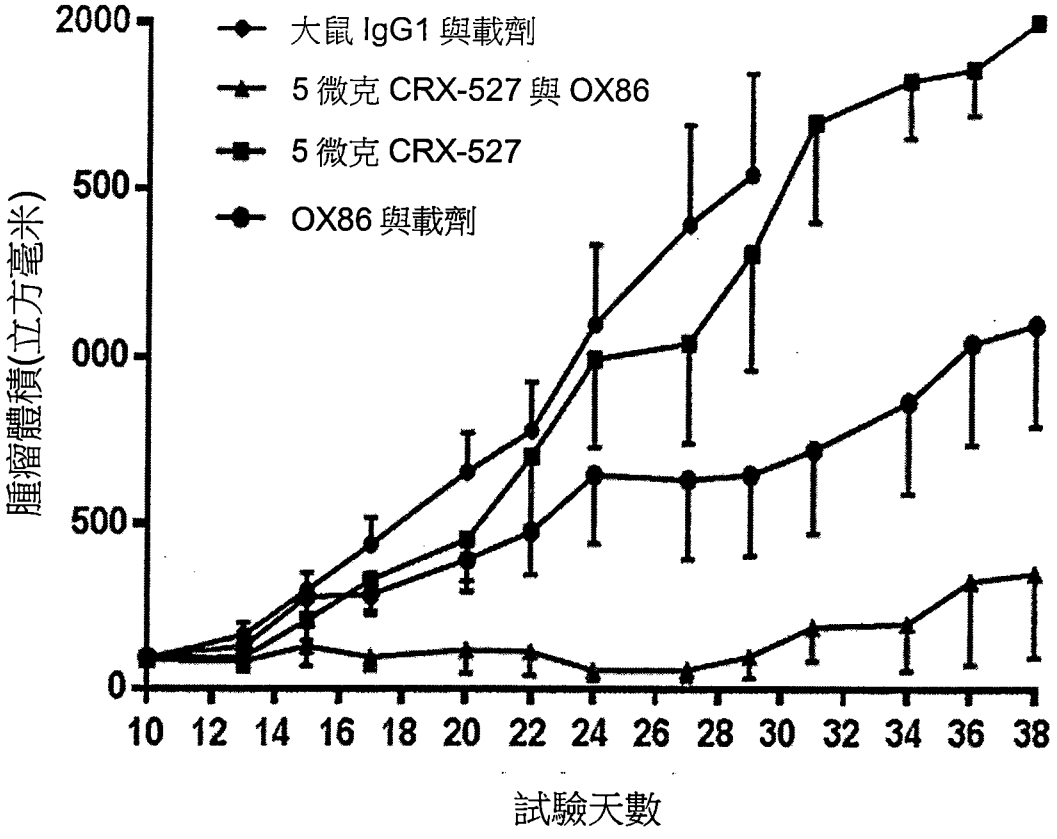


圖 3

OX40 與 TLR4 組合物於同基因型腫瘤模型

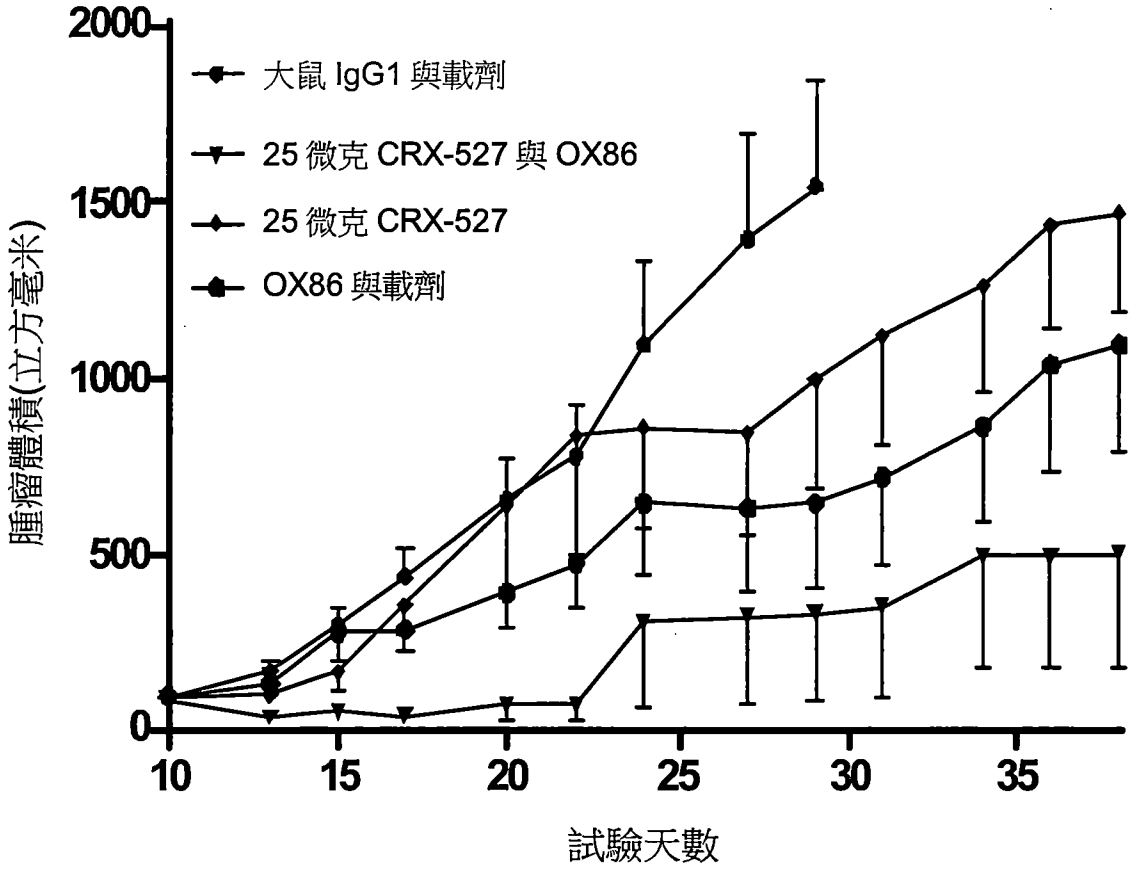
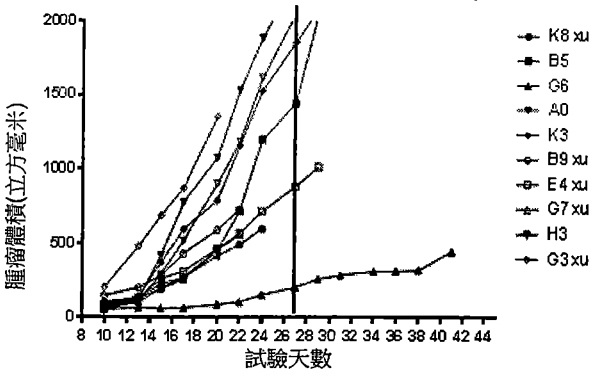


圖 4

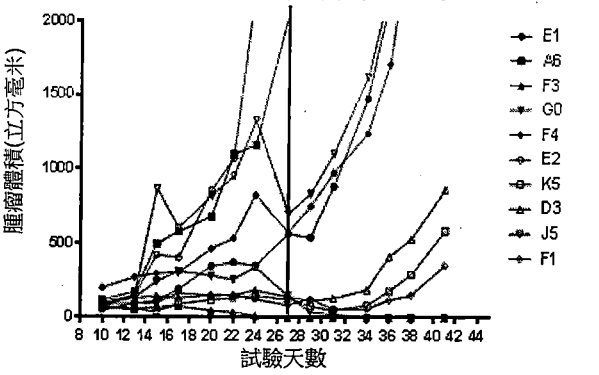
腫瘤生長原始數據(OX86、TLR4、及組合)

圖 4A



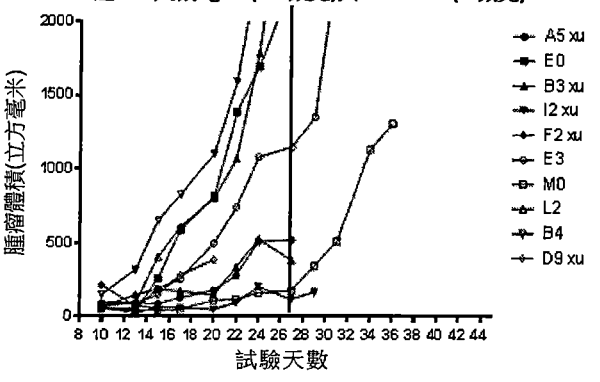
x = 由於腫瘤大小以外之標準而自試驗移除
u = 潰瘍
於第 27 天之直線代表處理之最終日

圖 4B



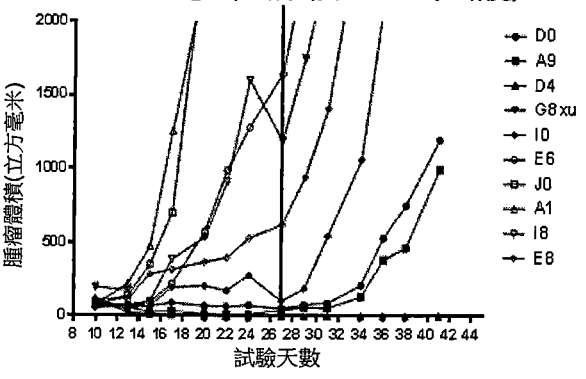
x = 由於腫瘤大小以外之標準而自試驗移除
u = 潰瘍
於第 27 天之直線代表處理之最終日

圖 4C



x = 由於腫瘤大小以外之標準而自試驗移除
u = 潰瘍
於第 27 天之直線代表處理之最終日

圖 4D

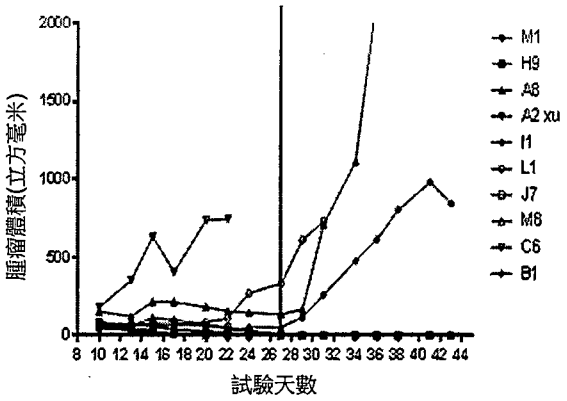


x = 由於腫瘤大小以外之標準而自試驗移除
u = 潰瘍
於第 27 天之直線代表處理之最終日

圖 4

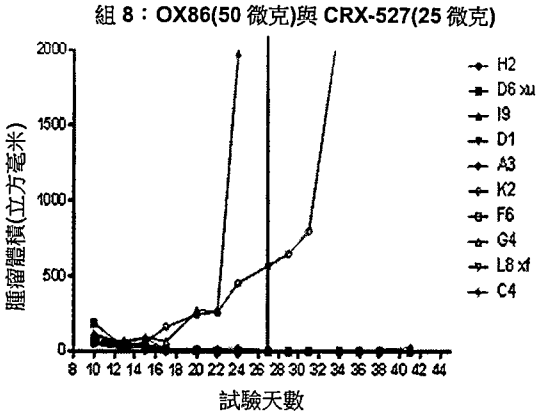
腫瘤生長原始數據(OX86、TLR4、及組合)

圖 4E



x = 由於腫瘤大小以外之標準而自試驗移除
u = 潰瘍
於第 27 天之直線代表處理之最終日

圖 4F



x = 由於腫瘤大小以外之標準而自試驗移除
u = 潰瘍
f = LAS 人員發現死亡
於第 27 天之直線代表處理之最終日

圖 5

CRX601 對 BALB/c 小鼠 CT-26 腫瘤生長之影響

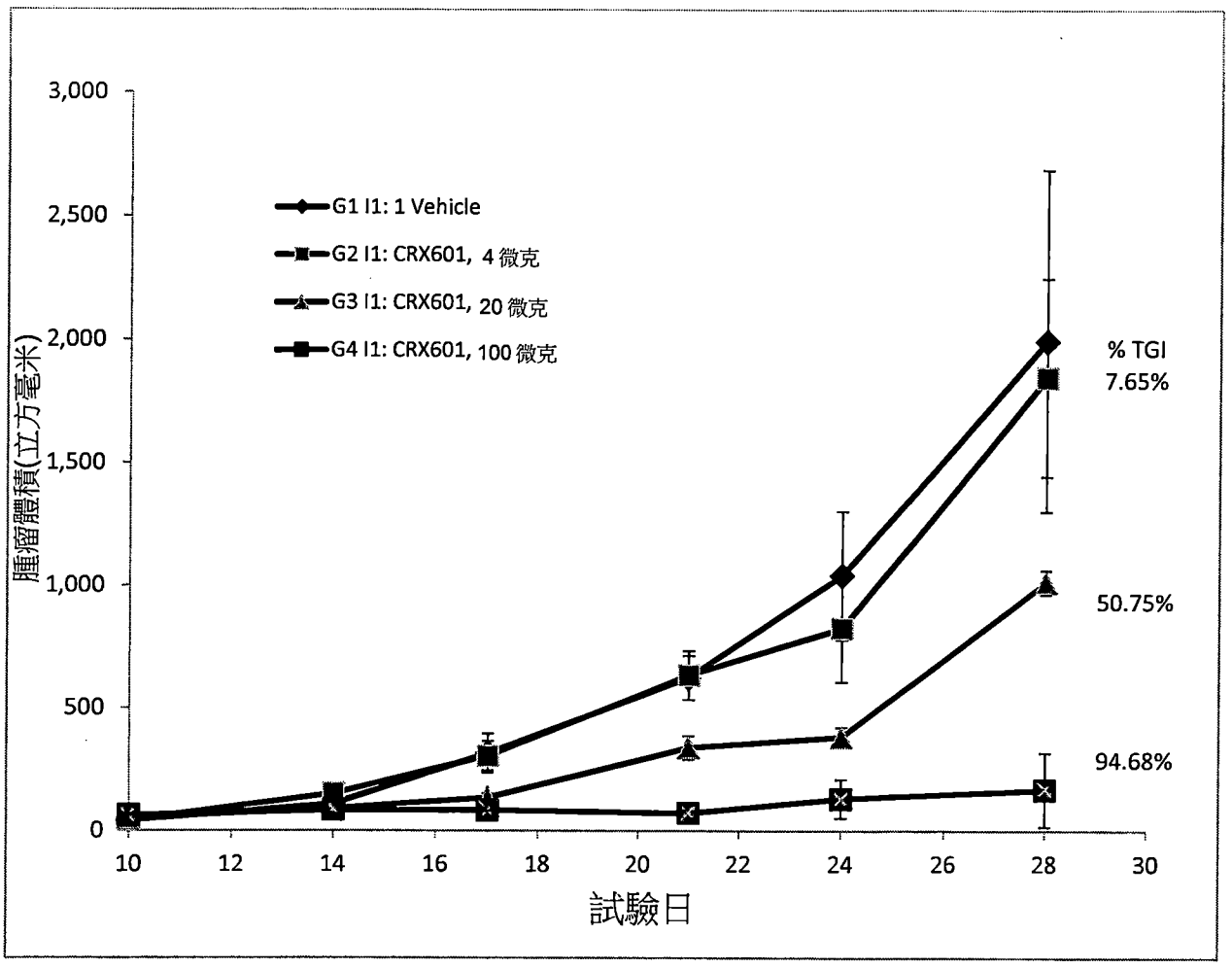


圖 6

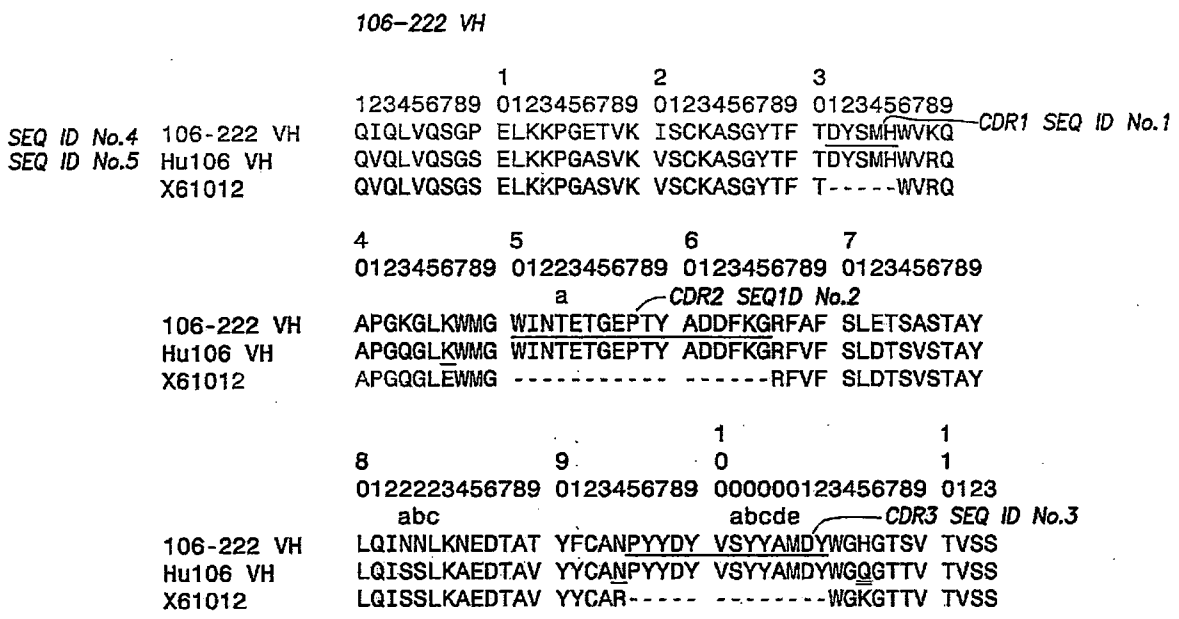

106-222 VH
1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
SEQ ID No.4 106-222 VH QIQLVQSGP ELKKPGETVK ISCKASGYTF TDYSMHWVKQ
CDR1 SEQ ID No.1
SEQ ID No.5 Hu106 VH QVQLVQSGS ELKKPGASVK VSCKASGYTF TDYSMHWVRQ
X61012 QVQLVQSGS ELKKPGASVK VSCKASGYTF T-----WVRQ
4 5 6 7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
a
CDR2 SEQ1D No.2
106-222 VH APGKGLKWMG WINTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY
Hu106 VH APGQGLKWMG WINTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY
X61012 APGQGLEWMG ---------- ------RFVF SLDTSVSTAY
1 1
8 9 0 1
0122223456789 0123456789 000000123456789 0123
abc abcde
CDR3 SEQ ID No.3
106-222 VH LQINNLKNEDTAT YFCANPYYDY VSYYAMDYWGHGTSV TVSS
Hu106 VH LQISSLKAEDTAV YYCANPYYDY VSYYAMDYWGQGTTV TVSS
X61012 LQISSLKAEDTAV YYCAR----- ---------WGKGTTV TVSS

圖 7

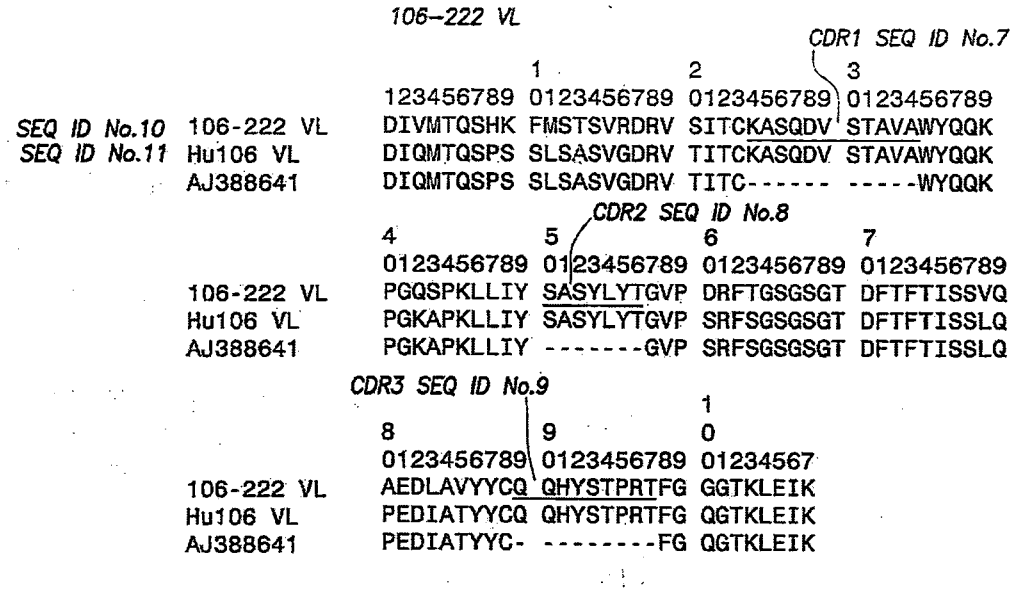

106-222 VL
CDR1 SEQ ID No.7
1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
SEQ ID No.10 106-222 VL DIVMTQSHK FMSTSVRDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK
SEQ ID No.11 Hu106 VL DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQDV STAVAWYQQK
AJ388641 DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITC------ -----WYQQK
CDR2 SEQ ID No.8
4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
106-222 VL PGQSPKLLIY SASYLYTGVP DRFTGSGSGT DFTFTISSVQ
Hu106 VL PGKAPKLLIY SASYLYTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
AJ388641 PGKAPKLLIY -------GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
CDR3 SEQ ID No.9
1
8 9 0
0123456789 0123456789 01234567
106-222 VL AEDLAVYYCQ QHYSTPRTFG GGTKLEIK
Hu106 VL PEDIATYYCQ QHYSTPRTFG QGTKLEIK
AJ388641 PEDIATYYC- --------FG QGTKLEIK

圖 8

Hu106-222 VH
SpeI
SEQ ID No.6
ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGT
M A W V W T L L F L M A A A Q S
ATCCAAGCACAGGTTCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA
I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S
GTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V
CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG
R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E
CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCTTTGGACACCTCTGTCAGC
P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S
ACTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT
T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A
AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCACG
N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T
HindIII
GTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT
V T V S S

圖 9

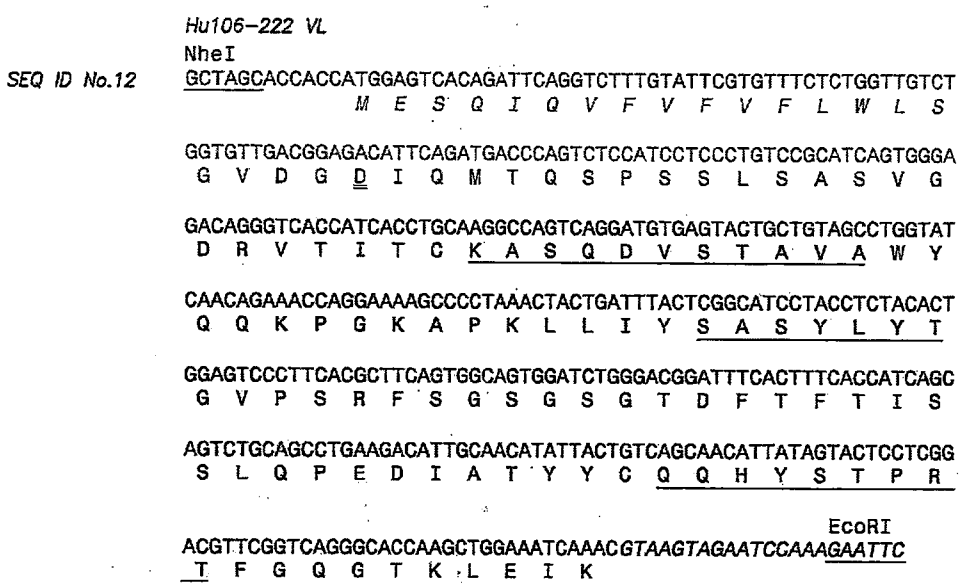

Hu106-222 VL
NheI
SEQ ID No.12
GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCT
M E S Q I Q V F V F V F L W L S
GGTGTTGACGGAGACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTGGGA
G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTAT
D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y
CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCTCTACACT
Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T
GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGC
G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S
AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCTCGG
S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y S T P R
EcoRI
ACGTTCGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC
T F G Q G T K L E I K

圖 10

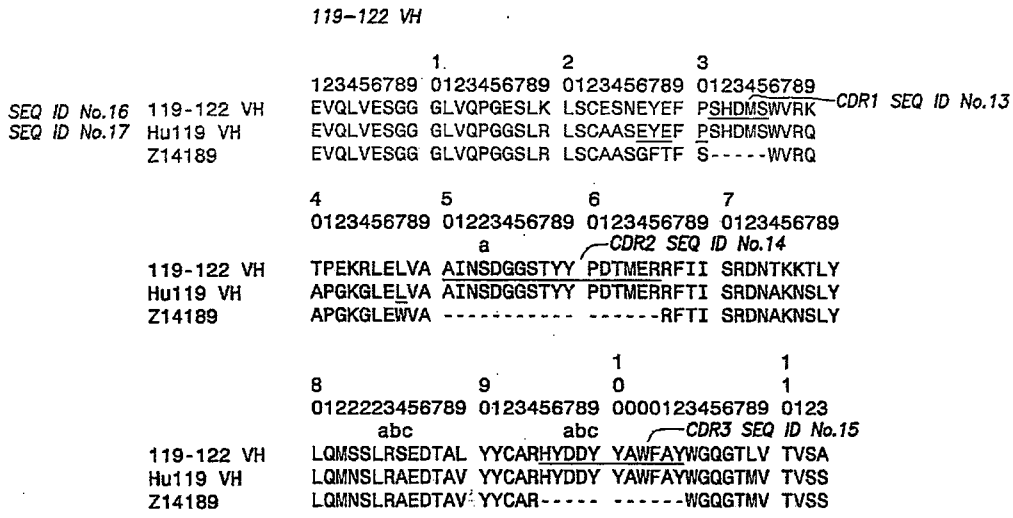

119-122 VH
1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
SEQ ID No.16 119-122 VH EVQLVESGG GLVQPGESLK LSCESNEYEF PSHDMSWVRK
CDR1 SEQ ID No.13
SEQ ID No.17 Hu119 VH EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASEYEF PSHDMSWVRQ
Z14189 EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S-----WVRQ
4 5 6 7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
a
CDR2 SEQ ID No.14
119-122 VH TPEKRLELVA AINSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY
Hu119 VH APGKGLELVA AINSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY
Z14189 APGKGLEWVA ----------- ------RFTI SRDNAKNSLY
1 1
8 9 0 1
0122223456789 0123456789 0000123456789 0123
abc abc
CDR3 SEQ ID No.15
119-122 VH LQMSSLRSEDTAL YYCARHYDDY YAWFAYWGQGTLV TVSA
Hu119 VH LQMNSLRAEDTAV YYCARHYDDY YAWFAYWGQGTMV TVSS
Z14189 LQMNSLRAEDTAV YYCAR----- ------WGQGTMV TVSS

圖 11

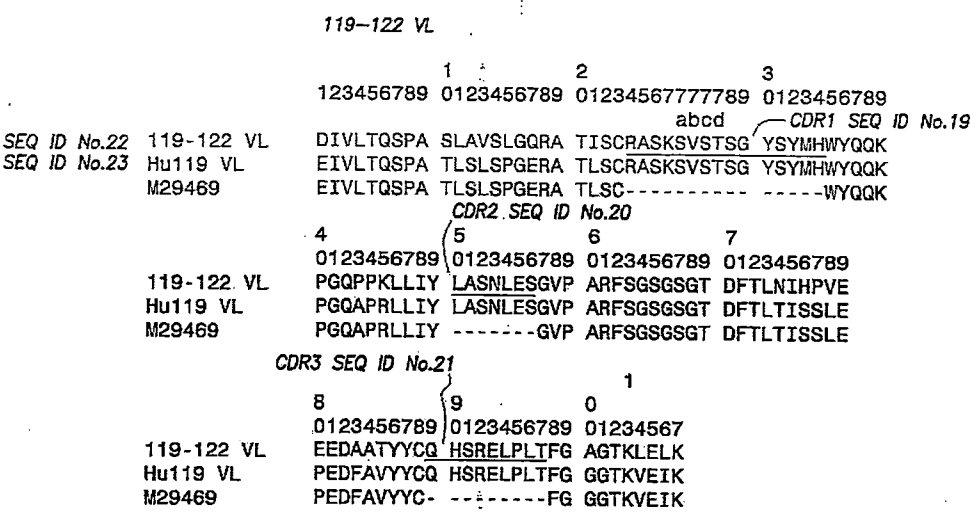

119–122 VL
1 2 3
123456789 0123456789 01234567777789 0123456789
abcd
CDR1 SEQ ID No.19
SEQ ID No.22 119-122 VL DIVLTQSPA SLAVSLGQRA TISCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
SEQ ID No.23 Hu119 VL EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
M29469 EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSC---------- -----WYQQK
CDR2 SEQ ID No.20
4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
119-122 VL PGQPPKLLIY LASNLESGVP ARFSGSGSGT DFTLNIHPVE
Hu119 VL PGQAPRLLIY LASNLESGVP ARFSGSGSGT DFTLTISSLE
M29469 PGQAPRLLIY -------GVP ARFSGSGSGT DFTLTISSLE
CDR3 SEQ ID No.21
1
8 9 0
0123456789 0123456789 01234567
119-122 VL EEDAATYYCQ HSRELPLTFG AGTKLELK
Hu119 VL PEDFAVYYCQ HSRELPLTFG GGTKVEIK
M29469 PEDFAVYYC- ---------FG GGTKVEIK

圖 12

Hu119-122 VH
SpeI
SEQ ID No.18
ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGCTCAGCTTGGTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAAAAGT
M D F G L S L V F L V L I L K S
GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTC
L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V
CGCCAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGC
R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S
ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N
TCACTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGACACTATGATGATTACTACGCCTGGTTTGCTTACTG
R H Y D D Y Y A W F A Y W
CAAGGGACTATGGTCACT
Q G T M V T
HindIII
GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT
V S S

圖 13

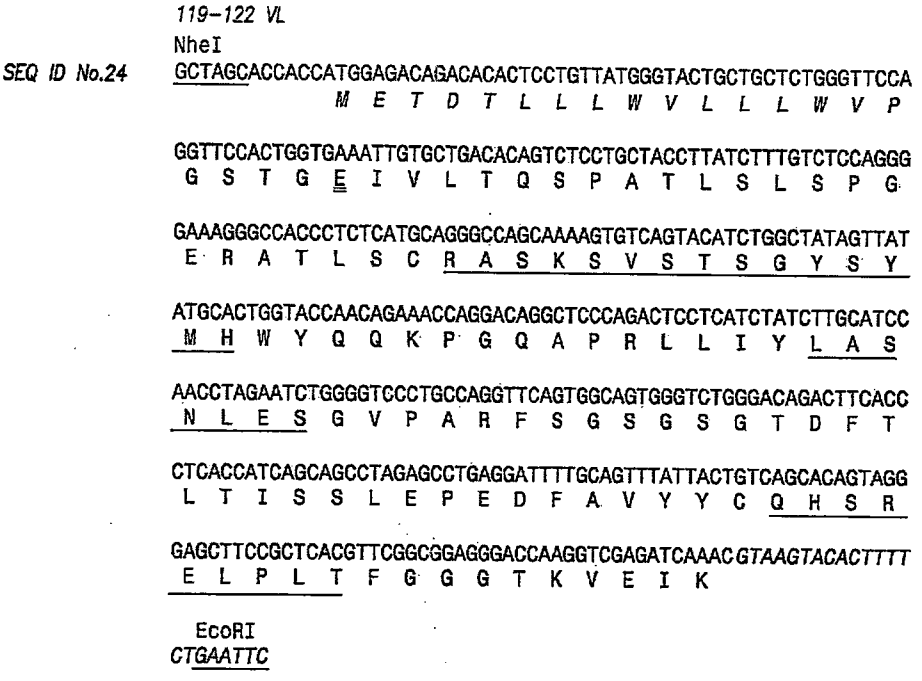

119–122 VL
NheI
SEQ ID No.24
GCTAGCACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCA
M E T D T L L L W V L L L W V P
GGTTCCACTGGTGAAATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTTTGTCTCCAGGG
G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G
GAAAGGGCCACCCTCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTAT
E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y
ATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATCTTGCATCC
M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S
AACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTAGG
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R
GAGCTTCCGCTCACGTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCGAGATCAAAC GTAAGTACACTTTT
E L P L T F G G G T K V E I K
EcoRI
CTGAATTC

圖 14

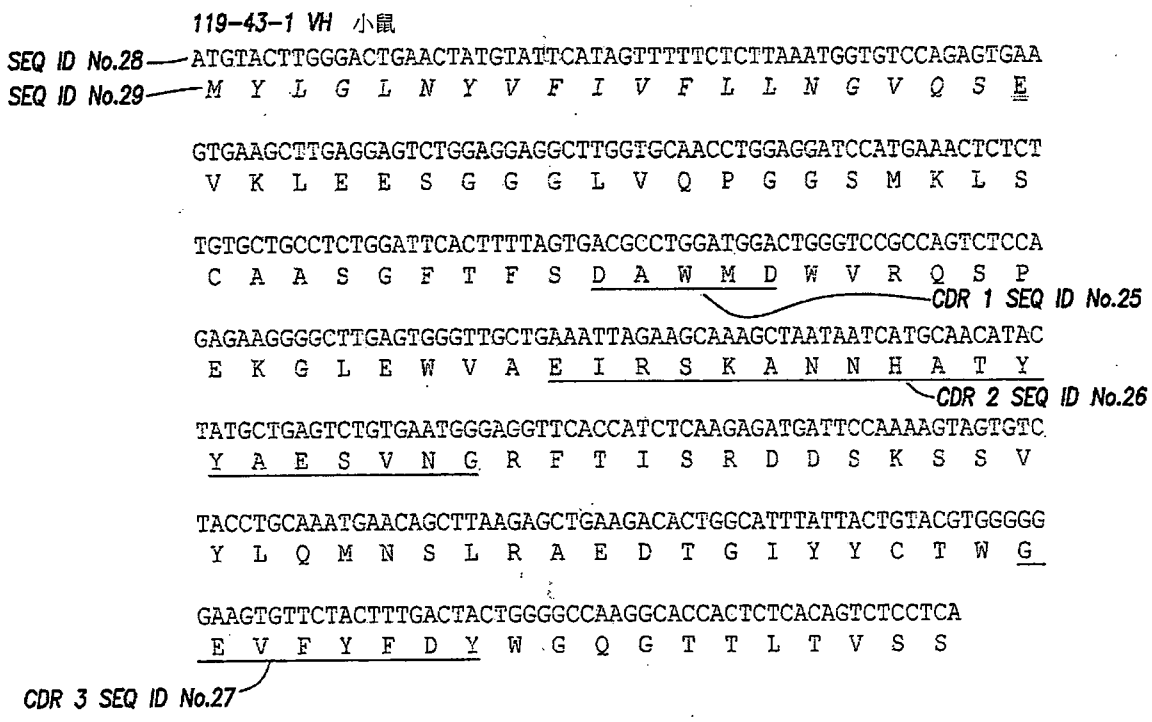

119-43-1 VH 小鼠
SEQ ID No.28
ATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTCATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAA
SEQ ID No.29
M Y L G L N Y V F I V F L L N G V Q S E
GTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCT
V K L E E S G G G L V Q P G G S M K L S
TGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCA
C A A S G F T F S D A W M D W V R Q S P
CDR 1 SEQ ID No.25
GAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATAC
E K G L E W V A E I R S K A N N H A T Y
CDR 2 SEQ ID No.26
TATGCTGAGTCTGTGAATGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTC
Y A E S V N G R F T I S R D D S K S S V
TACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTACTGTACGTGGGGG
Y L Q M N S L R A E D T G I Y Y C T W G
GAAGTGTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
E V F Y F D Y W G Q G T T L T V S S
CDR 3 SEQ ID No.27

圖 15

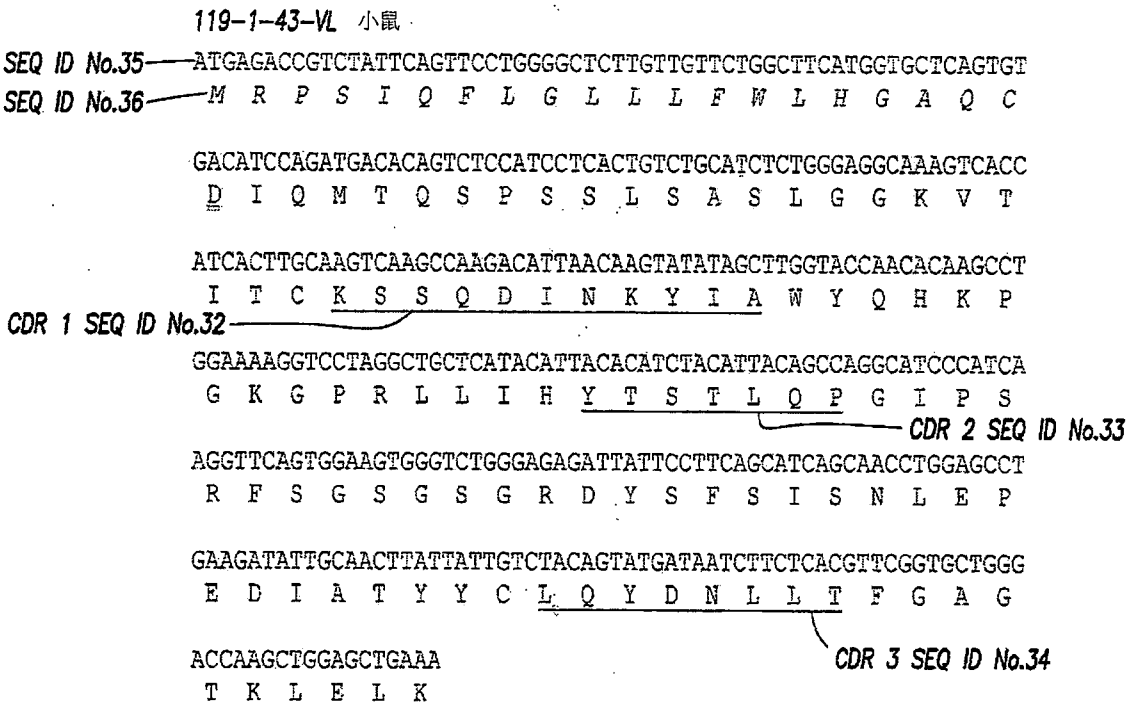

119-1-43-VL 小鼠
SEQ ID No.35
ATGAGACCGTCTATTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTTGTTCTGGCTTCATGGTGCTCAGTGT
SEQ ID No.36
M R P S I Q F L G L L L F W L H G A Q C
GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTCTGGGAGGCAAAGTCACC
D I Q M T Q S P S S L S A S L G G K V T
ATCACTTGCAAGTCAAGCCAAGACATTAACAAGTATATAGCTTGGTACCAACACAAGCCT
I T C K S S Q D I N K Y I A W Y Q H K P
CDR 1 SEQ ID No.32
GGAAAAGGTCCTAGGCTGCTCATACATTACACATCTACATTACAGCCAGGCATCCCATCA
G K G P R L L I H Y T S T L Q P G I P S
CDR 2 SEQ ID No.33
AGGTTCAGTGGAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTTCAGCATCAGCAACCTGGAGCCT
R F S G S G S G R D Y S F S I S N L E P
GAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTATGATAATCTTCTCACGTTCGGTGCTGGG
E D I A T Y Y C L Q Y D N L L T F G A G
ACCAAGCTGGAGCTGAAA
T K L E L K
CDR 3 SEQ ID No.34

圖 16

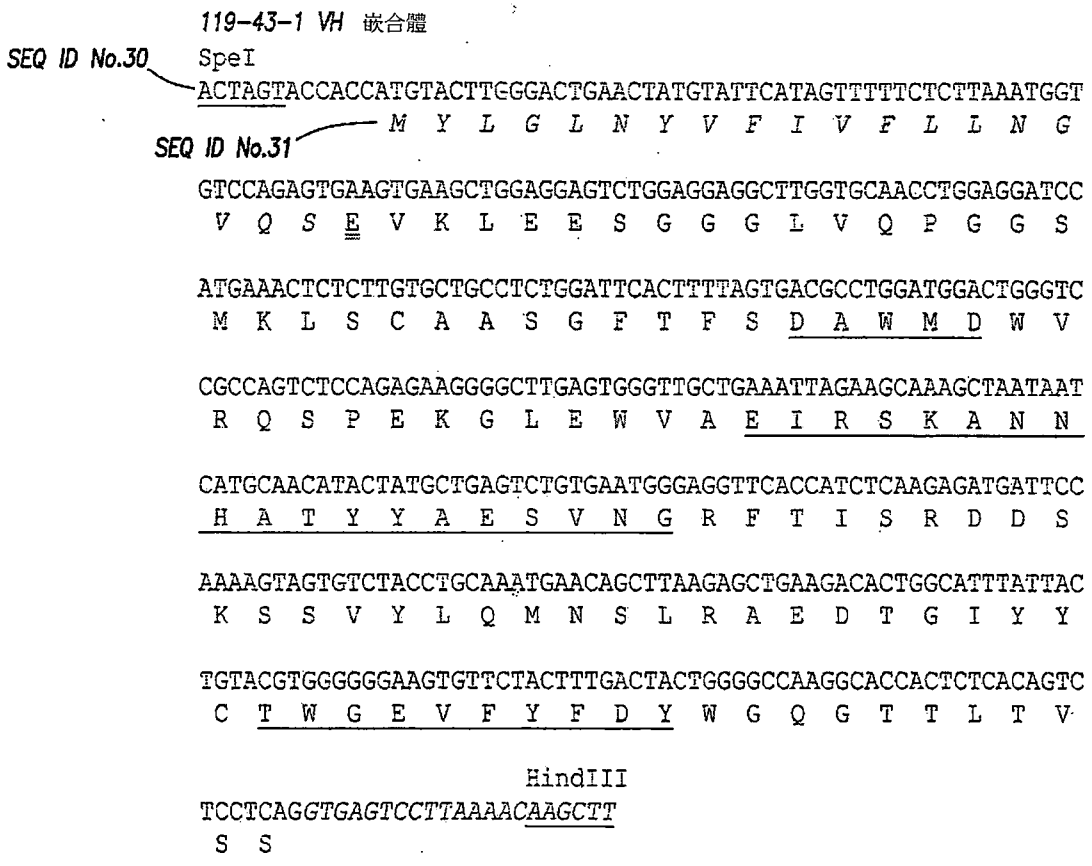

119-43-1 VH 嵌合體
SEQ ID No.30
SpeI
ACTAGTACCACCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTCATAGTTTTTCTCTTAAATGGT
M Y L G L N Y V F I V F L L N G
SEQ ID No.31
GTCCAGAGTGAAGTGAAGCTGGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCC
V Q S E V K L E E S G G G L V Q P G G S
ATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTC
M K L S C A A S G F T F S D A W M D W V
CGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAAT
R Q S P E K G L E W V A E I R S K A N N
CATGCAACATACTATGCTGAGTCTGTGAATGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCC
H A T Y Y A E S V N G R F T I S R D D S
AAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTAC
K S S V Y L Q M N S L R A E D T G I Y Y
TGTACGTGGGGGGAAGTGTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC
C T W G E V F Y F D Y W G Q G T T L T V
HindIII
TCCTCAGGTGAGTCCTTAAAACAAGCTT
S S

圖 17

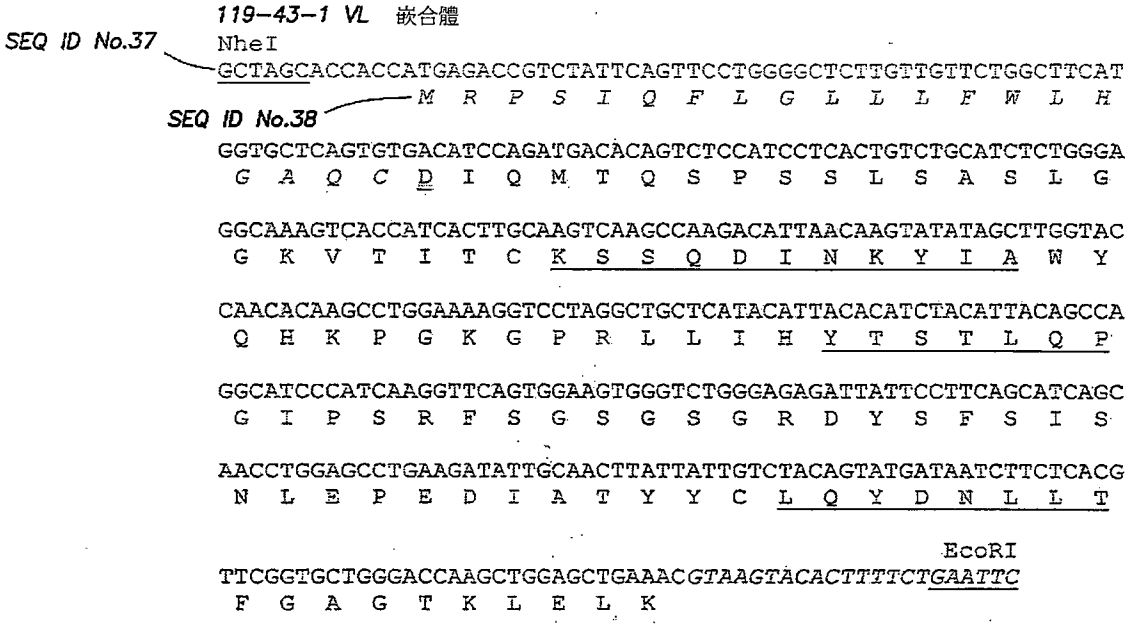

119-43-1 VL 嵌合體
SEQ ID No.37
NheI
GCTAGCACCACCATGAGACCGTCTATTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTTGTTCTGGCTTCAT
M R P S I Q F L G L L L F W L H
SEQ ID No.38
GGTGCTCAGTGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTCTGGGA
G A Q C D I Q M T Q S P S S L S A S L G
GGCAAAGTCACCATCACTTGCAAGTCAAGCCAAGACATTAACAAGTATATAGCTTGGTAC
G K V T I T C K S S Q D I N K Y I A W Y
CAACACAAGCCTGGAAAAGGTCCTAGGCTGCTCATACATTACACATCTACATTACAGCCA
Q H K P G K G P R L L I H Y T S T L Q P
GGCATCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTTCAGCATCAGC
G I P S R F S G S G S G S G R D Y S F S I S
AACCTGGAGCCTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTATGATAATCTTCTCACG
N L E P E D I A T Y Y C L Q Y D N L L T
EcoRI
TTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTAAGTACACTTTTTCTGAATTC
F G A G T K L E L K

圖 18

以 CRX601 腫瘤內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積

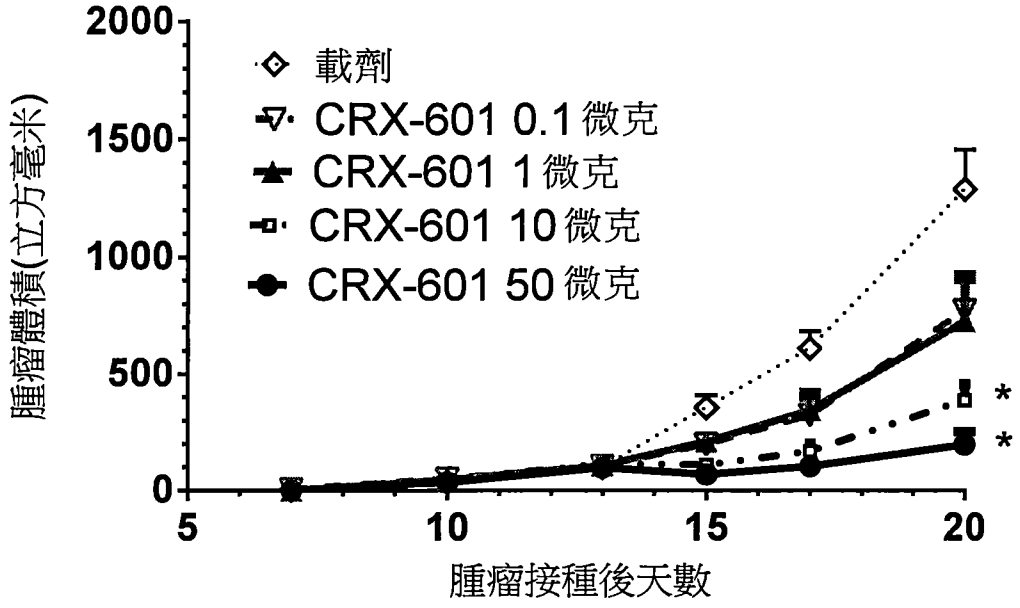


圖 19

CRX601 腫瘤內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比

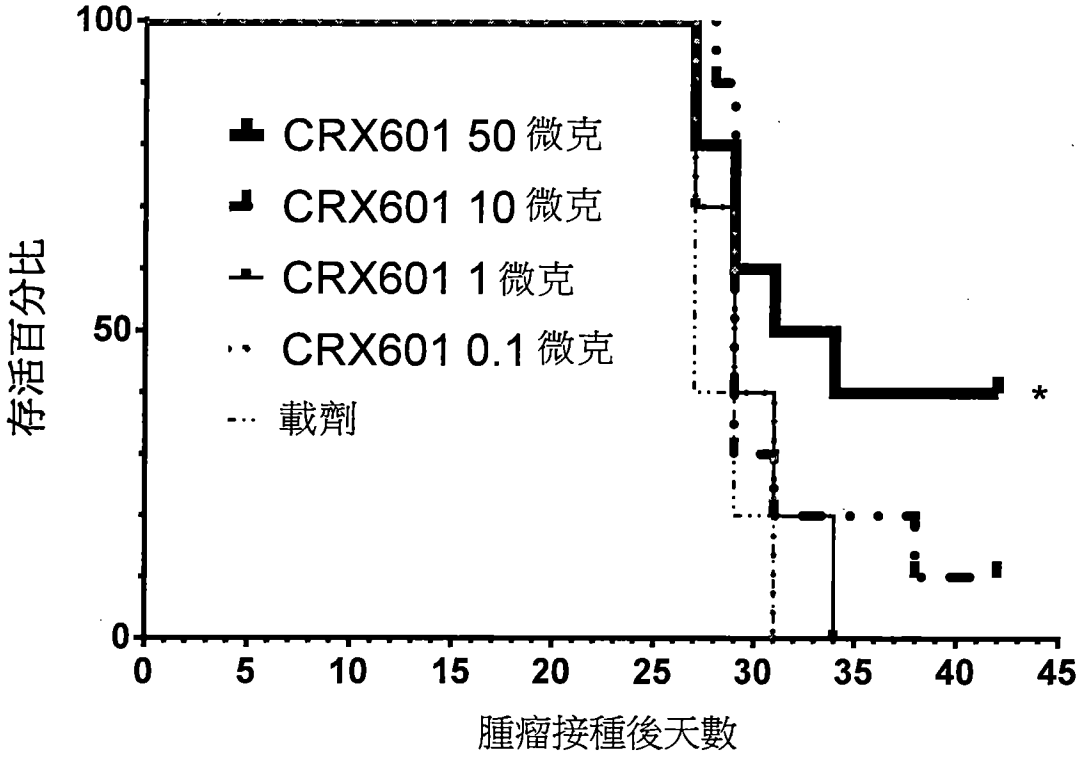


圖 20

以 CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積

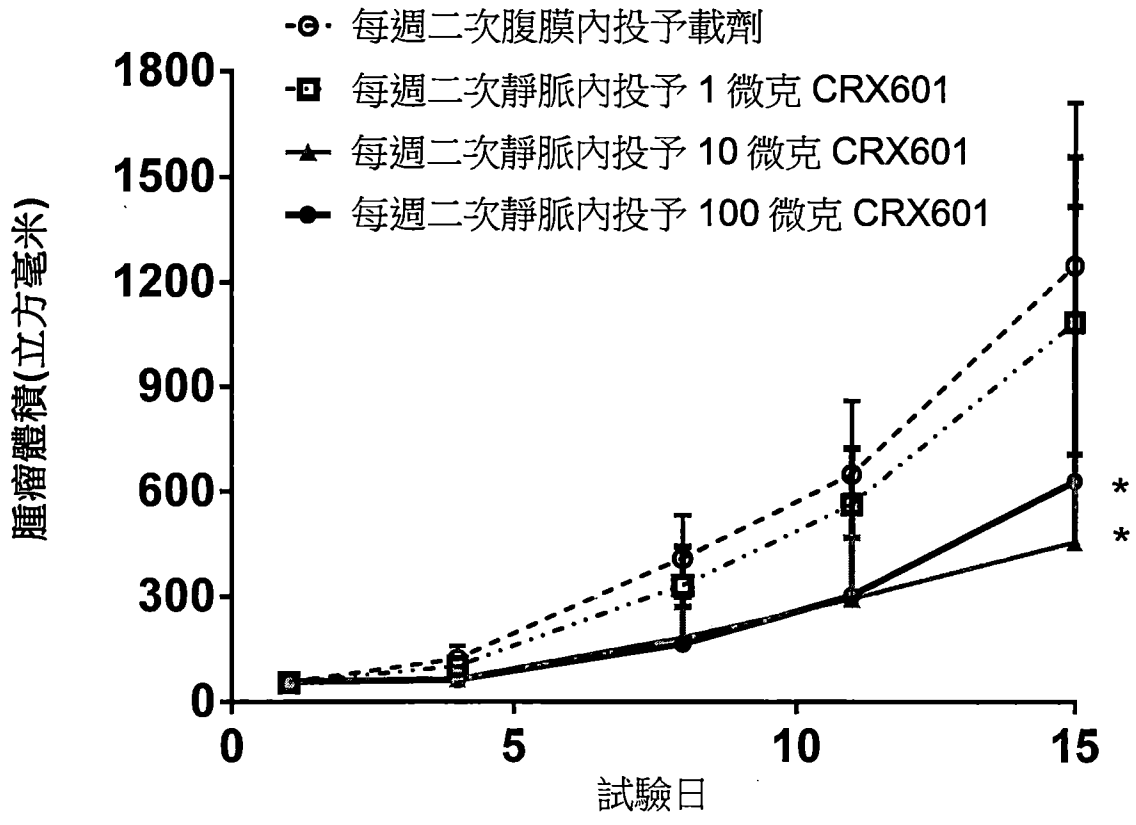


圖 21

CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比

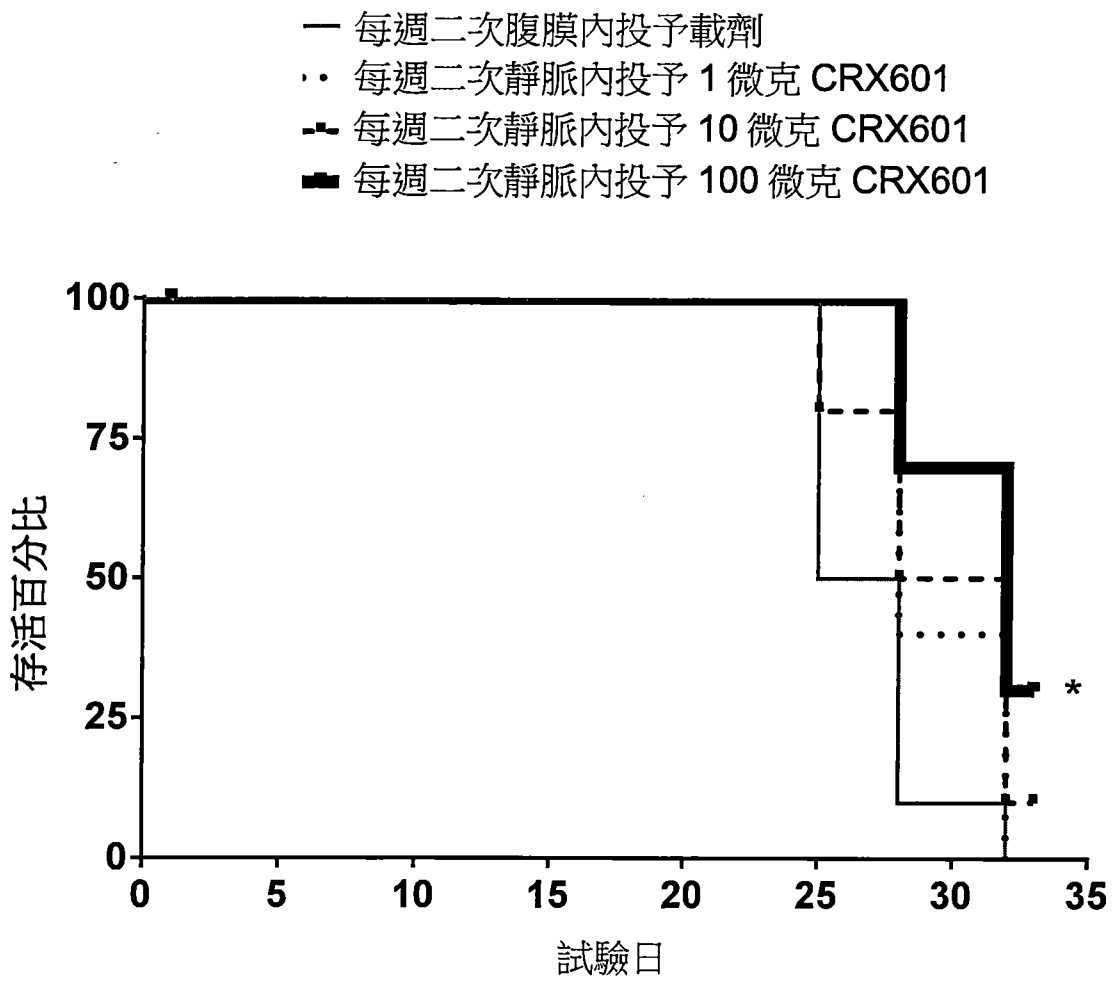


圖 22

以 CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積

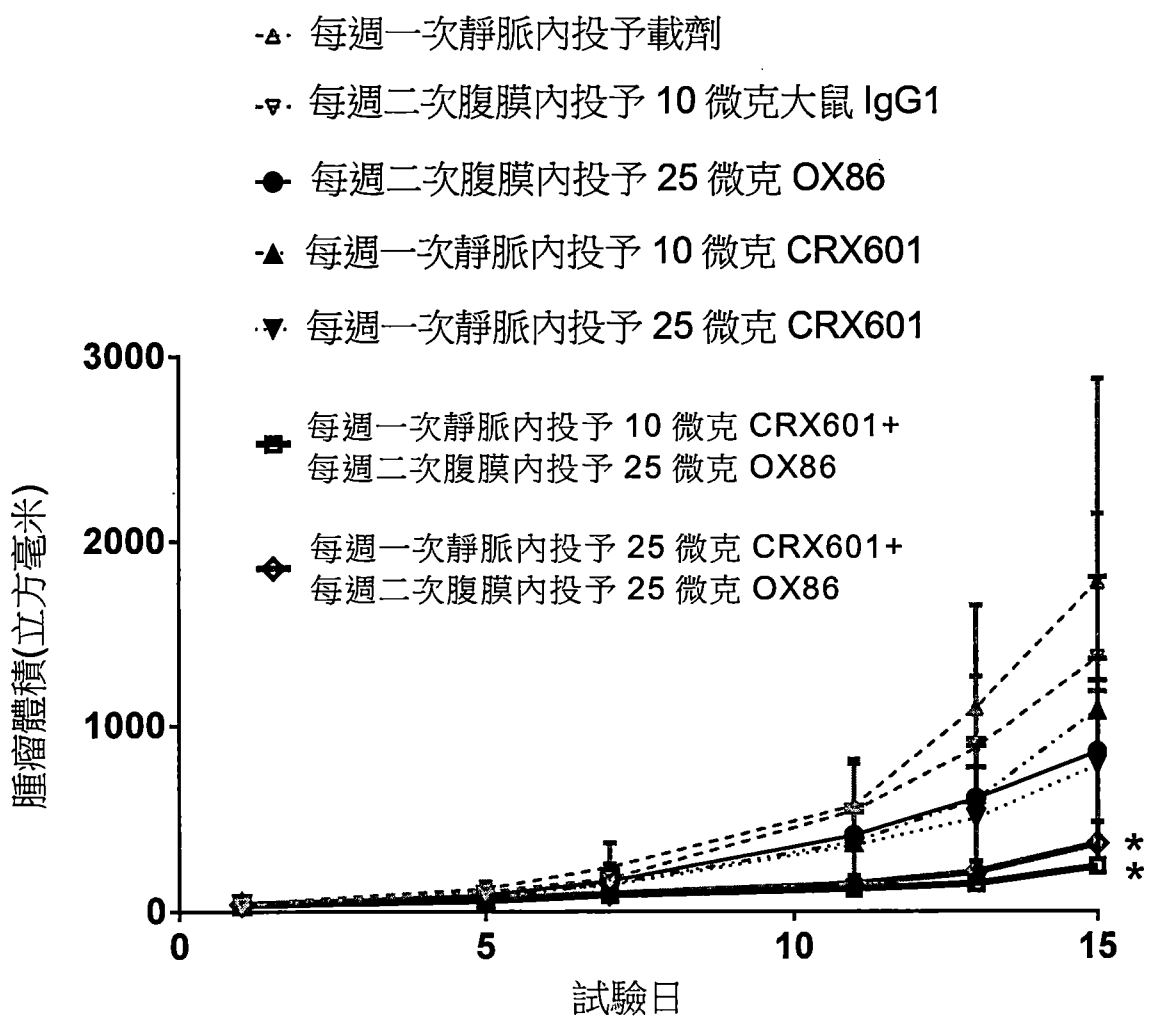


圖 23

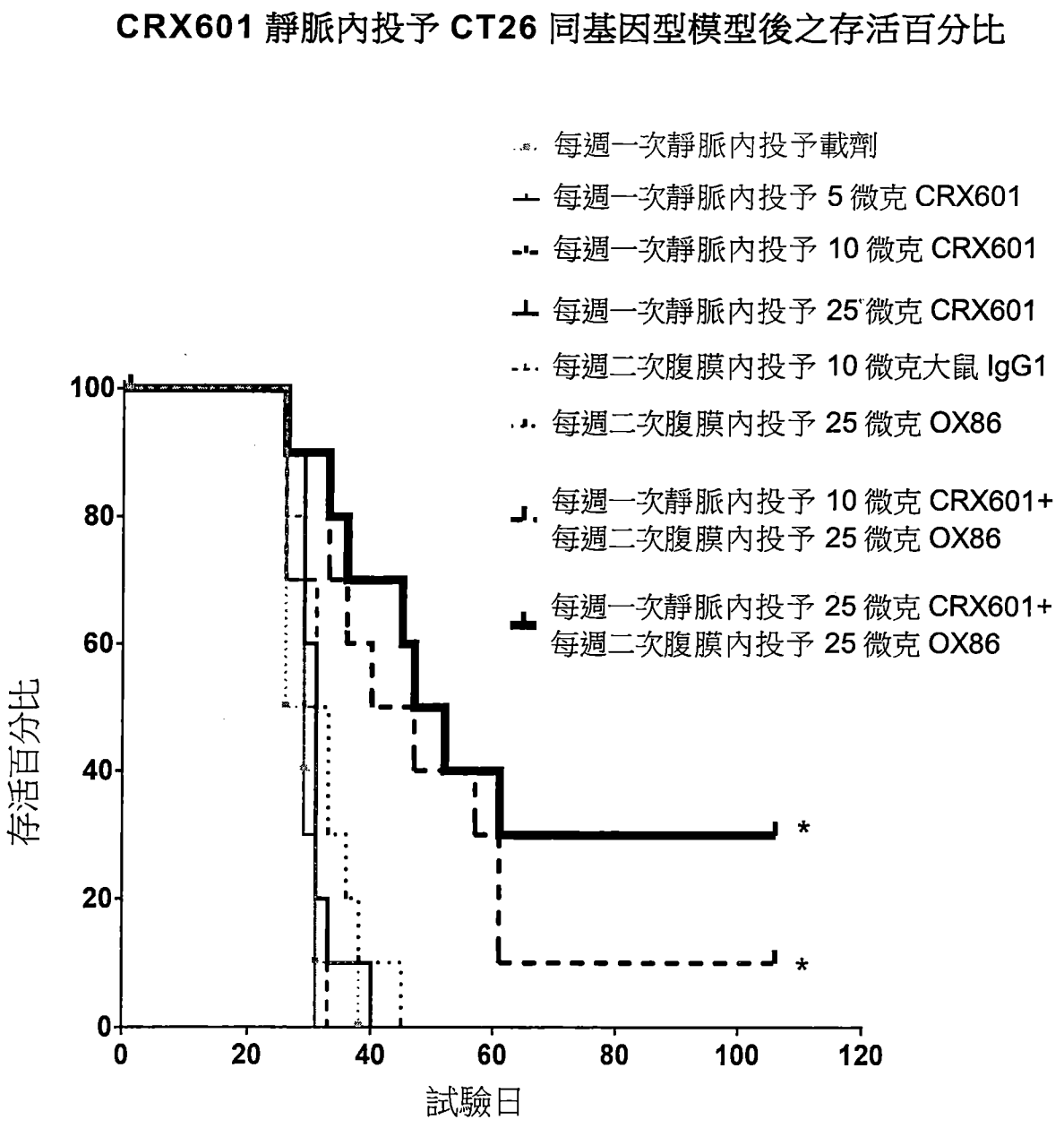

CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比
每週一次靜脈內投予載劑
每週一次靜脈內投予 5 微克 CRX601
每週一次靜脈內投予 10 微克 CRX601
每週一次靜脈內投予 25 微克 CRX601
每週二次腹膜內投予 10 微克大鼠 IgG1
每週二次腹膜內投予 25 微克 OX86
每週一次靜脈內投予 10 微克 CRX601+
每週二次腹膜內投予 25 微克 OX86
每週一次靜脈內投予 25 微克 CRX601+
每週二次腹膜內投予 25 微克 OX86
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
試驗日
*
*

圖 24

以 CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積

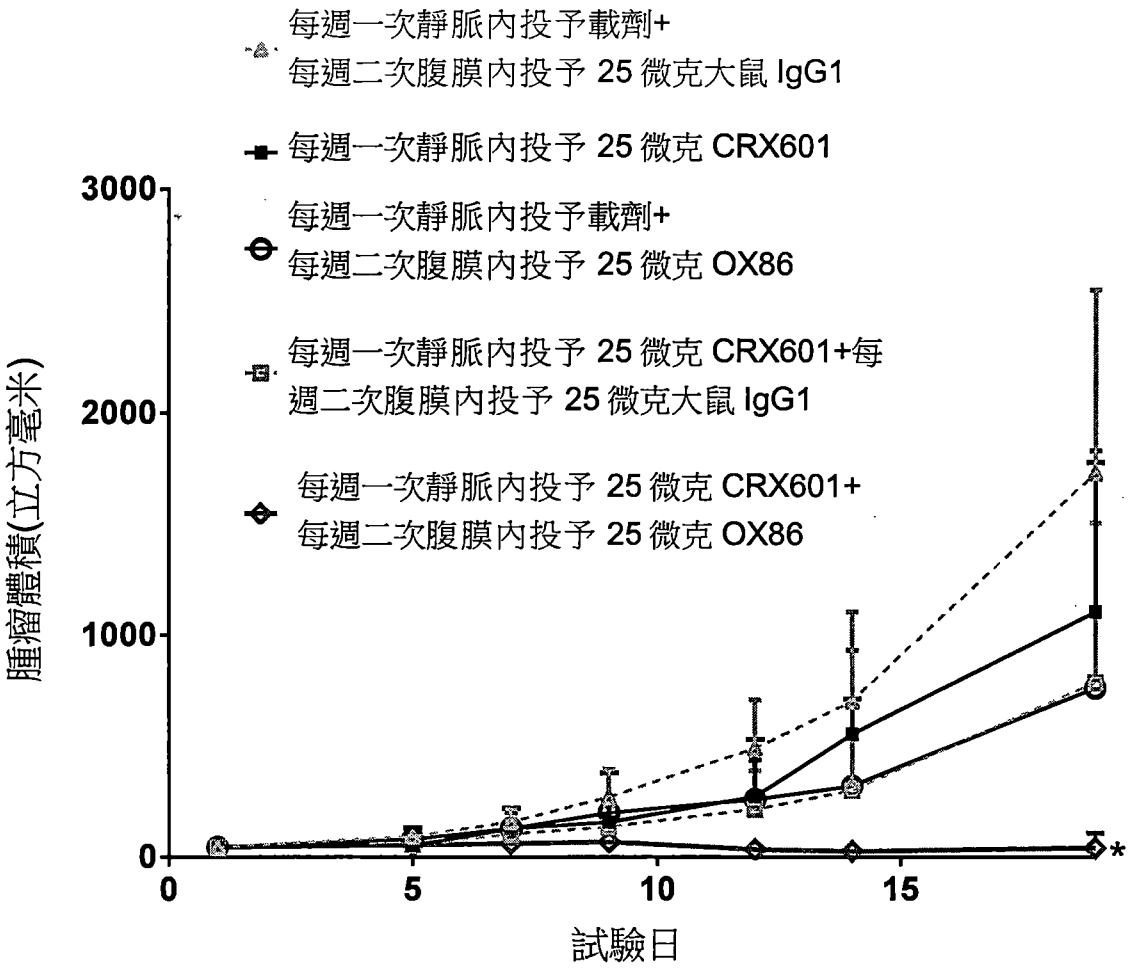


圖 25

CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比

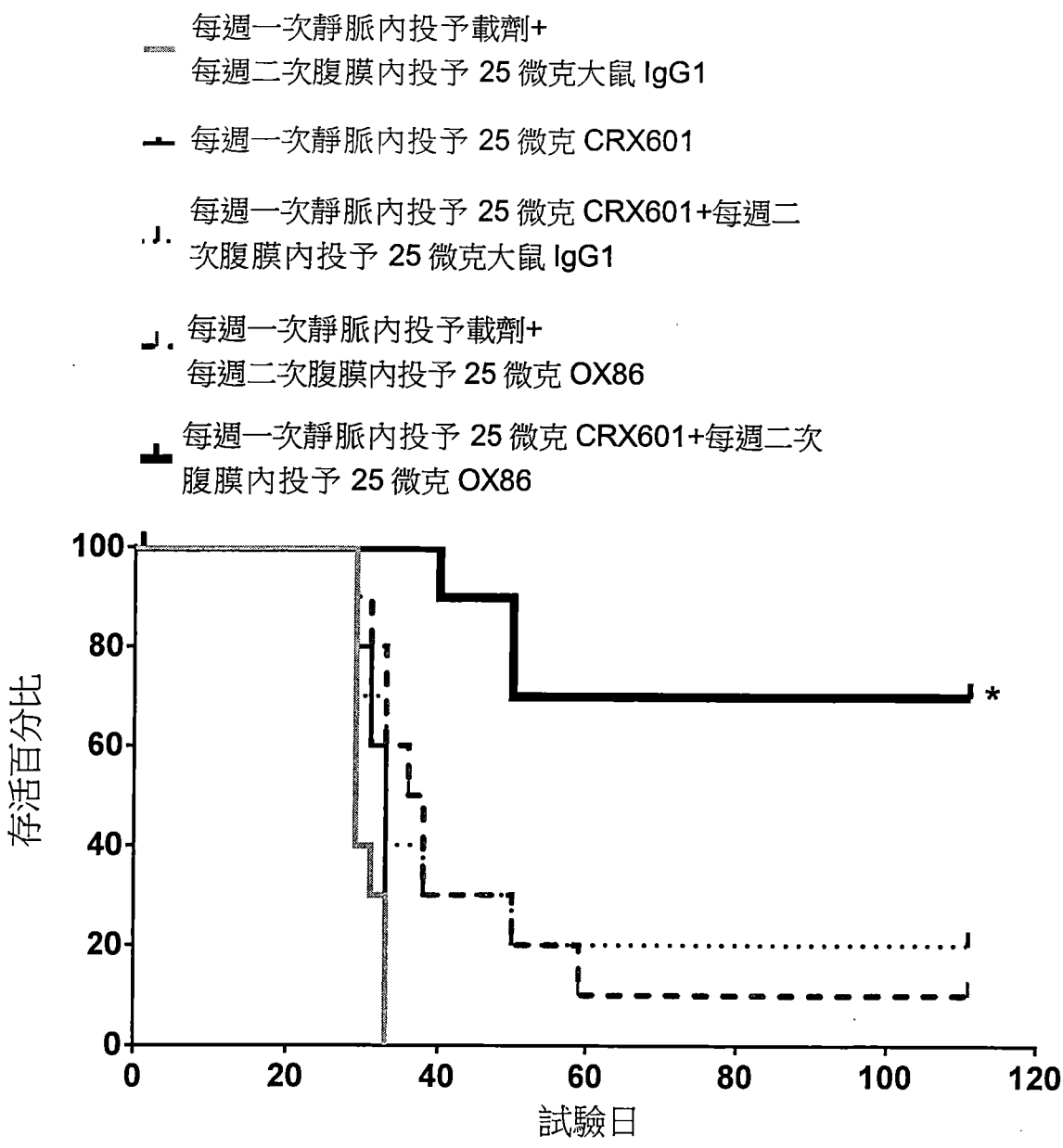


圖 26A

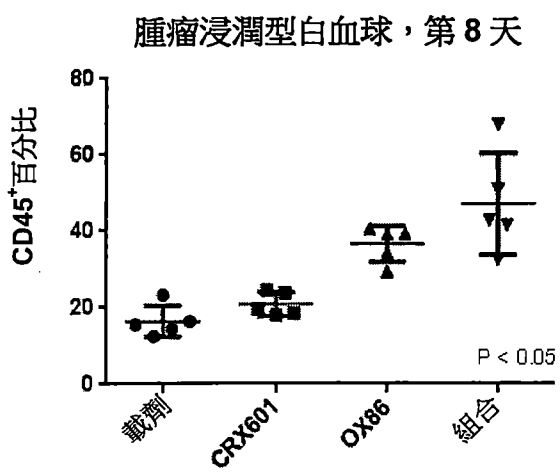


圖 26B

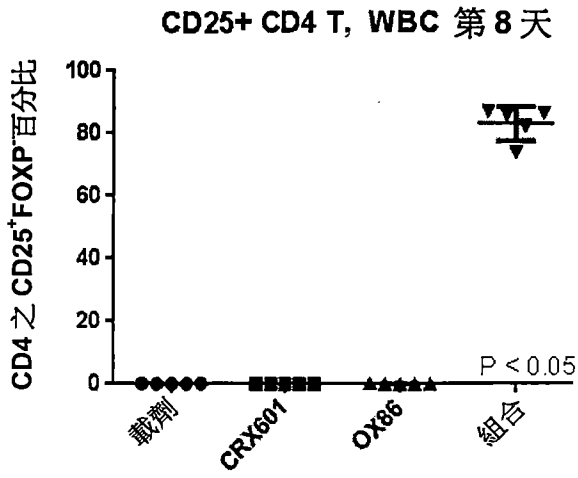
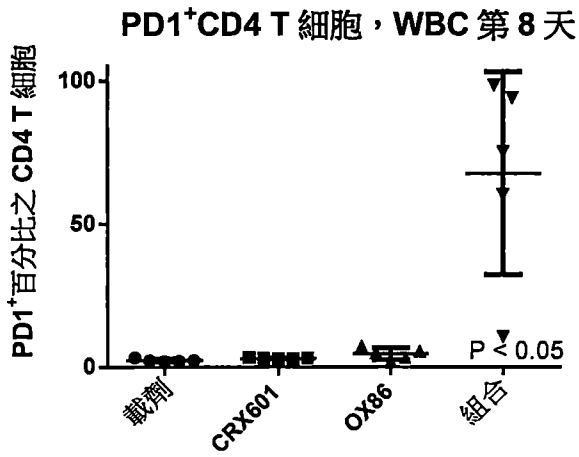
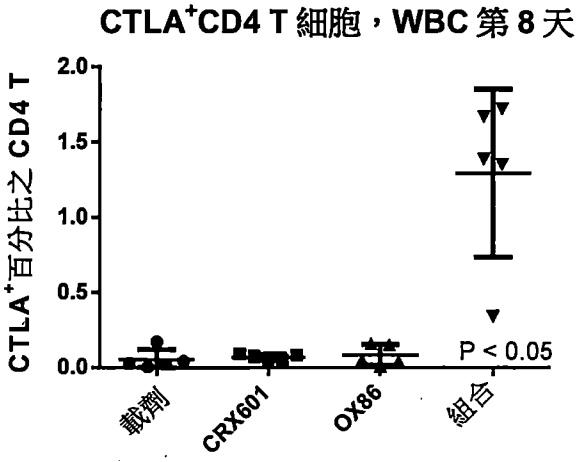


圖 26 C





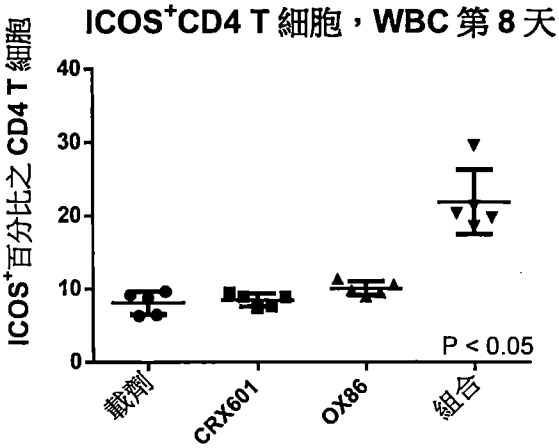


圖 27A

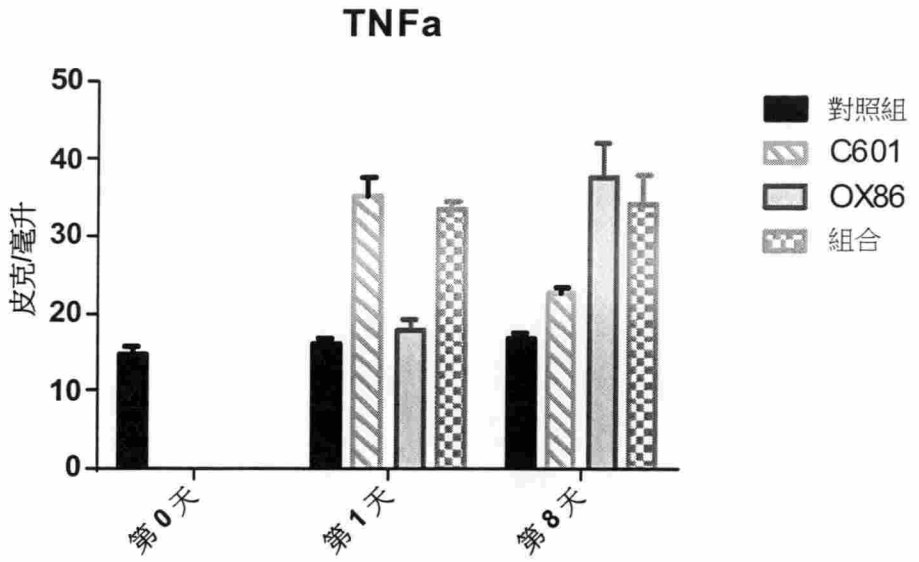

TNFa
50
40
30
20
10
0
皮克/毫升
第0天
第1天
第8天
對照組
C601
OX86
組合

圖 27B

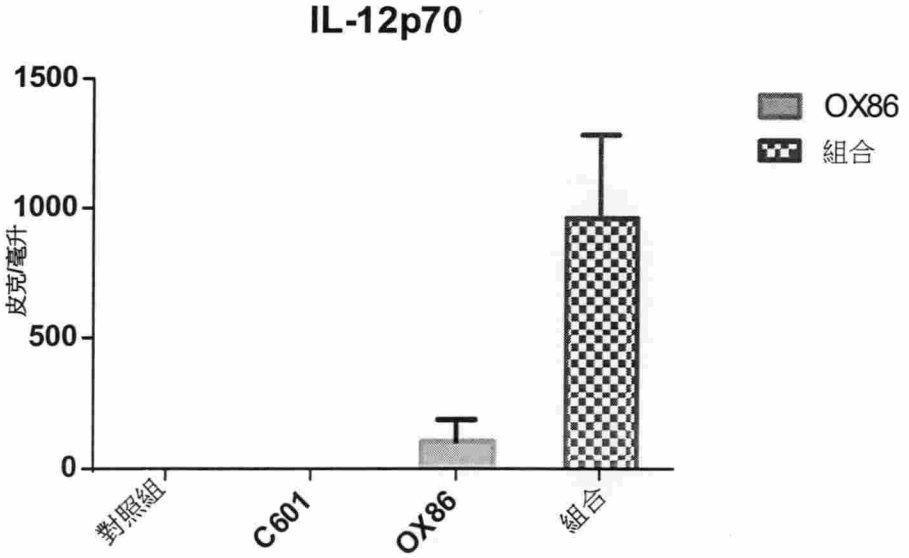
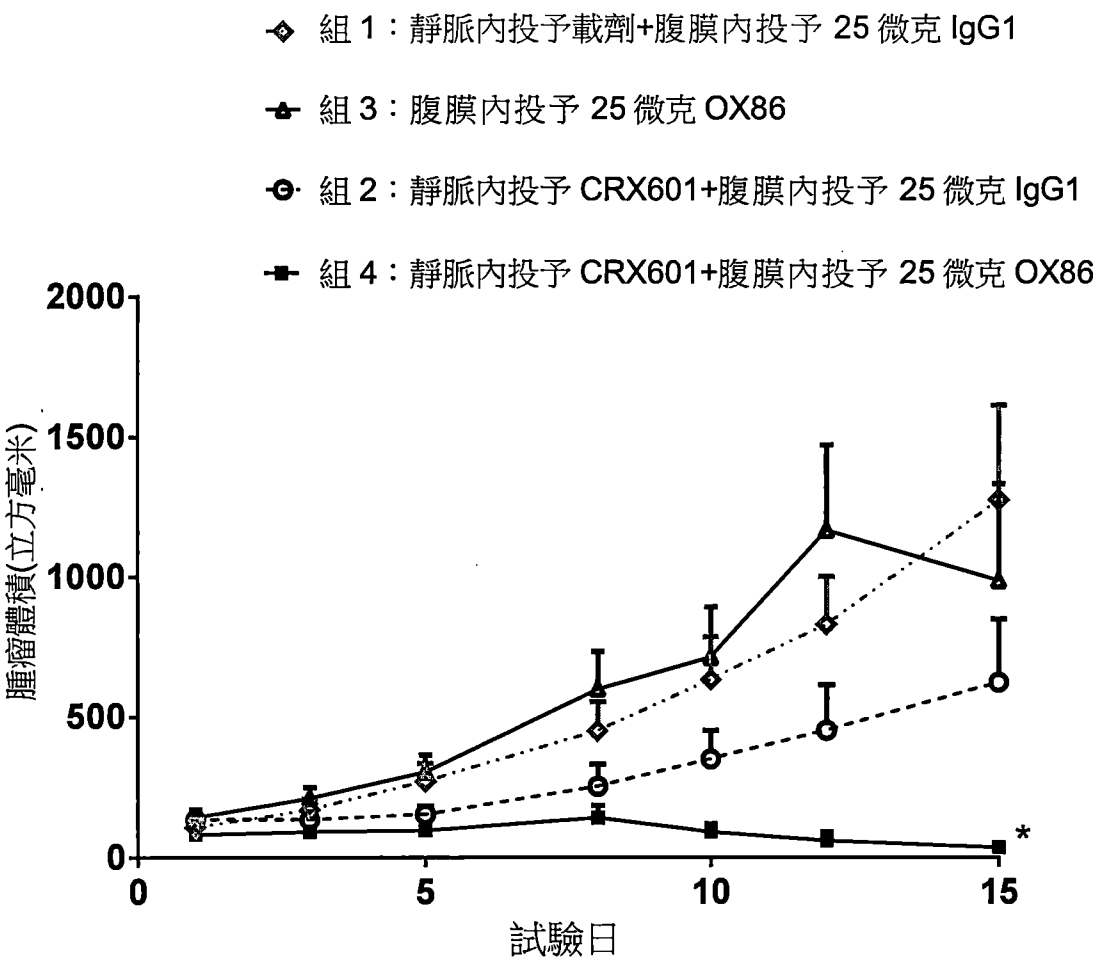

IL-12p70
1500
1000
500
0
皮克/毫升
對照組
C601
OX86
組合
OX86
組合

圖 28

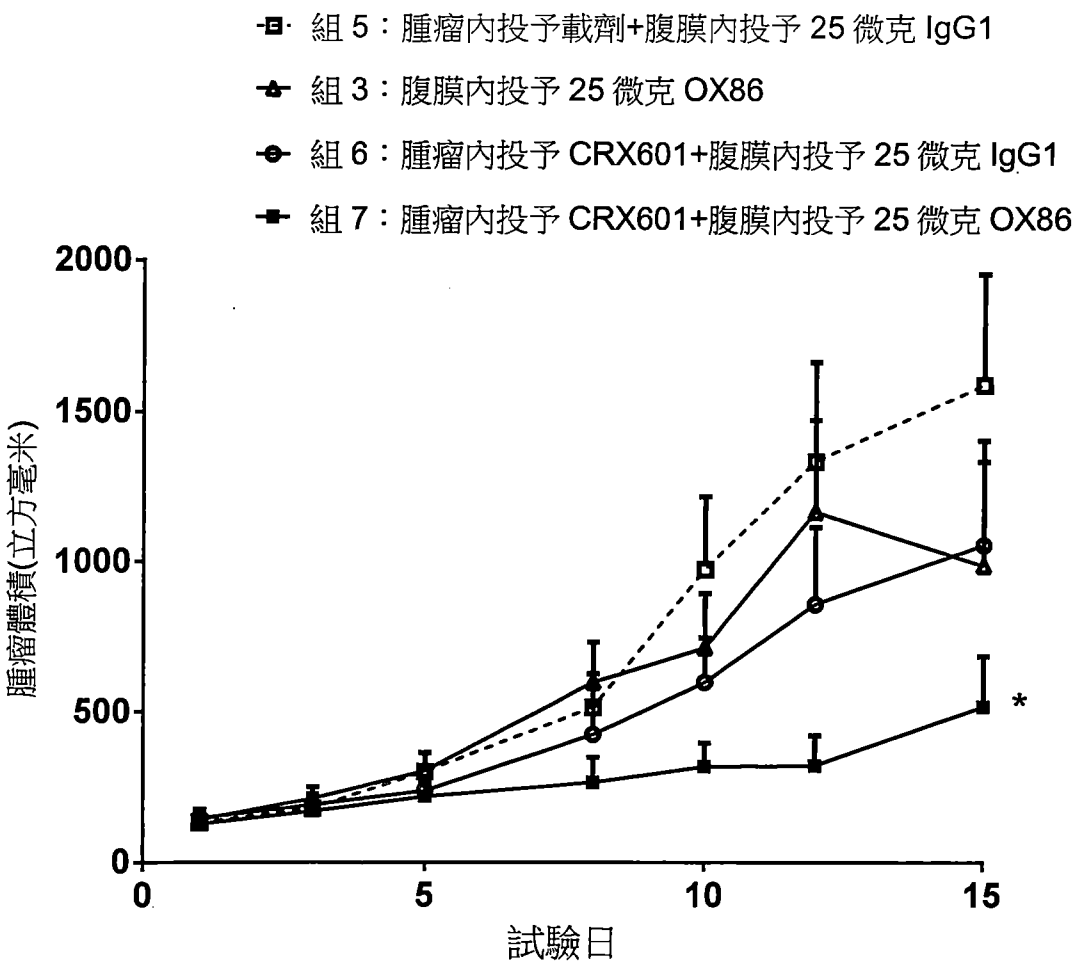
以 CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積



以組 4 比上組 1 及組 3，*p 值< 0.05。
以組 2 及組 3 之單一治療組比上組 1 之載劑對照組，不具顯著性。

圖 29

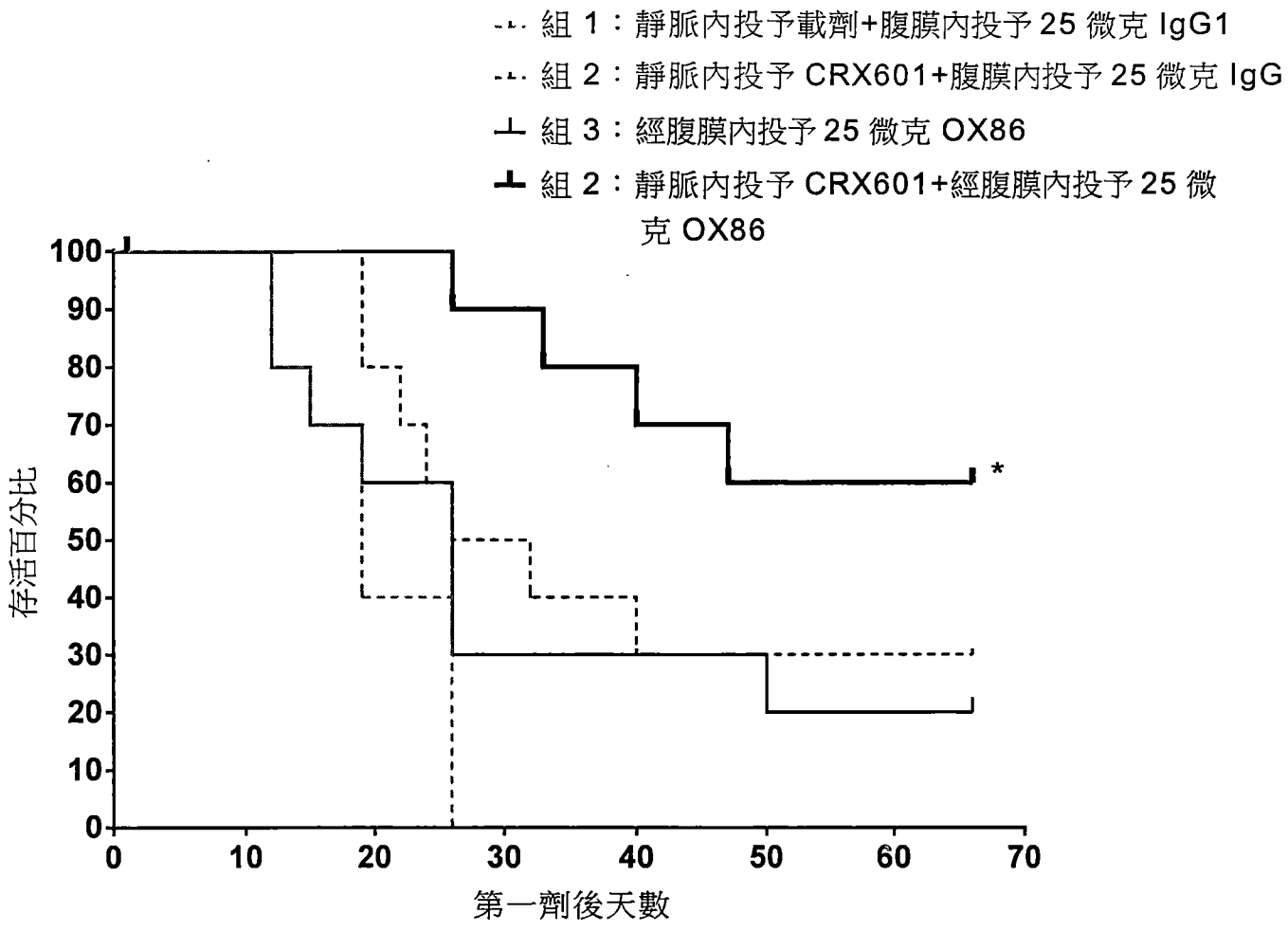
以 CRX601 腫瘤內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積



以組 7 比上組 5 及組 3，*p 值 < 0.05。
以組 3 及組 6 之單一治療組比上組 5 之載劑對照組，不具顯著性。

圖 30

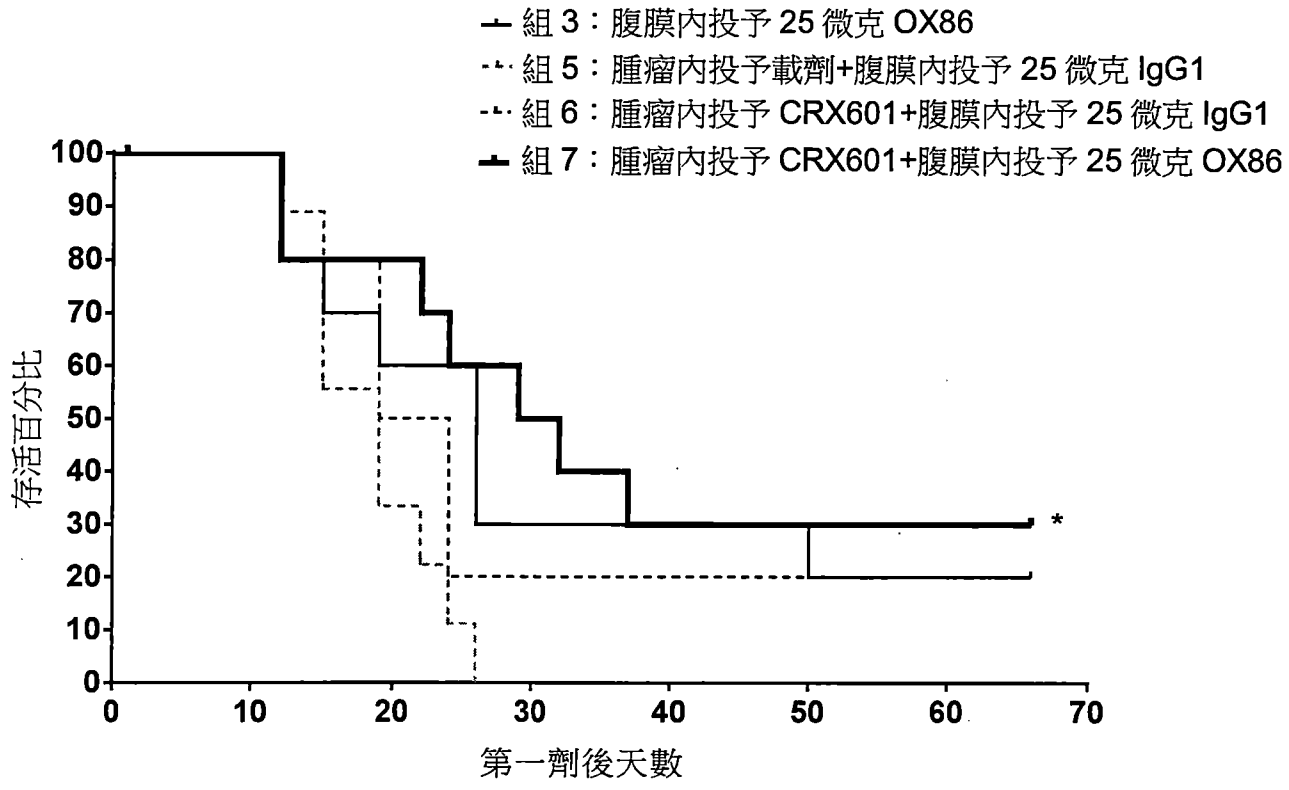
CRX601 經靜脈內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比



以組 4 比上組 1 及組 3，*p 值< 0.05。
以組 2 及組 3 之單一治療組比上組 1 之載劑對照組，不具顯著性。

圖 31

CRX601 腫瘤內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比



以組 7 組比上組 5，*p 值< 0.05。
以組 3 及組 6 之單一治療組比上組 5 之載劑對照組，不具顯著性。

圖 32

CRX601 靜脈注射或腫瘤注射投劑：
腫瘤再激發 CT26 同基因型模型

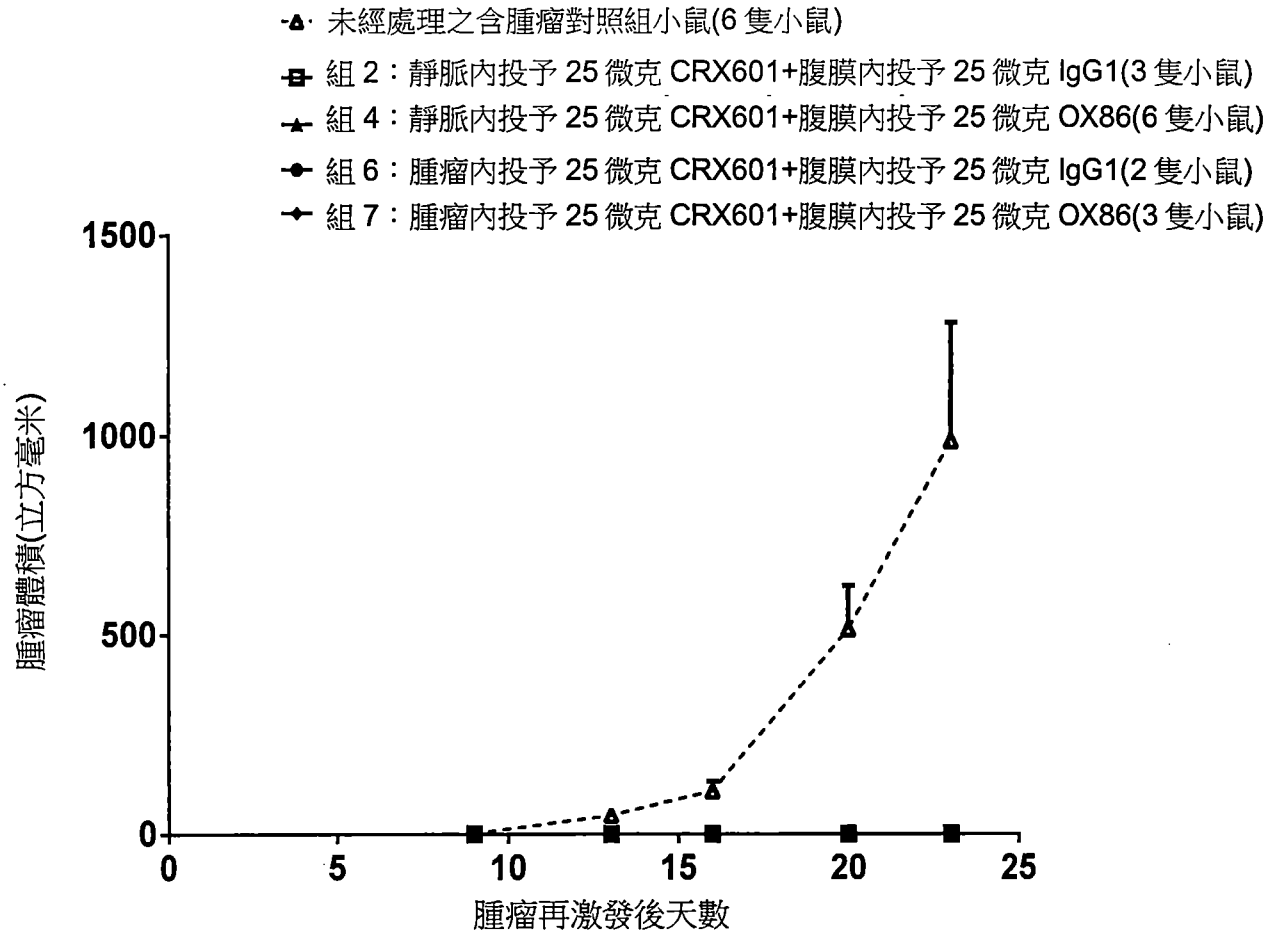
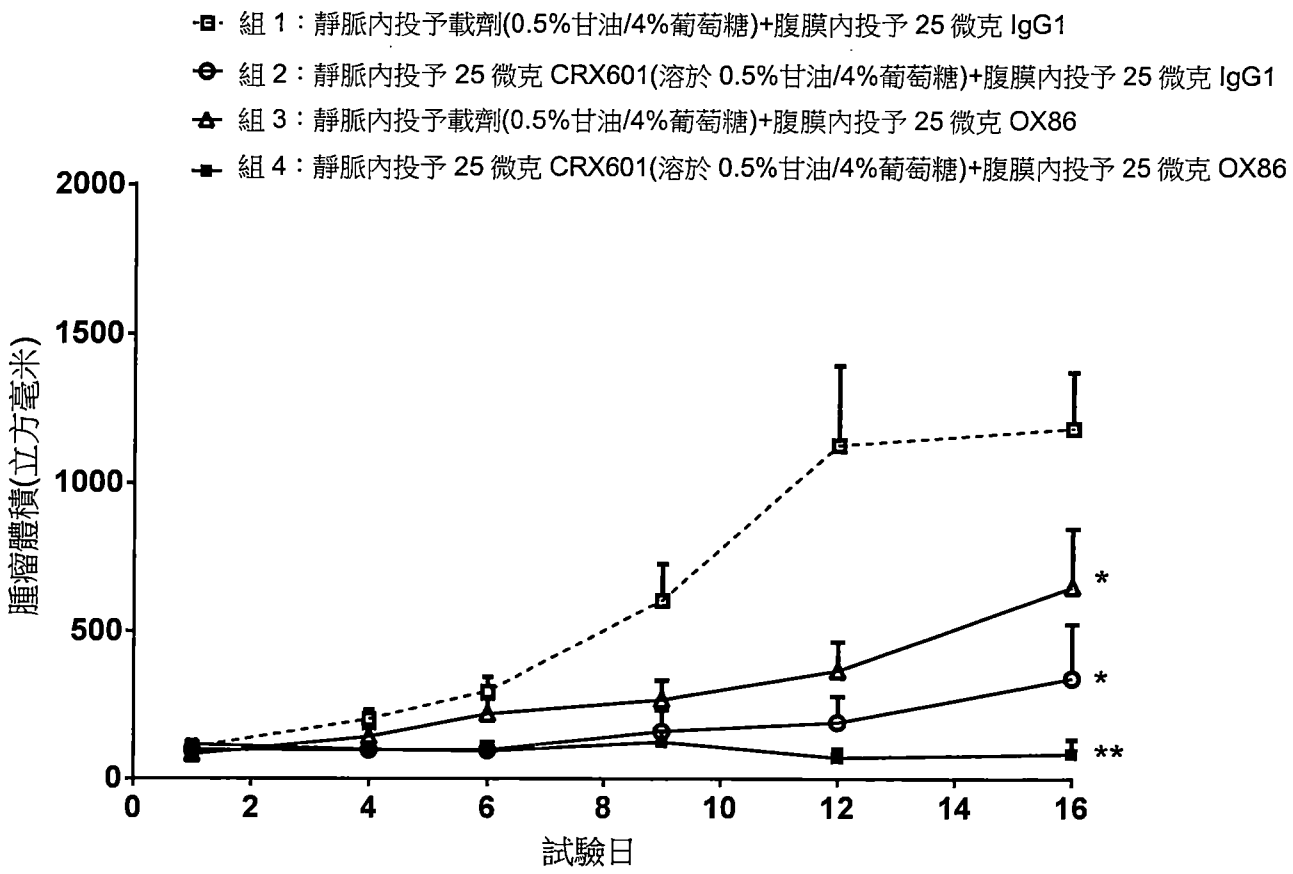


圖 33

試驗 7：以 CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積

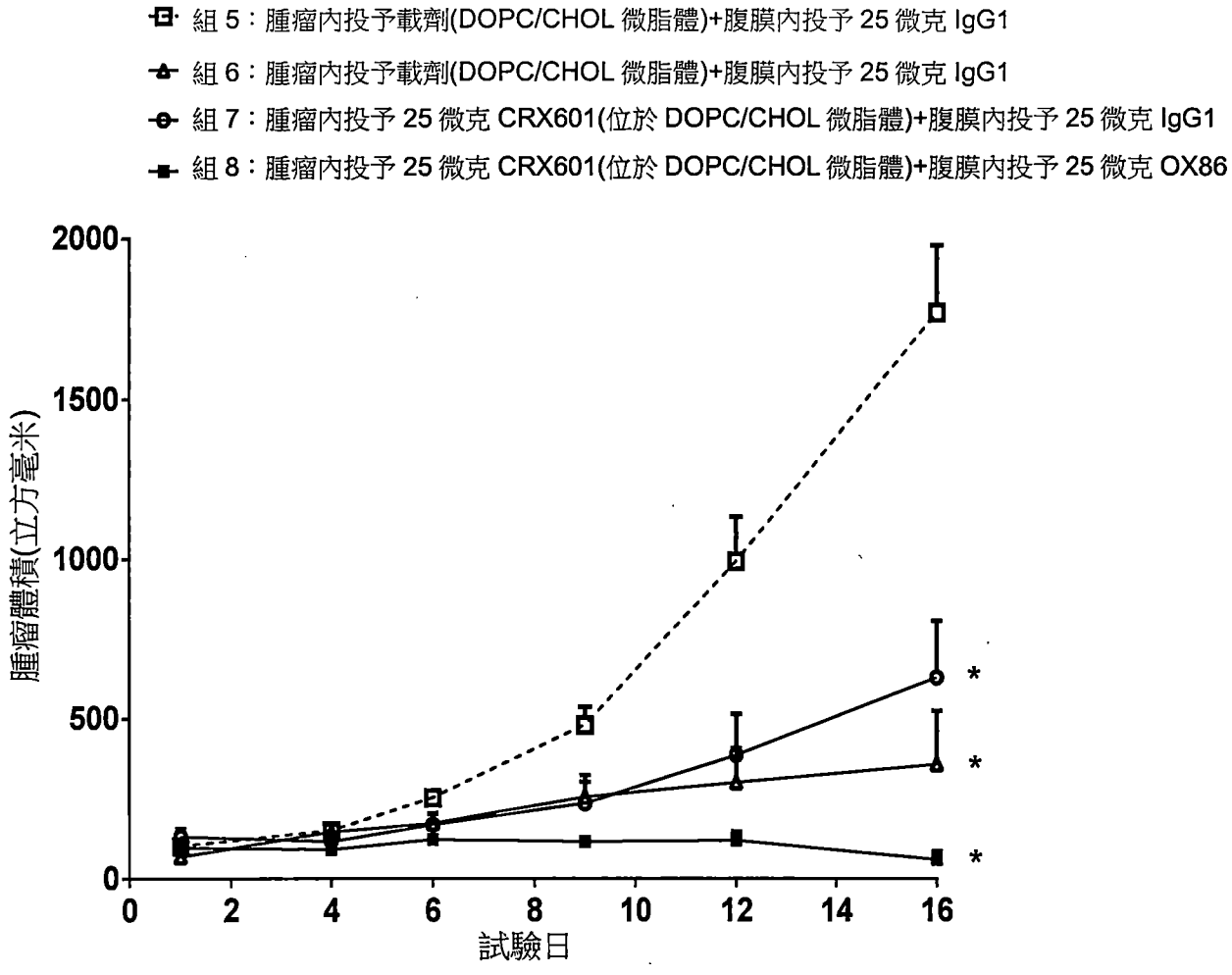


以組 4 比上組 1 及組 3，*p 值< 0.05。

以組 2 及組 3 之單一治療組比上組 1，*p 值< 0.05。

圖 34

試驗 7：以 CRX601 腫瘤內投予 CT26 同基因型模型之腫瘤體積



比上組 5，*p 值< 0.05。

圖 35

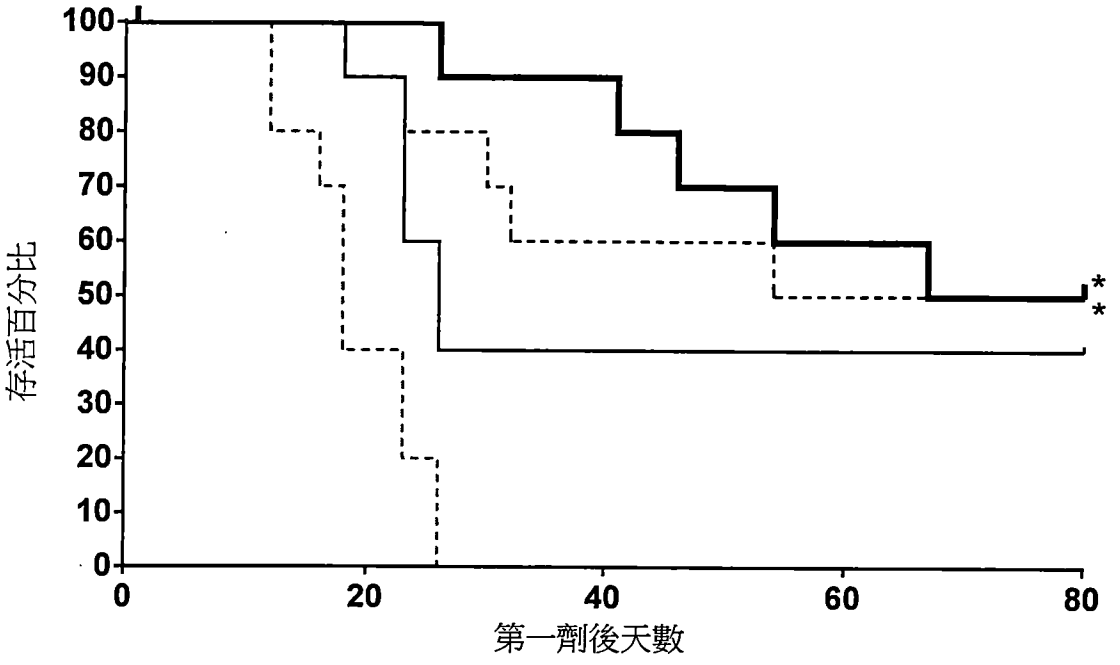
試驗 7：CRX601 靜脈內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比

組 1：靜脈內投予載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹膜內投予 25 微克 IgG1

組 2：靜脈內投予 25 微克 CRX601(溶於 0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹膜內投予 25 微克 IgG1

組 3：靜脈內投予載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹膜內投予 25 微克 OX86

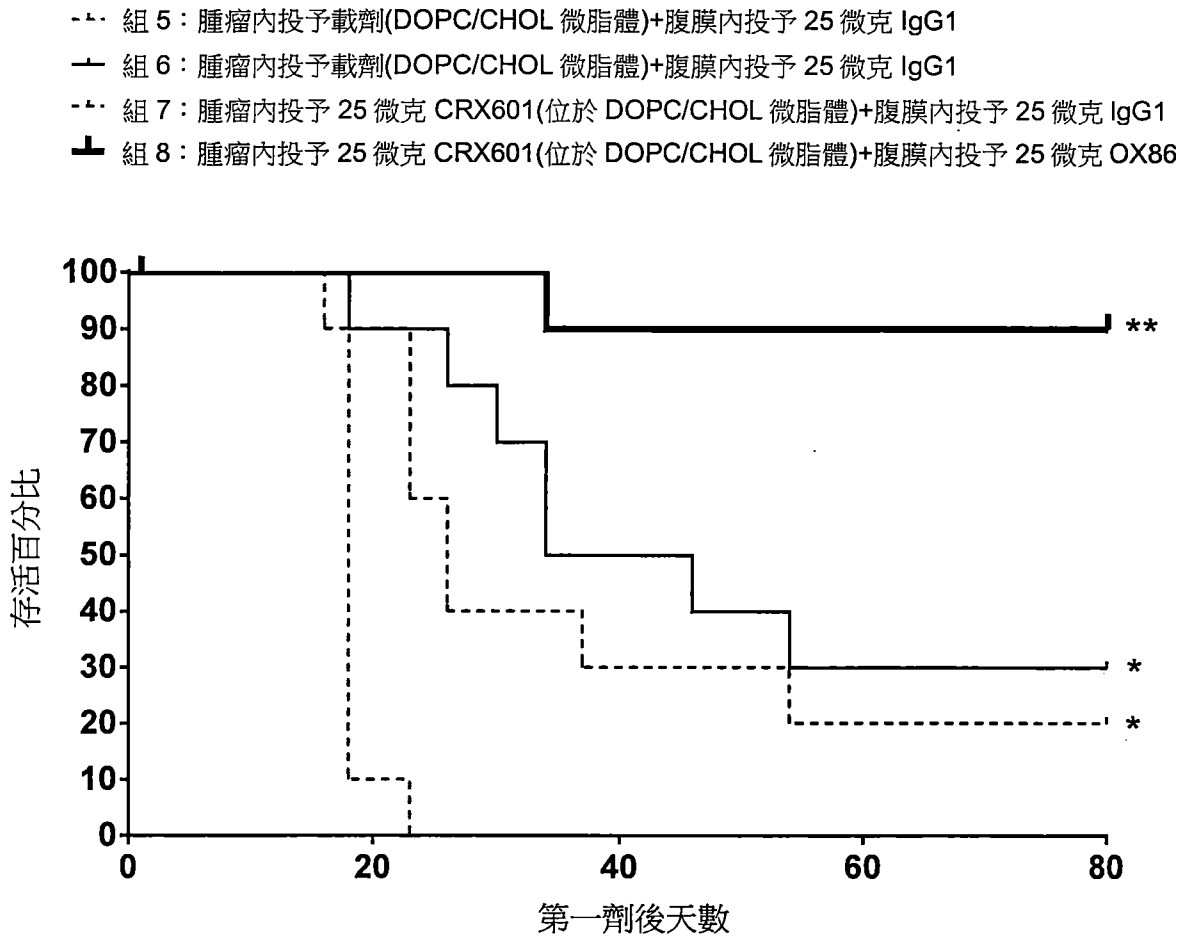
組 4：靜脈內投予 25 微克 CRX601(溶於 0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹膜內投予 25 微克 OX86



以組 4 及組 2 比上組 1，*p 值< 0.05。

圖 36

試驗 7：CRX601 腫瘤內投予 CT26 同基因型模型後之存活百分比



以組 8 比上組 5、組 6、組 7，**p 值< 0.05。
以組 6 及組 7 比上組 5，*p 值< 0.05。

圖 37

試驗 7：CRX601 靜脈內或腫瘤內投予：腫瘤再激發 CT26 同基因型模型

- 未經處理之含腫瘤對照組小鼠(10 隻小鼠)
- 組 2：靜脈內投予 25 微克 CRX601(0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹膜內投予 25 微克 IgG1(5 隻小鼠)
- 組 3：靜脈內投予載劑(0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹膜內投予 25 微克 OX86(4 隻小鼠)
- 組 4：靜脈內投予 25 微克 CRX601(0.5%甘油/4%葡萄糖)+腹腔注射 25 微克 OX86(5 隻小鼠)
- 組 6：腫瘤內投予載劑(DOPC/CHOL 微脂體)+腹膜內投予 25 微克 OX86(3 隻小鼠)
- 組 7：腫瘤投予 25 微克 CRX601(位於 DOPC/CHOL 微脂體)+腹膜內投予 25 微克 IgG1(2 隻小鼠)
- 組 8：腫瘤內投予 25 微克 CRX601(位於 DOPC/CHOL 微脂體)+腹膜內投予 25 微克 OX86(9 隻小鼠)

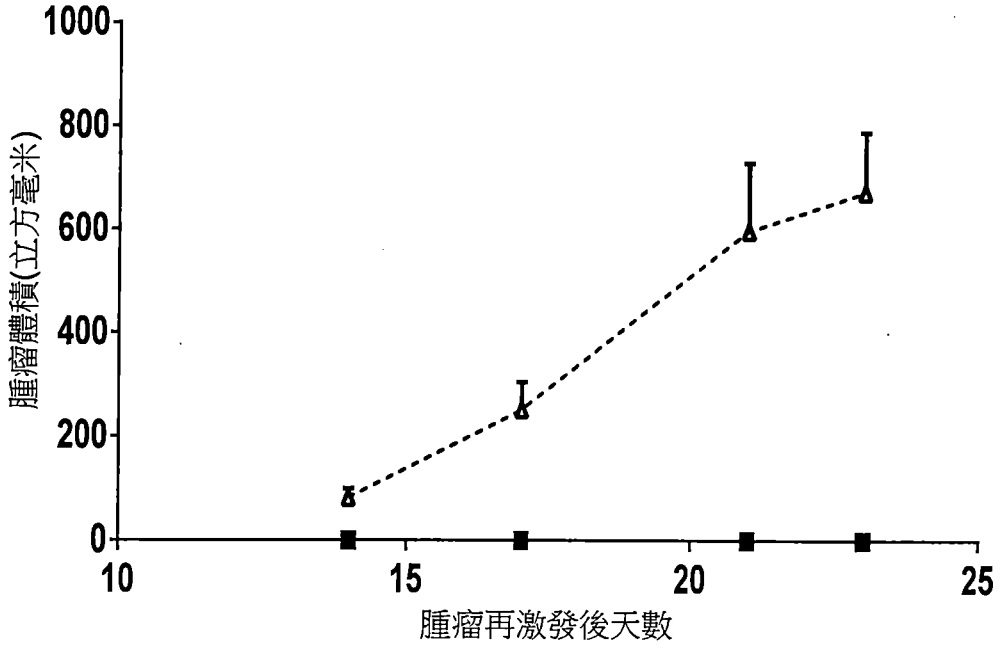


圖 38

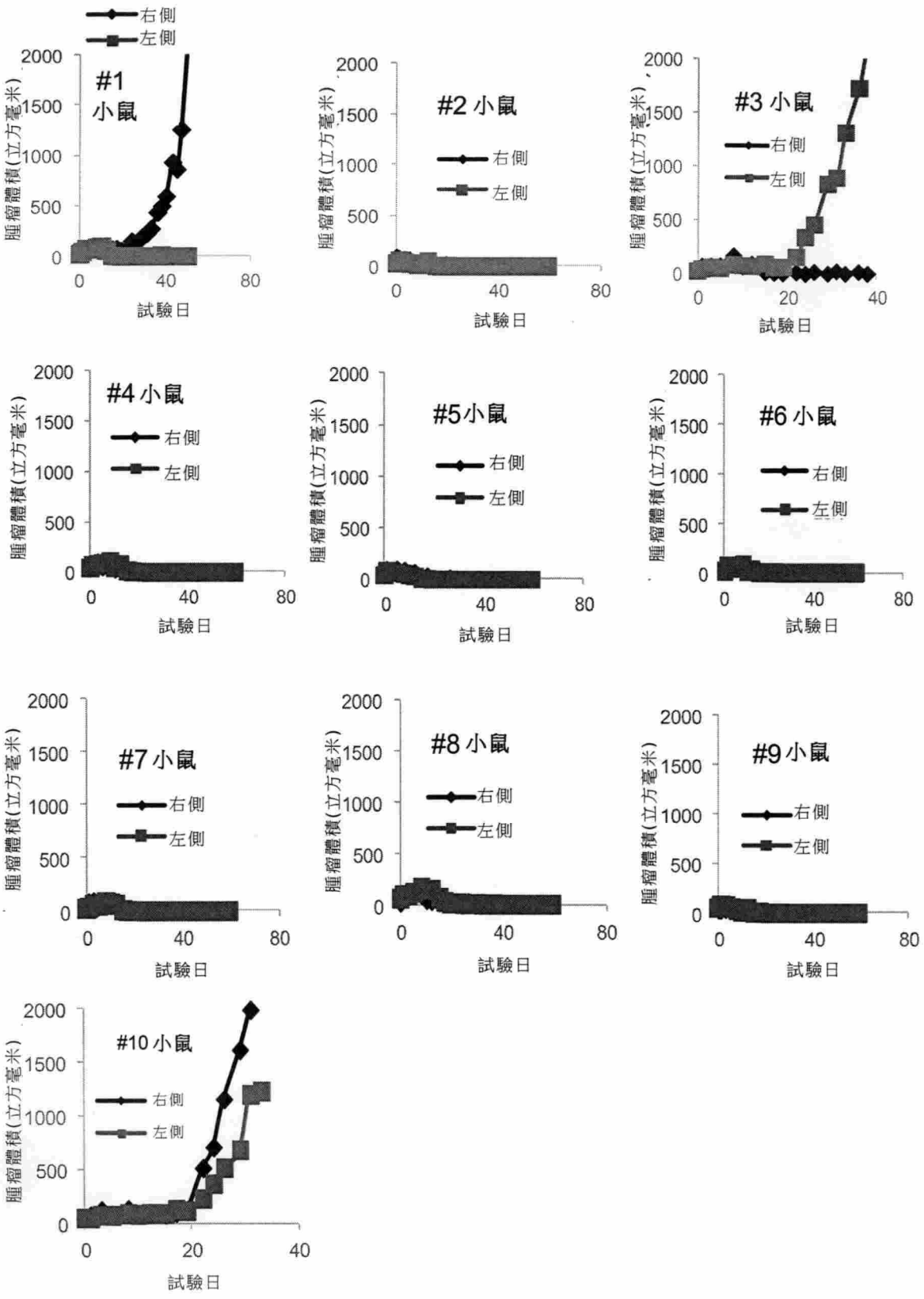

#1 小鼠
#2 小鼠
#3 小鼠
#4 小鼠
#5小鼠
#6 小鼠
#7 小鼠
#8 小鼠
#9 小鼠
#10 小鼠
右側
左側
腫瘤體積(立方毫米)
試驗日
0
500
1000
1500
2000
0
20
40
80

圖 39

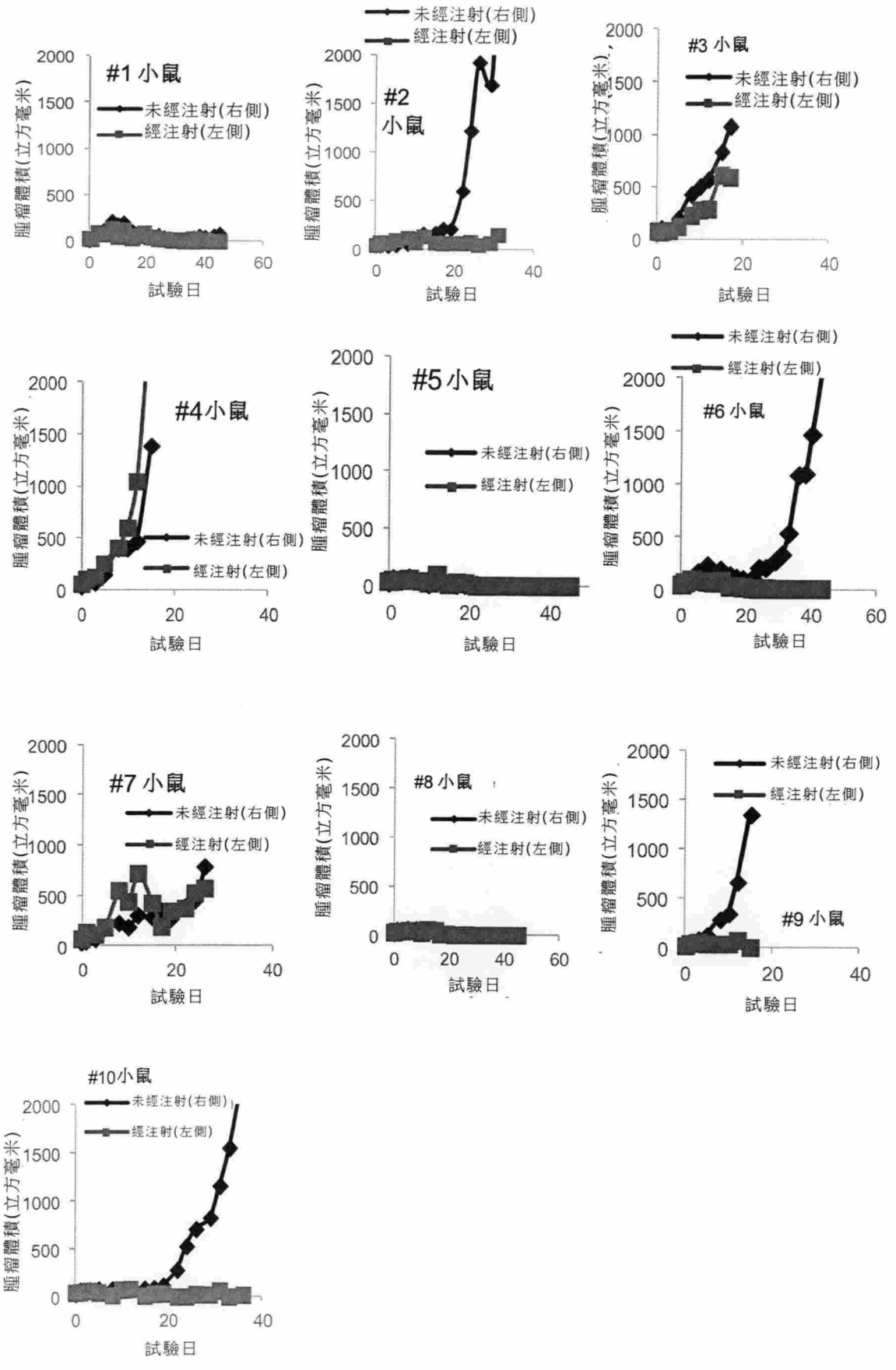

#1 小鼠
#2 小鼠
#3 小鼠
#4小鼠
#5 小鼠
#6 小鼠
#7 小鼠
#8 小鼠
#9 小鼠
#10小鼠
未經注射(右側)
經注射(左側)
腫瘤體積(立方毫米)
試驗日

圖 40

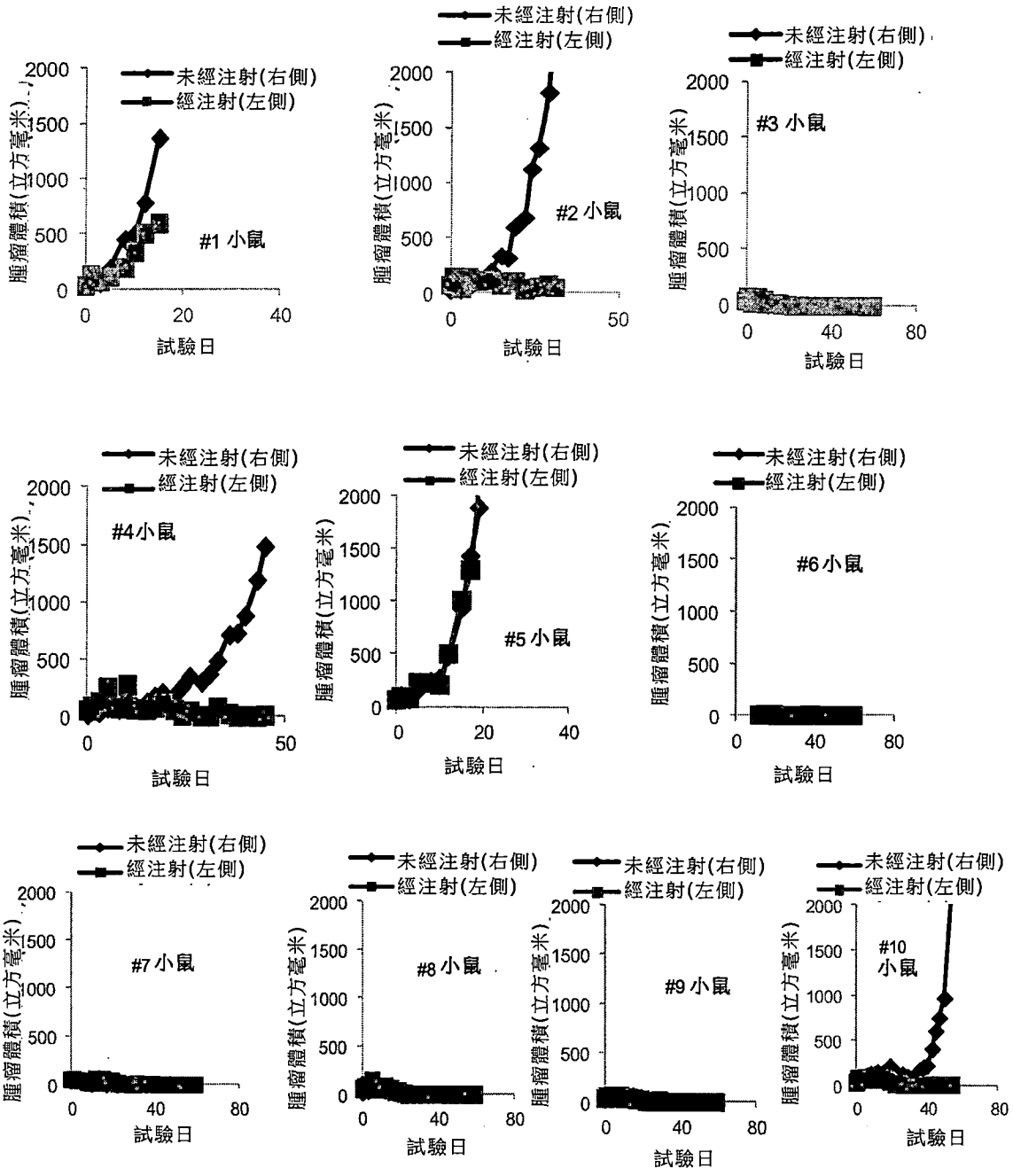

未經注射(右側)
經注射(左側)
腫瘤體積(立方毫米)
試驗日
#1 小鼠
#2 小鼠
#3 小鼠
#4小鼠
#5 小鼠
#6小鼠
#7 小鼠
#8 小鼠
#9 小鼠
#10
小鼠

圖 41A

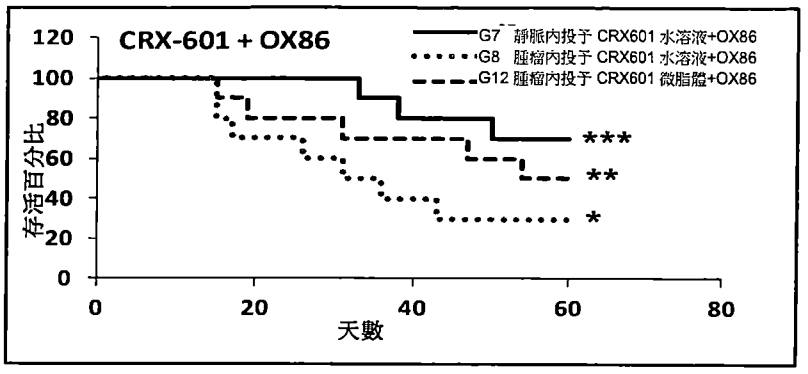


圖 41B

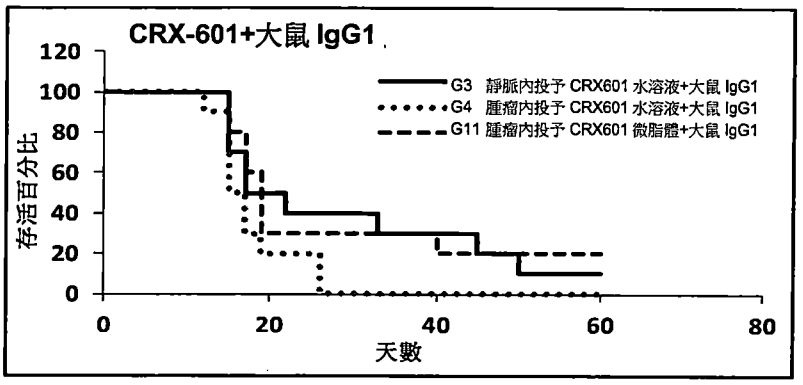


圖 41C

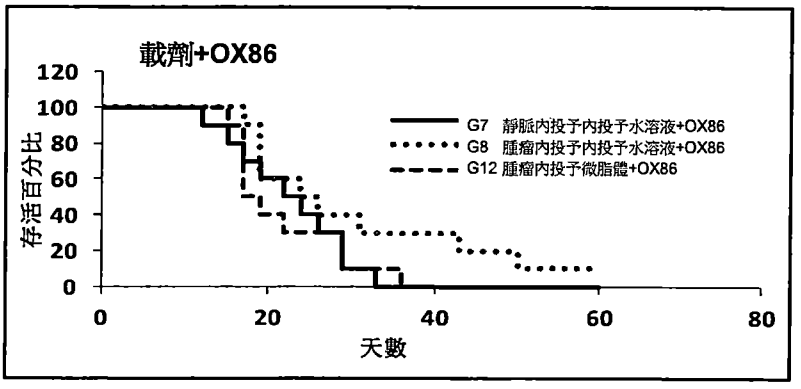


圖 41D

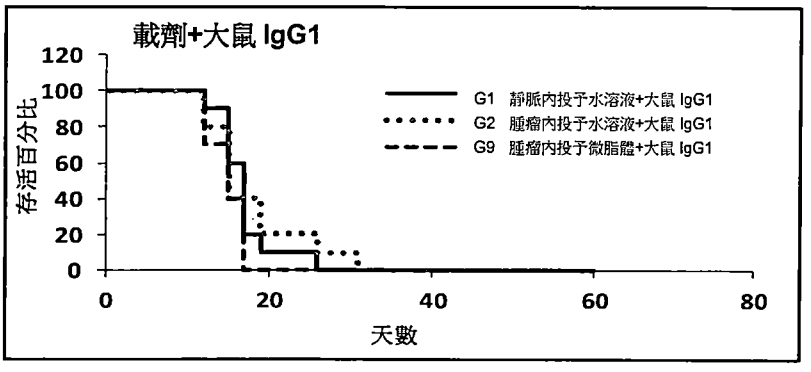


圖 42A

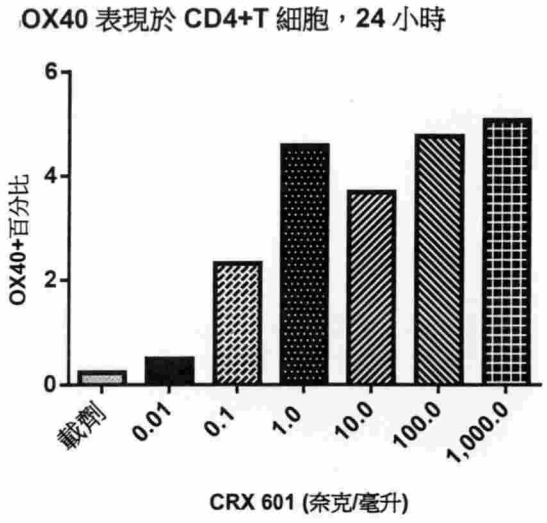


圖 42B

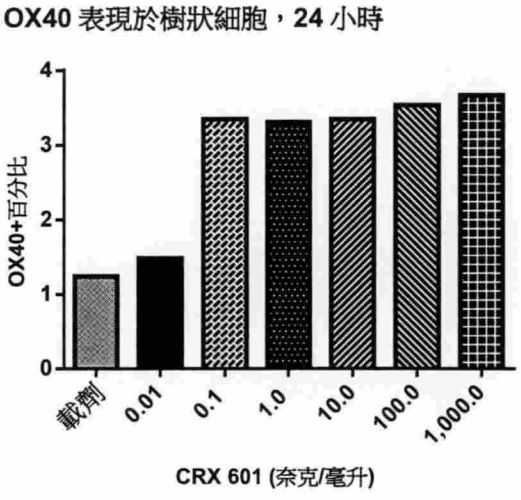
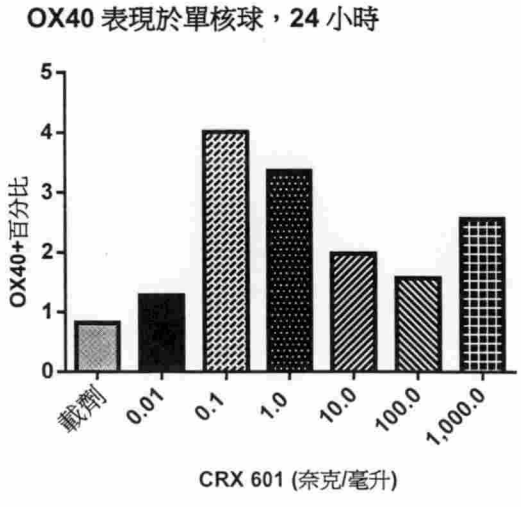



圖 42C