



(21)申請案號：109131037

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 10 日

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

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/09/11 美國

62/899,066

(71)申請人：加拿大商百靈佳殷格翰 I O 加拿大有限公司 (加拿大) BOEHRINGER INGELHEIM
IO CANADA, INC. (CA)

加拿大

(72)發明人：法蘭森 喬漢 FRANSSON, JOHAN (CA)；胡爾姆 喬安 HULME, JOANNE

(CA)；耶特 亞里夫 JEHTA, ARIF (CA)；麥格雷 A J 羅伯特 MCGRAY, AJ
ROBERT (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：51 項 圖式數：12 共 82 頁

(54)名稱

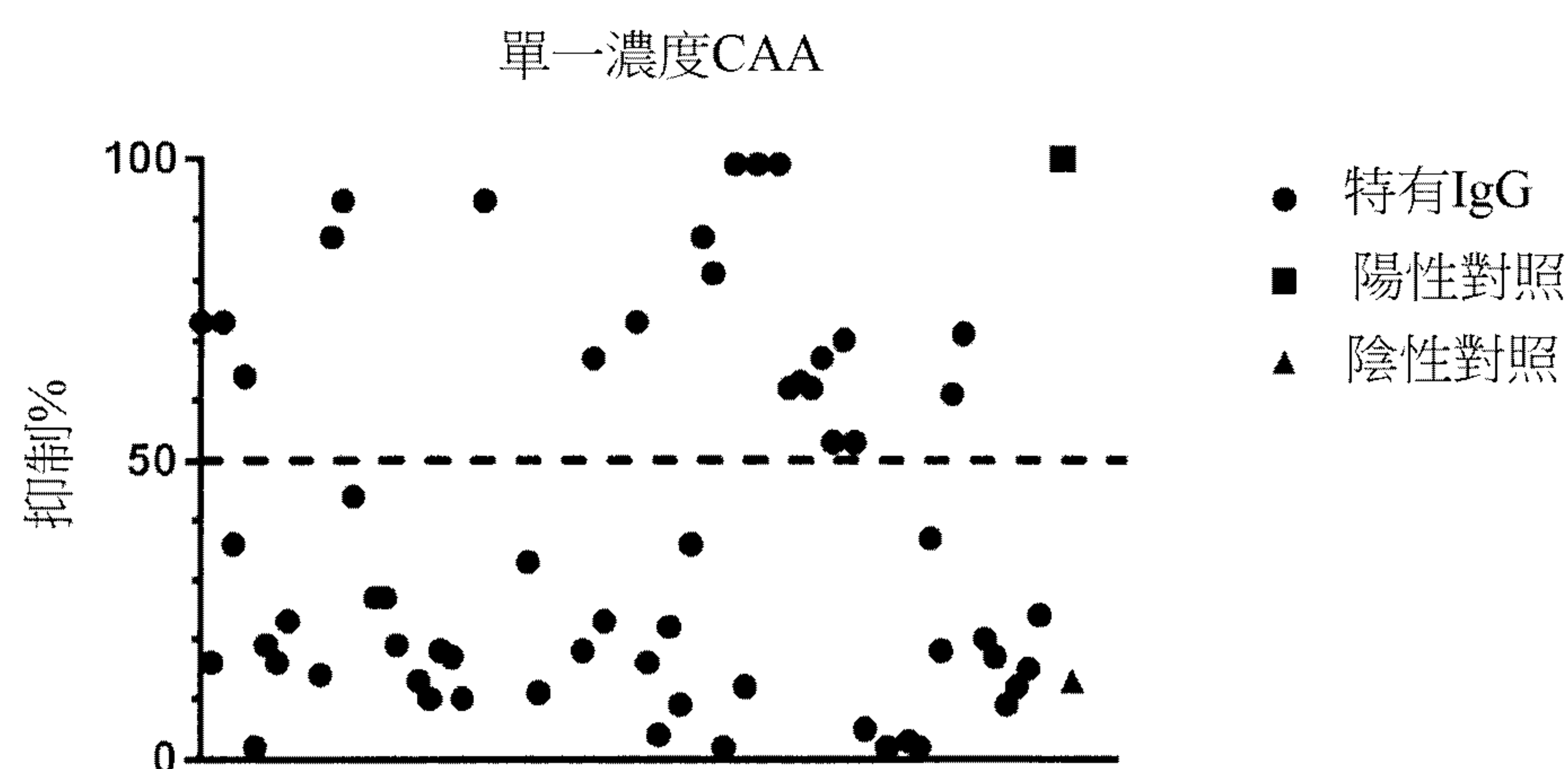
使用 PD-1 軸抑制劑及抗骨膜蛋白抗體治療癌症之方法

(57)摘要

本發明提供治療癌症之方法，其包含向個體投與(a) PD-1 軸抑制劑；及(b)骨膜蛋白抑制劑。

Described herein are methods of treating cancer comprising administering to the individual (a) a PD-1 axis inhibitor; and (b) an inhibitor of periostin.

指定代表圖：



【圖1】



202124432

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用PD-1軸抑制劑及抗骨膜蛋白抗體治療癌症之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING CANCER BY THE USE OF PD-1 AXIS
INHIBITORS AND ANTI-PERIOSTIN ANTIBODIES

【中文】

本發明提供治療癌症之方法，其包含向個體投與(a) PD-1軸抑制劑；
及(b)骨膜蛋白抑制劑。

【英文】

Described herein are methods of treating cancer comprising
administering to the individual (a) a PD-1 axis inhibitor; and (b) an
inhibitor of periostin.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用PD-1軸抑制劑及抗骨膜蛋白抗體治療癌症之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING CANCER BY THE USE OF PD-1 AXIS
INHIBITORS AND ANTI-PERIOSTIN ANTIBODIES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 骨膜蛋白為假設調節多種生理過程(包括上皮-間質轉化、細胞-基質相互作用及發炎)之基質細胞蛋白質。已顯示其表現在包括癌症及纖維化在內之若干病變中失調，其中骨膜蛋白之過度表現與負面結果相關。除藉由結合至其他基質細胞蛋白質(諸如纖維結合蛋白及膠原蛋白)來調節細胞外重塑之外，已顯示骨膜蛋白介導之整合素信號傳導對於癌細胞遷移及在致瘤環境中募集免疫細胞兩者均為至關重要的。

【發明內容】

【0002】 本文描述用於治療癌症之PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白抑制劑之方法、用途及組合。本文所描述之方法降低腫瘤之膠原蛋白含量，減少抑制性骨髓細胞群(諸如粒細胞及腫瘤相關巨噬細胞)之浸潤，同時增加巨噬細胞極化成M1表型，且提高腫瘤浸潤性T細胞之抗腫瘤特性。

【0003】 在一個態樣中，本文描述一種治療罹患癌症之個體之方法，該方法包含向該個體投與(a) PD-1軸抑制劑；及(b)骨膜蛋白抑制劑。在某些實施例中，骨膜蛋白抑制劑包含結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段。在某些實施例中，骨膜蛋白抑制劑包含結合骨膜蛋白之抗體或其抗

原結合片段，其中結合其骨膜蛋白之抗體或抗原結合片段包含：(a)包含SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR1 (CDR-H1)；(b)包含SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT)、3 (ISAYSGNT)、4 (ISAYQGNT)、5 (ISAYTGNT)或6 (ISAYDGNT)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR2 (CDR-H2)；(c)包含SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY)、8 (DVLVVPFDY)或9 (DMLVVPFDY)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR3 (CDR-H3)；(d)包含SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR1 (CDR-L1)；(e)包含SEQ ID NO: 11 (SND)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR2 (CDR-L2)胺基；及(f)包含SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR3 (CDR-L3)。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為嵌合的或人類化的。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為IgG抗體。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為Fab、F(ab)₂、單域抗體或單鏈可變片段(scFv)。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段包含免疫球蛋白重鏈及免疫球蛋白輕鏈：(a)其中免疫球蛋白重鏈包含與SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及(b)其中該免疫球蛋白輕鏈包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO: 13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO: 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠

纖維母細胞細胞進行之細胞黏附分析中，結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段之IC50小於約50奈莫耳濃度。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑，為結合至PD-1之抗體或其片段。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為結合至PD-1之抗體或其片段。

【0004】 PD-1路徑抑制劑在本發明之含義及其所有實施例中為抑制PD-1與其受體相互作用之化合物。PD-1路徑抑制劑能夠削弱PD-1路徑信號傳導，較佳由PD-1受體介導之信號傳導。PD-1抑制劑可為針對能夠拮抗PD-1路徑信號傳導之PD-1路徑之任何成員之任何抑制劑。抑制劑可為靶向PD-1路徑之任何成員之拮抗性抗體，較佳針對PD-1受體、PD-L1或PD-L2。另外，PD-1路徑抑制劑可為PD-1受體之片段或阻斷PD1配位體之活性的PD-1受體。

【0005】 PD-1拮抗劑在此項技術中為熟知的，例如由Li等人, Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1151(以引用之方式併入本文中)所綜述。根據本發明，可使用任何PD-1拮抗劑(尤其抗體)(諸如Li等人所揭示之彼等抗體)以及本文下文所揭示之其他抗體。較佳地，本發明之PD-1拮抗劑及其所有實施例選自由以下抗體組成之群：派姆單抗(pembrolizumab) (抗PD-1抗體)；納武單抗(nivolumab) (抗PD-1抗體)；皮立珠單抗(pidilizumab) (抗PD-1抗體)；替雷利珠單抗(tislelizumab) (抗PD-1)；斯巴達珠單抗(spartalizumab) (PDR-001) (抗PD-1抗體)；較佳埃本柎單抗(ezabenlimab) (抗PD-1抗體)。

【0006】 在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體。在某些非限制性實施例中，特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體包含德瓦魯單抗(durvalumab)、阿特珠單抗(atezolizumab)、阿維魯

單抗(avelumab)、AMP-224、MEDI0680 (AMP-514)、BMS-936559 (MDX-1105)、特瑞普利單抗(toripalimab) (JS001-PD-1)、西米普利單抗(cemiplimab) (REGN2810)、卡瑞利珠單抗(camrelizumab) (SHR-1210)、多塔利單抗(dostarlimab) (TSR-042)、西利單抗(cetrelimab) (JNJ-63723283) 或FAZ053或其PDL-1或PDL-2結合片段。在某些實施例中，PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含結合PD-1、PDL-1或PDL-2之Fc融合蛋白質。在某些實施例中，Fc融合蛋白質包含AMP-224或其PD-1結合片段。在某些實施例中，PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含PD-1、PDL-1或PDL-2之小分子抑制劑。在某些實施例中，經由PD-1、PDL-1或PDL-2進行之信號傳導之小分子抑制劑包含以下中之一或多者：N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)胺基]乙基}乙醯胺 (BMS 202)；(2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)-5-甲基苯甲基)-D-絲胺酸鹽酸鹽；(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)苯甲基)-4-羥基吡咯啶-2-甲酸；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶；L- α -麩胺酸、N2,N6-雙(L-絲胺醯基-L-天冬醯胺醯基-L-蘇胺醯基-L-絲胺醯基-L- α -麩胺醯基-L-絲胺醯基-L-苯基丙胺醯基)-L-離胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-精胺醯基-L-纈胺醯基-L-蘇胺醯基-L-麩胺醯基-L-白胺醯基-L-丙胺醯基-L-脯胺醯基-L-離胺醯基-L-丙胺醯基-L-麩胺醯基-L-異白胺醯基-L-離胺醯基；(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-吡啶甲酸；甘胺醯胺，N-(2-巰基乙醯基)-L-苯基丙胺醯基-N-甲基-L-丙胺醯基-L-天冬醯胺醯基-L-脯

胺醯基-L-組胺醯基-L-白胺醯基-N-甲基甘胺醯基-L-色胺醯基-L-絲胺醯基-L-色胺醯基-N-甲基-L-正白胺醯基-N-甲基-L-正白胺醯基-L-精胺醯基-L-半胱胺醯基-，環(1→14)-硫醚；或其衍生物或類似物。

【0007】 在某些實施例中，在用呈單一療法形式之檢查點抑制劑治療之後，個體已罹患進行性疾病。在某些實施例中，檢查點抑制劑包含PD-1進入抑制劑。在某些實施例中，分開投與PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白抑制劑。在某些實施例中，在同一天投與PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白抑制劑。在某些實施例中，不在同一天投與PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白抑制劑。在某些實施例中，癌症包含神經膠母細胞瘤、胰臟癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、頭頸癌、卵巢癌、結腸癌、子宮頸癌、前列腺癌或肺癌。

【0008】 在另一態樣中，本文描述結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段，其用於亦用PD-1軸抑制劑進行治療之患者中。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段包含：(a)包含SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR1 (CDR-H1)；(b)包含SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT)、3 (ISAYSGNT)、4 (ISAYQGNT)、5 (ISAYTGNT)或6 (ISAYDGNT)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR2 (CDR-H2)；(c)包含SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY)、8 (DVLVVPFDY)或9 (DMLVVPFDY)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR3 (CDR-H3)；(d)包含SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR1 (CDR-L1)；(e)包含SEQ ID NO: 11 (SND)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR2 (CDR-L2)胺基；及(f)包含SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR3 (CDR-L3)。

【0009】 在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為嵌合的或人類化的。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為IgG抗體。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為Fab、F(ab)₂、單域抗體或單鏈可變片段(scFv)。在某些實施例中，結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段包含免疫球蛋白重鏈及免疫球蛋白輕鏈：(a)其中該免疫球蛋白重鏈包含與13中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及(b)其中該免疫球蛋白輕鏈包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO: 13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO: 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞細胞進行之細胞黏附分析中，結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段之IC₅₀小於約50奈莫耳濃度。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑，為結合至PD-1之抗體或其片段。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為結合至PD-1之抗體或其片段。在某些實施例中，該結合至PD-1之抗體或其片段包含派姆單抗、納武單抗、AMP-514、替雷利珠單抗、斯巴達珠單抗，較佳埃本柎單抗或其PD-1結合片段。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體。在某些實施例中，特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體包含德瓦魯單抗(MEDI4736)、阿特珠單抗(MPDL3280A)、阿維魯單抗(MSB0010718C)、BMS-936559 (MDX-1105)、AMP-224、MEDI0680 (AMP-514)、西米普利單抗(REGN2810)、特瑞普利單抗(JS001-PD-1)、

卡瑞利珠單抗(SHR-1210)、多塔利單抗(TSR-042)、西利單抗(JNJ-63723283)或FAZ053或其PDL-1或PDL-2結合片段。在某些實施例中，PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含結合PD-1、PDL-1或PDL-2之Fc融合蛋白質。在某些實施例中，Fc融合蛋白質包含AMP-224或其PD-1結合片段。在某些實施例中，PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含PD-1、PDL-1或PDL-2之小分子抑制劑。在某些實施例中，經由PD-1、PDL-1或PDL-2進行之信號傳導之小分子抑制劑包含以下中之一或多者：N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)胺基]乙基}乙醯胺(BMS 202)；(2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)-5-甲基苯甲基)-D-絲胺酸鹽酸鹽；(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)苯甲基)-4-羥基吡咯啶-2-甲酸；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶；L- α -麩醯胺酸、N2,N6-雙(L-絲胺醯基-L-天冬醯胺醯基-L-蘇胺醯基-L-絲胺醯基-L- α -麩胺醯基-L-絲胺醯基-L-苯基丙胺醯基)-L-離胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-精胺醯基-L-纈胺醯基-L-蘇胺醯基-L-麩醯胺醯基-L-白胺醯基-L-丙胺醯基-L-脯胺醯基-L-離胺醯基-L-丙胺醯基-L-麩醯胺醯基-L-異白胺醯基-L-離胺醯基；(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-吡啶甲酸；甘胺醯胺，N-(2-巯基乙醯基)-L-苯基丙胺醯基-N-甲基-L-丙胺醯基-L-天冬醯胺醯基-L-脯胺醯基-L-組胺醯基-L-白胺醯基-N-甲基甘胺醯基-L-色胺醯基-L-絲胺醯基-L-色胺醯基-N-甲基-L-正白胺醯基-N-甲基-L-正白胺醯基-L-精胺醯基-L-半胱胺醯基-，環(1 $\rightarrow$ 14)-硫醚；或其衍生物或類似物。在某

些實施例中，個體罹患癌症。在某些實施例中，癌症包含神經膠母細胞瘤、胰臟癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、頭頸癌、卵巢癌、結腸癌、子宮頸癌、前列腺癌或肺癌。

【圖式簡單說明】

【0010】 本文所描述之新穎特徵將在隨附申請專利範圍中細緻闡述。將參考闡述利用本文所述特徵之原理之說明性實施例及附圖之以下詳細描述來獲得對本文所述之特徵及特徵優勢之更佳理解，在該等附圖中：

【0011】 圖1說明藉由在500 nM之單一濃度下所測試之78序列特有IgG來抑制骨膜蛋白介導之細胞附著。

【0012】 圖2說明在用NB0828或媒劑對照處理之後小鼠MB49膀胱癌模型中之腫瘤生長。

【0013】 圖3說明NB0828處理對瘤內骨髓細胞之積聚之影響。用如圖2中所描述之NB0828或媒劑處理攜帶MB49腫瘤之小鼠。資料呈現為總CD45+免疫浸潤細胞之百分比。

【0014】 圖4說明在用NB0828處理之後之總腫瘤膠原蛋白含量之變化。如圖2中所描述處理攜帶MB49腫瘤之小鼠且如方法中所描述評定端點MB49腫瘤之總腫瘤膠原蛋白含量。

【0015】 圖5說明在用NB0828或媒劑對照處理後小鼠CT26結腸癌模型中之腫瘤生長。

【0016】 圖6說明在經NB0828處理之攜帶CT26腫瘤之小鼠中，粒細胞/腫瘤相關巨噬細胞(TAM)之瘤內積聚減少且巨噬細胞向M1表型偏移。

【0017】 圖7說明在經NB0828處理之攜帶CT26腫瘤之小鼠中，

CD8+及CD4+腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)之積聚增加且CD8+ TIL功能增強。

【0018】 圖8說明在用NB0828或媒劑對照處理後小鼠MC38結腸癌模型中之腫瘤生長。

【0019】 圖9A至圖9D說明在MC38結腸癌模型中，NB0828降低腫瘤相關巨噬細胞(9A)之總量，同時增加促發炎I型巨噬細胞(9B)及CD8+ T細胞(9C)，且腫瘤功效取決於C8+ T細胞(9D)。

【0020】 圖10A至圖10C說明在關於腫瘤尺寸(10A)及存活率(10B)兩者之控制方面，與單獨使用PD-1相比，PD-1與NB0828之組合改良MC38結腸癌模型中之反應；在第一次攻擊下存活下來之動物均免於再次攻擊(10C)。

【0021】 圖11說明NB0828克服所建立之MC38腫瘤中對抗PD-1之抗性。

【0022】 圖12A至圖12D說明在抗PD-1腫瘤中，NB0828增加CD8+ TIL的出現(12A)且改良其功能(12B)，同時降低總TAM (12C)且促進免疫刺激M1 TAM之積聚(12D)。

【實施方式】

序列表

【0023】 本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式以電子方式提交且其全文以引用之方式併入本文中。該ASCII複本於2020年8月11日創建，命名為01-3435-WO-1_SL.txt且大小為19,155個位元組。

【0024】 在以下描述中，闡述某些特定細節以便徹底理解各種實施例。然而，熟習此項技術者應理解，所提供之實施例亦可在無此等細節之情況下實施。除非上下文另外要求，否則在通篇說明書及隨後申請專利範

圍中，詞語「包含 (comprise)」及其變化形式(諸如「包含 (comprises/comprising)」)應視為開放的、包括性之含義，亦即「包括但不限於」。除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。亦應注意，除非上下文明確規定，否則術語「或」一般以其包括「及/或」之含義而採用。另外，本文中所提供之標題僅係為方便起見，而不解釋所主張之實施例之範疇或含義。

【0025】 如本文所用，術語「約」係指接近所述量10%或更小之量。

【0026】 如本文所使用，術語「個體(individual)」、「患者」或「個體(subject)」係指診斷患有、疑似罹患或出現患有至少一種所描述之組合物及方法適用於治療的疾病之風險之個體。在某些實施例中，個體為哺乳動物。在某些實施例中，哺乳動物為小鼠、大鼠、家兔、狗、貓、馬、乳牛、綿羊、豬、山羊、駱馬、羊駝或犛牛。在某些實施例中，個體為人類。

【0027】 如本文所使用，術語「組合」或「組合治療」可指同時投與欲組合之物品或依序投與欲組合之物品。如本文所描述，當組合係指依序投與物品時，該等物品可以任何時間次序投與。可根據使生物可用性達至最大、降低副作用、使治療潛力達至最大或其任何組合之時程不在同一天或在同一天分開投與各物品。

【0028】 術語「癌症」及「腫瘤」係關於以細胞生長失調為特徵之哺乳動物中之生理病況。癌症為一群細胞呈現不受控生長或非所需生長之一類疾病。癌細胞亦可能擴散至其他部位，其可導致形成癌轉移。癌細胞

可例如經由淋巴或血液在體內擴散。不受控生長、入侵及癌轉移形成亦稱為癌症之惡性特性。此等惡性特性將癌症與良性腫瘤相區別，良性腫瘤通常不會入侵或轉移。

【0029】 如本文所用，術語「有效量」係指在向哺乳動物投與時引起生物效應之治療之量。生物效應包括但不限於以下：抑制或阻斷受體-配位體相互作用、降低目標之酶促活性、減少腫瘤生長、減少腫瘤轉移、增加CD8⁺ T細胞向腫瘤部位之浸潤、減少腫瘤部位中之總巨噬細胞、增加M1巨噬細胞之浸潤、提高M1/M2比率或延長攜帶腫瘤之動物的存活期。「治療量」為經計算以發揮療效之藥物之濃度。治療量涵蓋能夠誘導個體群體中之治療反應之劑量範圍。哺乳動物可為人類個體。人類個體可罹患或疑似罹患腫瘤。

【0030】 所提供之抗體為單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體及多反應性抗體)及抗體片段。抗體包括抗體-結合物及包含抗體之分子(諸如嵌合分子)。因此，抗體包括但不限於以下：全長及天然抗體以及其保留有結合特異性之片段及部分，諸如包括具有任何數目之免疫球蛋白類別及/或同型之彼等者(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE及IgM)的其任何特異性結合部分；及其生物學相關(抗原結合)片段或特異性結合部分，包括但不限於Fab、F(ab')₂、Fv及scFv (單鏈或相關實體)。單株抗體一般為實質上均質抗體之組合物內之一種抗體；因此，除可少量存在之可能天然存在之突變以外，單株抗體組合物內所包含之任何單獨抗體為相同的。多株抗體為包括通常針對兩個或更多個不同決定子(抗原決定基)之不同序列之不同抗體的製劑。單株抗體可包含人類IgG1恆定區。單株抗體可包含人類IgG4恆定區。

【0031】本文中之術語「抗體」以最廣義形式使用且包括多株及單株抗體，其包括完整抗體及其功能性(抗原結合)抗體片段；包括抗原結合片段(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重組IgG (rIgG)片段、單鏈抗體片段；包括單鏈可變片段(sFv或scFv)及單域抗體(例如sdAb、sdFv、奈米抗體)片段。該術語涵蓋免疫球蛋白之經基因工程改造及/或以其他方式修飾之形式，諸如胞內抗體、肽體、嵌合抗體、完全人類抗體、人類化抗體，及異結合抗體、多特異性(例如雙特異性)抗體、雙功能抗體、三功能抗體及四功能抗體、串聯二scFv、串聯三scFv。除非另有說明，否則術語「抗體」應理解為涵蓋其功能性抗體片段。該術語亦涵蓋完整或全長抗體，包括任何種類或子類之抗體，包括IgG及其子類、IgM、IgE、IgA及IgD。抗體可包含人類IgG1恆定區。抗體可包含人類IgG4恆定區。

【0032】與「高變區」或「HVR」同義之術語「互補決定區」及「CDR」在此項技術中已知係指抗體可變區內之非連續胺基酸序列，其賦予抗原特異性及/或結合親和力。一般而言，各重鏈可變區中存在三個CDR (CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)且各輕鏈可變區中存在三個CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。「構架區」及「FR」在此項技術中已知係指重鏈及輕鏈之可變區之非CDR部分。一般而言，各全長重鏈可變區中存在四個FR (FR-H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4)，且各全長輕鏈可變區中存在四個FR (FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4)。所給定CDR或FR之確切胺基酸序列邊界可容易使用多種熟知方案中之任一者判定，包括以下文獻中所述之方案：Kabat等人 (1991), 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」，第5版. Public Health Service, National

Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」編號方案), Al-Lazikani等人, (1997) *JMB* 273,927-948 (「Chothia」編號方案); MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), 「Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography」, *J. Mol. Biol.* 262, 732-745. (「Contact」編號方案); Lefranc MP等人, 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」, *Dev Comp Immunol*, 2003年1月;27(1):55-77 (「IMGT」編號方案); Honegger A及Plückthun A, 「Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool」, *J Mol Biol*, 2001年6月8日;309(3):657-70, (「Aho」編號方案); 及Whitelegg NR及Rees AR, 「WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB」, *Protein Eng.* 2000年12月;13(12):819-24 (「AbM」編號方案)。

【0033】 給定CDR或FR之邊界可根據用於鑑別之方案而變化。舉例而言，Kabat方案係基於結構比對，而Chothia方案係基於結構資訊。Kabat與Chothia方案兩者之編號均基於最常見之抗體區序列長度，其中在一些抗體中出現由插入字母(例如「30a」)表示之插入及缺失。兩種方案使得某些插入及缺失(「插入缺失(indel)」)位於不同位置，產生不同編號。Contact方案係基於複雜晶體結構之分析且在多個方面與Chothia編號方案相似。

【0034】 術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原之結合之域。天然抗體之重鏈及輕鏈之可變域(分別為V_H及V_L)通常具有類似結構，其中各域包含四個保守性構架區(FR)及三個CDR

(參見例如Kindt等人, Kuby *Immunology*, 第6版, W.H. Freeman公司, 第91頁 (2007))。單個V_H或V_L域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合所述抗原之抗體之V_H或V_L域分別篩選互補V_L或V_H域之庫而分離(參見例如Portolano等人, *J. Immunol.*, 150:880-887 (1993)；Clarkson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991))。

【0035】 抗體片段為所提供之抗體之一。「抗體片段」係指除完整抗體之外之分子，其包含完整抗體中結合完整抗體所結合之抗原之部分。抗體片段之實例包括(但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體；線抗體；單鏈抗體分子(例如scFv或sFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。在特定實施例中，抗體為包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區之單鏈抗體片段，諸如scFv。

【0036】 抗體片段可藉由各種技術製得，包括但不限於完整抗體之蛋白分解消化，及由重組宿主細胞產生。在一些實施例中，抗體為重組產生之片段，諸如包含並非天然存在之排列之片段，諸如具有由合成連接子(例如多肽連接子)接合之兩個或更多個抗體區域或鏈的彼等片段，及/或並非由天然存在之完整抗體之酶分解產生之彼等片段。在一些態樣中，抗體片段為scFv。

【0037】 「人類化」抗體為一種全部或實質上全部CDR胺基酸殘基均來源於非人類CDR且全部或實質上全部FR胺基酸殘基均來源於人類FR的抗體。人類化抗體視情況可包括來源於人類抗體之抗體恆定區之至少一部分。非人類抗體之「人類化形式」係指已經歷人類化(通常用以降低對人類之免疫原性)，同時保持親本非人類抗體之特異性及親和力之非人類抗體變異體。在一些實施例中，人類化抗體中的一些FR殘基經來自非人

類抗體(例如，衍生該CDR殘基之抗體)之對應殘基取代，例如以恢復或改良抗體特異性或親和力。

【0038】 所提供之抗體為人類抗體。「人類抗體」為具有與人類或人類細胞或非人類源所產生之抗體之胺基酸序列相對應之胺基酸序列的抗體，該非人類源利用人類抗體組庫或其他人類抗體編碼序列(包括人類抗體庫)。該術語不包括包含非人類抗原結合區之非人類抗體之人類化形式，諸如彼等其中全部或實質上全部CDR為非人類CDR者。

【0039】 人類抗體可藉由將免疫原投與已經過改造以因應抗原攻擊產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體之轉殖基因動物來製備。此類動物通常含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合至動物染色體中。在此類轉殖基因動物中，內源性免疫球蛋白基因座一般已不活化。人類抗體亦可來源於人類抗體庫，包括噬菌體呈現庫及無細胞庫，其含有來源於人類組庫之抗體編碼序列。

【0040】 術語「多肽」與「蛋白質」可互換使用，係指胺基酸殘基之聚合物，且不限於最小長度。多肽(包括所提供之抗體及抗體鏈及其他肽，例如連接子及結合肽)可包括胺基酸殘基，包括天然及/或非天然胺基酸殘基。術語亦包括多肽之表現後修飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化及類似修飾。在一些態樣中，多肽可含有相對於原生或天然序列進行之修飾，只要蛋白質維持所需活性。此等修飾可為有意的，如經由定點突變誘發進行；或可為偶然的，諸如經由產生蛋白質之宿主之突變或由於PCR擴增所引起之錯誤引起。

【0041】 相對於參考多肽序列之序列一致性百分比(%)係在比對序

列且引入空位(若需要)以達成最大序列一致性百分比之後，與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致之候選序列中之胺基酸殘基之百分比，且不將任何保守性取代視為序列一致性之部分。出於判定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可以各種已知方式達成；例如，使用公開可用之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。用於比對序列之適當參數能夠進行測定，包括為在經比較序列之全長上達成最大比對所需之算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech公司撰寫，且源程式碼已與用戶文檔一起提交給美國知識產權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559，其在此註冊在美國版權註冊第TXU510087號下。ALIGN-2程式可公開購自加利福尼亞州南舊金山之Genentech公司或可由源程式碼編譯。ALIGN-2程式經編寫可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且無變化。

【0042】 在使用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者，其可表述為與給定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列一致性%之給定胺基酸序列A)如下計算： $100 \times \text{分數 } X/Y$ ，其中X為由序列比對程式ALIGN-2在A和B之程式比對中以相同匹配數進行評分之胺基酸殘基數，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%不相等。除非另外特定陳述，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值係如剛剛前一段落中所描述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

【0043】 在一些實施例中，涵蓋本文所提供之抗體之胺基酸序列變異體。變異體通常不同於本文特定揭示之多肽，其不同之處可在於一或多個取代、刪除、添加及/或插入。此類變異體可天然存在或可以合成方式產生，例如藉由修飾本發明之以上多肽序列中之一或多者且評估如本文所述之多肽之一或多個生物活性，及/或使用多種已知技術中之任一者。舉例而言，可能需要改良抗體之抗體胺基酸序列變異體之結合親和力及/或其他生物特性，其可藉由將適當修飾引入編碼該抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備抗體。此類修飾包括例如抗體之胺基酸序列內之殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，只要最終構築體具有所需特徵(例如抗原結合)即可。

【0044】 在一些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。所關注之取代型突變誘發位點包括CDR及FR。胺基酸取代可引入相關抗體中且針對所需活性篩選產物，例如保留/提高之抗原結合、降低之免疫原性或改良ADCC或CDC之產物。

【0045】 在一些具體例中，取代、插入或缺失可發生在一或多個CDR內，其中取代、插入或缺失實質上不減少抗體與抗原之結合。舉例而言，實質上不降低結合親和力之保守取代可在CDR中進行。類更改可位於CDR「熱點」外部。在某些實施例中，對於變異體V_H及V_L序列，各CDR為不變的。

【0046】 改變(例如取代)可於CDR中進行以例如改良抗體親和力。此類變化可在編碼在體細胞成熟期間具有高突變率之密碼子之CDR中進行(參見例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, 207:179-196 (2008))，且測試所得變異體之結合親和力。亦可使用親和力成熟(例如使用易錯PCR、鏈

改組、CDR之隨機化或寡核苷酸導向突變誘發)改良抗體親和力(參見例如 Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001))。與抗原結合有關之CDR殘基可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或模擬來特定鑑別(參見例如Cunningham及Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989))。特定言之，常常靶向CDR-H3及CDR-L3。替代地或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構用於鑑別抗體與抗原之間之接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物靶向或消除。可篩檢變異體以判定其是否含有所需特性。

【0047】 胺基酸序列插入及缺失包括長度在一個殘基至含有一百或更多個殘基之多肽範圍內之胺基端及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入及缺失。末端插入之實例包括具有N末端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與酶(例如對於ADEPT而言)或延長抗體之血清半衰期之多肽之融合。抗體分子之序列內插入變異體之實例包括在輕鏈中插入3個胺基酸。末端缺失之實例包括在輕鏈末端缺失7個或更少個胺基酸之抗體。

【0048】 在一些實施例中，改變抗體以提高或降低其糖基化(例如藉由改變胺基酸序列以使得產生或移除一或多個糖基化位點)。可改變附接至抗體之Fc區之碳水化合物。來自哺乳動物細胞之天然抗體通常包含藉由N鍵附接至Fc區之CH₂域之Asn₂₉₇之分支雙觸角寡糖(參見例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997))。寡糖可為各種碳水化合物，例如附接至在雙觸角寡糖結構之主幹中之GlcNAc之甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖、唾液酸或岩藻糖。寡糖在抗體中之修飾可例如產生具有某些改良特性之抗體變異體。抗體糖基化變異體可具有改良之ADCC及/或CDC功

能。在一些實施例中，提供具有缺乏(直接或間接地)連接至Fc區之海藻糖之碳水化合物結構之抗體變異體。舉例而言，此類抗體中之海藻糖含量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%，或20%至40%。岩藻糖之量係藉由相對於附接至Asn297之所有醣結構總和，計算糖鏈內Asn297處之岩藻糖之平均量來測定(參見例如WO 08/077546)。Asn₂₉₇係指位於Fc區中之位置297附近之天冬醯胺酸殘基(Fc區殘基之EU編號；參見例如Edelman等人*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969年5月; 63(1):78-85)。然而，由於抗體中之微小序列變化，Asn₂₉₇亦可位於位置297之上游或下游±3胺基酸附近，亦即位置294與位置300之間。此類岩藻糖基化變異體可具有提高的ADCC功能(參見例如Okazaki等人, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；及Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004))。細胞株(例如基因剔除細胞株)及其使用方法可用於產生脫海藻糖基化抗體，例如在蛋白質海藻糖基化中缺乏之Lec13 CHO細胞及 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因(FUT8)被基因剔除之CHO細胞(參見例如Ripka等人 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.*, 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人, *生物技術與生物工程*, 94(4):680-688 (2006))。亦包括其他抗體糖基化變異體(參見例如美國專利第6,602,684號)。

【0049】 在一些實施例中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體之Fc區中，進而產生Fc區變異體。本文中之Fc區為含有恆定區之至少一部分之免疫球蛋白重鏈之C端區。Fc區包括原生序列Fc區及變異Fc區。Fc區變異體可包含人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，其在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)。

【0050】 在一些實施例中，本發明之抗體為擁有一些(但並非所有)效應子功能之變異體，此使得該等抗體成為合乎其中活體內抗體半衰期至關重要，而某些效應功能(諸如補體及ADCC)為不必要或有害的應用需要之候選物。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以確認CDC及/或ADCC活性得到降低/消除。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合分析以確保抗體不具有FcγR結合能力(因此可能不具有ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。評定所關注分子之ADCC活性之活體外分析之非限制性實例描述於美國專利第5,500,362號及美國專利第5,821,337號中。替代地，可採用非放射性分析(例如ACTI™及CytoTox96®非放射性細胞毒性分析)。適用於此類分析之效應細胞包括外周血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、單核球、巨噬細胞及天然殺手(Natural Killer, NK)細胞。

【0051】 抗體可具有增加之半衰期及改良之與新生Fc受體(FcRn)之結合(參見例如US 2005/0014934)。此類抗體可包含其中具有改良Fc區與FcRn之結合之一或多個取代之Fc區，且包括具有根據EU編號系統(參見例如美國專利第7,371,826號)之一或多個Fc區殘基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434處之取代之彼等者。亦涵蓋Fc區變異體之其他實例(參見例如Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 美國專利第5,648,260號及第5,624,821號；及WO94/29351)。

【0052】 在一些實施例中，可能需要產生半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在一些實施例中，經取代之殘基存在於抗體之可進入位點處。反應性巯基

可位於用於結合諸如藥物部分或連接子藥物部分之其他部分之位點，以產生免疫結合物。在一些實施例中，以下殘基中之任一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)；重鏈之A118 (EU編號)；及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。

【0053】 在一些具體例中，本文提供之抗體可經進一步修飾以含有已知且可獲得之額外非蛋白質部分。適合於抗體衍生化之部分包括但不限於水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括但不限於聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(n-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如丙三醇)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於其在水中之穩定性而可在製造中具有一定優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為支化或非支化的。與抗體附接之聚合物之數目可變化，且若連接兩個或更多個聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。

【0054】 本文所描述之抗體可由核酸編碼。核酸為包含兩個或更多個核苷酸鹼基之聚核苷酸類型。在某些實施例中，核酸為載體之組分，其可用於將編碼聚核苷酸之多肽轉移至細胞中。如本文所用，術語「載體」意欲指能夠運輸其已連接之另一種核酸之核酸分子。一種載體為基因體整合載體或「整合載體」，其可整合於宿主細胞之染色體DNA中。另一類型之載體為「游離型」載體，例如能夠進行染色體外複製之核酸。能夠導引其可操作地連接之基因之表現之載體在本文中稱為「表現載體」。適合之載體包含質體、細菌人工染色體、酵母人工染色體、病毒載體及其類似

物。在表現載體中，用於控制轉錄之調節元件(諸如啟動子、強化子、聚腺苷酸化信號)可來源於哺乳動物、微生物、病毒或昆蟲基因。可另外併入通常由複製起點賦予之在宿主中複製之能力及促進識別轉化子之選擇基因。可採用來源於病毒(諸如慢病毒、反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒及其類似物)之載體。質體載體可經線性化以整合於染色體位置中。載體可包含將位點特異性整合導引至基因組中之限定位置或限制性位點集合中之序列(例如AttP-AttB重組)。另外，載體可包含來源於可轉座元件之序列。

【0055】 如本文所用，術語「同源」、「同源性」或「同源百分比」當在本文中用於相對於參考序列描述胺基酸序列或核酸序列時，可使用Karlin及Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, 如在Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993中所修改)所述之式測定。此類式併入至Altschul等人(J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)之基於局部比對之檢索工具(BLAST)程式中。截至本申請案之申請日，序列同源性百分比可使用BLAST之最新近版本測定。

【0056】 編碼本文所描述之抗體之核酸可用於感染、轉染、轉型或以其他方式產生適合核酸之細胞轉殖基因，因此使得能夠產生用於商業或治療用途之抗體。用於藉由大規模細胞培養產生抗體之標準細胞株及方法為此項技術中已知的。參見例如Li等人，「Cell culture processes for monoclonal antibody production.」 *Mabs*. 2010年9月-10月; 2(5): 466-477。在某些實施例中，細胞為真核細胞。在某些實施例中，真核細胞為哺乳動物細胞。在某些實施例中，哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NS0鼠骨髓瘤細胞或PER.C6®細胞。在某些實施例中，將編碼抗體之

核酸整合至適用於產生抗體之細胞之基因體基因座中。在某些實施例中，本文描述一種製造抗體之方法，其包含在足以允許產生及分泌該抗體之活體外條件下培養包含編碼抗體之核酸之細胞。

【0057】 在某些實施例中，本文描述一種主細胞庫，其包含：(a)哺乳動物細胞株，其包含編碼本文所述之抗體之一或多種核酸，該抗體整合在一定基因體位置；及(b)低溫保護劑。在某些實施例中，低溫保護劑包含甘油。在某些實施例中，主細胞庫包含：(a) CHO細胞株，其包含編碼具有以下之抗體之核酸：(i)與SEQ ID NO: 13所示之序列有至少90%一致性之重鏈胺基酸序列；及(ii)與SEQ ID NO: 14所示之序列有至少90%一致性之輕鏈胺基酸序列，其整合於一定基因體位置；及(b)低溫保護劑。在某些實施例中，低溫保護劑包含甘油。在某些實施例中，主細胞庫包含於能夠耐受液氮之冷凍之適合小瓶或容器中。

【0058】 本文亦描述製造本文所描述之抗體之方法。此類方法包含在足以允許抗體表現及分泌之條件下在細胞培養基中培育包含編碼抗體之核酸之細胞或細胞株，且進一步自細胞培養基收集抗體。收集可進一步包含一或多個純化步驟以移除活細胞、細胞碎片、非抗體蛋白質或多肽、非所需鹽、緩衝劑及培養基組分。在某些實施例中，額外純化步驟包括離心、超速離心、透析、脫鹽、蛋白質A、蛋白質G、蛋白質A/G或蛋白質L純化及/或離子交換層析。

抗骨膜蛋白抗體

【0059】 本文描述阻斷骨膜蛋白功能之抗體。此類抗體適用於治療癌症。本文所描述之抗體降低腫瘤之膠原蛋白含量，減少粒細胞及腫瘤相關巨噬細胞之浸潤，同時增加巨噬細胞極化成M1表型，且提高腫瘤浸潤

性T細胞之積聚及抗腫瘤特性。在某些實施例中，與未治療或對照治療之個體相比，抗骨膜蛋白抗體使腫瘤膠原蛋白含量降低至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。在某些實施例中，與未治療或對照治療之個體相比，抗骨膜蛋白抗體使粒細胞及腫瘤相關巨噬細胞之浸潤減少至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些實施例中，與未治療或對照治療之個體相比，抗骨膜蛋白抗體使CD11b⁺細胞之浸潤減少至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些實施例中，與未治療或對照治療之個體相比，抗骨膜蛋白抗體使腫瘤相關巨噬細胞至M1型(CD11b⁺、MHC類II⁺、CD206⁻)之極化增加至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些實施例中，與未治療或對照治療之個體相比，抗骨膜蛋白抗體使腫瘤中CD4⁺及/或CD8⁺ T細胞之積聚增加至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些實施例中，與未治療或對照治療之個體相比，抗骨膜蛋白抗體使腫瘤浸潤性CD8⁺ T細胞之干擾素 γ 之產生增加至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

【0060】 本文描述一種結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：(a)包含SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR1 (CDR-H1)；(b)包含SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT)、3 (ISAYSGNT)、4 (ISAYQGNT)、5 (ISAYTGNT)或6 (ISAYDGNT)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR2 (CDR-H2)；(c)包含SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY)、8 (DVLVVPFDY)或9 (DMLVVPFDY)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR3 (CDR-H3)；(d)包含SEQ ID

NO: 10 (SSDIGSNR)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR1 (CDR-L1)；(e)包含SEQ ID NO: 11 (SND)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR2 (CDR-L2)胺基；(f)及包含SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR3 (CDR-L3)。在某些實施例中，抗體為人類化抗體或嵌合抗體。在某些實施例中，抗體為IgG抗體。在某些實施例中，本文所描述之抗體可包含缺乏效應功能之Fc部分。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞進行之細胞黏附分析中，抗體之IC50小於約50奈莫耳濃度。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞進行之細胞黏附分析中，抗體之IC50小於約40奈莫耳濃度。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞細胞及/或小鼠纖維母細胞進行之細胞黏附分析中，抗體之IC50小於約30奈莫耳濃度。

【0061】 本文亦描述一種結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段，其包含免疫球蛋白重鏈及免疫球蛋白輕鏈：(a)其中免疫球蛋白重鏈包含與SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及 (b)其中該免疫球蛋白輕鏈包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO 13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO: 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。在某些實施例中，抗體為IgG抗體。在某些實施例中，本文所描述之抗體可包含缺乏效應功能之Fc部分。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞進行之細胞黏附分析中，抗體之IC50小於約50奈莫耳濃度。在

某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞進行之細胞黏附分析中，抗體之IC50小於約40奈莫耳濃度。在某些實施例中，在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞進行之細胞黏附分析中，抗體之IC50小於約30奈莫耳濃度。

PD-1軸抑制劑

【0062】 PD-1軸為PD-1對T細胞反應發揮抑制作用之信號傳導路徑且包括PD-1與PDL-1或PDL-2之相互作用。本文所描述之骨膜蛋白結合多肽及抗體可與PD-1軸抑制劑組合且部署於治療腫瘤、癌症或其他贅瘤之方法中。在某些實施例中，本文所描述之骨膜蛋白結合多肽及抗體可與PD-1軸抑制劑在適用於治療癌症、腫瘤或其他贅瘤之醫藥組合物中組合。本文所描述之NB0828抗體可與PD-1軸抑制劑組合且部署於治療腫瘤、癌症或其他贅瘤之方法中。在某些實施例中，本文所描述之NB0828抗體可在適用於治療癌症、腫瘤或其他贅瘤之醫藥組合物中與PD-1軸抑制劑組合。

【0063】 本文組合物及方法中所用之PD-1軸抑制劑可抑制經由PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274)或PDL-2 (CD273)進行之信號傳導。抑制劑可為抗體或抗體片段、可溶性配位體-Fc融合構築體或小分子抑制劑。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑包含抗體或PD-1結合片段。在某些實施例中，特異性結合PD-1 (CD279)之抗體或抗原結合片段包含派姆單抗、納武單抗、AMP-514 (MEDI0680)、斯巴達珠單抗、替雷利珠單抗(BGB-A317)、皮立珠單抗，較佳埃本柎單抗(CAS # 2249882-54-8) (抗PD-1抗體)或其PD-1 (CD279)結合片段。

【0064】 具體言之，本文所描述之抗PD-1抗體分子為埃本柎單抗，

其包含含有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之重鏈及含有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之輕鏈。

【0065】 在某些實施例中，PD-1軸抑制劑為PD-L2 Fc融合蛋白質(例如AMP-224)。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑包含特異性結合PDL-1 (CD274)之抗體或PDL-1結合片段。在某些實施例中，特異性結合PDL-1 (CD274)之抗體或抗原結合片段包含德瓦魯單抗(MEDI 4736)、阿特珠單抗(MPDL3280A)、阿維魯單抗(MSB0010718C)、BMS-936559 (MDX-1105)、MEDI0680 (AMP-514)、西米普利單抗(REGN2810)、特瑞普利單抗(JS001-PD-1)、卡瑞利珠單抗(SHR-1210)、多塔利單抗(TSR-042)、西利單抗(JNJ-63723283)或FAZ053或其PDL-1 (CD274)結合片段。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑包含特異性結合PDL-2 (CD273)之抗體或PDL-2結合片段。

【0066】 在某些實施例中，PD-1軸抑制劑包含一或多種小分子抑制劑，諸如N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基}甲基)胺基]乙基}乙醯胺(BMS 202)；(2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)-5-甲基苯甲基)-D-絲胺酸鹽酸鹽；(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)苯甲基)-4-羥基吡咯啶-2-甲酸；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶；L- α -麩醯胺酸、N2,N6-雙(L-絲胺醯基-L-天冬醯胺醯基-L-蘇胺醯基-L-絲胺醯基-L- α -麩胺醯基-L-絲胺醯基-L-苯基丙胺醯基)-L-離胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-精胺醯基-L-纈胺醯基-L-蘇胺醯基-L-麩醯胺醯基-L-白胺醯基-L-丙胺醯基-L-脯胺醯基-L-離

胺鹽基-L-丙胺鹽基-L-麩鹽基-L-異白胺鹽基-L-離胺鹽基；(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸；甘胺鹽基，N-(2-巰基乙鹽基)-L-苯基丙胺鹽基-N-甲基-L-丙胺鹽基-L-天冬鹽基-L-脯胺鹽基-L-組胺鹽基-L-白胺鹽基-N-甲基甘胺鹽基-L-色胺鹽基-L-絲胺鹽基-L-色胺鹽基-N-甲基-L-正白胺鹽基-N-甲基-L-正白胺鹽基-L-精胺鹽基-L-半胱胺鹽基-，環(1→14)-硫醚；或其衍生物或類似物。

【0067】 在某些實施例中，PD-1軸抑制劑可藉由適用於投與小分子多肽或含抗體醫藥組合物之任何途徑投與，諸如例如皮下、腹膜內、靜脈內、肌肉內、瘤內、腦內或經口投與。在某些實施例中，靜脈內投與PD-1軸抑制抗體。在某些實施例中，以適合之劑量時程(例如每週一次、每週兩次、每月一次、每月兩次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次)投與PD-1軸抑制抗體。可以投與任何治療有效量之抗體。在某些實施例中，治療上可接受之量在約0.1 mg/kg與約50 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量在約1 mg/kg與約40 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量在約5 mg/kg與約30 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量在約5 mg/kg與約20 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量在約5 mg/kg與約15 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量為約5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13 mg/kg、14 mg/kg、15 mg/kg、16 mg/kg、17 mg/kg、18 mg/kg、19 mg/kg或20 mg/kg。在一個實例中，可每兩週一次投與約10 mg/kg劑量之德瓦魯單抗。

【0068】 在某些實施例中，可以向個體投與約100毫克與約1000毫

克之間之固定劑量水準之PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，可以向個體投與約200毫克與約800毫克之間、約200毫克與約600毫克之間、約200毫克與約500毫克之間、約300毫克與約500毫克之間之固定劑量水準之PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，向個體投與約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000毫克之固定劑量水準之PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，可依適合單一療法之水準向個體投與PD-1軸抑制劑。舉例而言，可每兩週約240毫克或每四週約480毫克之劑量投與納武單抗。在另一個實例中，可每三週一次以約200毫克投與派姆單抗。

治療方法

【0069】 本文所揭示之抗體為適用於治療癌症或腫瘤之抗體。治療係指力圖改善或減輕所治療之病況之方法。關於癌症治療，其包括但不限於減小腫瘤體積、減少腫瘤體積生長、提高無惡化存活期或總體預期壽命。在某些實施例中，治療將影響所治療之癌症之緩解。在某些實施例中，治療涵蓋作為意欲預防先前所治療之癌症或腫瘤之復發或惡化之防止性或維持劑量的用途。熟習此項技術者應理解，雖然抗體可為安全且有效的，但並非所有個體均將對所投與之治療作出同等反應，儘管如此，此等個體仍被視為受治療。

【0070】 本文所描述之方法亦涵蓋藉由投與PD-1軸抑制劑與骨膜蛋白結合抗體之組合來治療患有癌症之個體之方法。在某些實施例中，可分開投與PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白結合抗體。在某些實施例中，可在治療同一天分開投與PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白結合抗體。在某些實施例中，可各自根據其自身投與時程來分開投與PD-1軸抑制劑及骨膜蛋白結合抗

體。在某些實施例中，分開投與時程經設計以使各抑制劑之PK/PD特徵達至最大。在某些實施例中，骨膜蛋白結合抗體包含NB0828或具有NB0828之CDR之抗體。在某些實施例中，PD-1軸抑制劑包含埃本柁單抗(CAS # 2249882-54-8)或具有如本文所揭示之埃本柁單抗之CDR之抗體。

【0071】 在某些實施例中，癌症或腫瘤為實體癌症或實體腫瘤。在某些實施例中，癌症或腫瘤為血液癌症或血液腫瘤。在某些實施例中，癌症或腫瘤包含乳房腫瘤、心臟腫瘤、肺腫瘤、小腸腫瘤、結腸腫瘤、脾腫瘤、腎臟腫瘤、膀胱腫瘤、頭部腫瘤、頸部腫瘤、卵巢腫瘤、前列腺腫瘤、腦腫瘤、胰臟腫瘤、皮膚腫瘤、骨骼腫瘤、骨髓腫瘤、血液腫瘤、胸腺腫瘤、子宮腫瘤、睪丸腫瘤或肝臟腫瘤。在某些實施例中，可用本發明之抗體治療之腫瘤或癌症包含腺瘤、腺癌、血管肉瘤、星形細胞瘤、上皮癌、胚細胞瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、血管內皮瘤、血管肉瘤、血腫、肝母細胞瘤、白血病、淋巴瘤、神經管胚細胞瘤、黑素瘤、神經母細胞瘤、骨肉瘤、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤及/或畸胎瘤。在某些實施例中，腫瘤/癌症係選自以下之群：肢端雀斑痣性黑色素瘤、光化性角化症、腺癌、腺樣囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鱗癌瘤、星形膠質細胞腫瘤、巴氏腺癌(Bartholin gland carcinoma)、基底細胞癌、支氣管腺癌、毛細管類癌、癌瘤、癌肉瘤、膽管癌、軟骨肉瘤、囊腺瘤、內胚層竇瘤、子宮內膜增生、子宮內膜基質肉瘤、子宮內膜樣腺癌、室管膜肉瘤、尤文肉瘤(Swing's sarcoma)、局灶性結節性增生、胃泌素瘤、生殖系腫瘤、神經膠母細胞瘤、升糖素瘤、血管母細胞瘤、血管內皮瘤、血管瘤、肝臟腺瘤、肝臟腺瘤病、肝細胞癌、胰島素病(insulinite)、上皮內瘤形成、上皮內鱗狀細胞瘤形成、創傷性鱗狀細胞癌、大細胞癌、脂肪肉瘤、

肺癌瘤、淋巴母細胞白血病、淋巴球性白血病、平滑肌肉瘤、黑素瘤、惡性黑色素瘤、惡性間皮腫瘤、神經鞘腫瘤、神經管胚細胞瘤、神經髓上皮瘤、間皮瘤、黏液表皮樣癌瘤、骨髓白血病、神經母細胞瘤、神經上皮腺癌、結節性黑素瘤、骨肉瘤、卵巢癌、乳頭狀漿液腺癌、垂體腫瘤、漿細胞瘤、假性肉瘤、前列腺癌、肺母細胞瘤、腎細胞癌、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、漿液性癌瘤、鱗狀細胞癌、小細胞癌、軟組織癌瘤、生長抑素分泌腫瘤、鱗狀癌瘤、鱗狀細胞癌、未分化癌瘤、葡萄膜黑素瘤、疣狀癌瘤、陰道/外陰癌瘤、血管活性腸肽瘤(VIPoma)及威爾姆氏腫瘤(Wilm's tumor)。在某些實施例中，欲用一或多種本發明抗體治療之腫瘤/癌症包含腦癌、頭頸癌、結腸直腸癌、急性骨髓白血病、前驅體B細胞急性淋巴母細胞白血病、膀胱癌、星形細胞瘤(較佳II級、III級或IV級星形細胞瘤)、神經膠母細胞瘤、多形性神經膠母細胞瘤、小細胞癌及非小細胞癌(較佳非小細胞肺癌)、肺腺癌、轉移性黑色素瘤、雄激素非依賴性轉移性前列腺癌、雄激素依賴性轉移性前列腺癌、前列腺腺癌及乳癌(較佳乳房導管癌及/或乳房癌)。在某些實施例中，用本發明之抗體治療之癌症包含神經膠母細胞瘤。在某些實施例中，用一或多種本發明之抗體治療之癌症包含胰臟癌。在某些實施例中，用一或多種本發明之抗體治療之癌症包含卵巢癌。在某些實施例中，用一或多種本發明之抗體治療之癌症包含肺癌。在某些實施例中，用一或多種本發明之抗體治療之癌症包含前列腺癌。在某些實施例中，用一或多種本發明之抗體治療之癌症包含結腸癌。在某些實施例中，所治療之癌症包含神經膠母細胞瘤、胰臟癌、卵巢癌、結腸癌、前列腺癌或肺癌。在某一實施例中，癌症為相對其他治療之難治癌症。在某一實施例中，所治療之癌症為復發性的。在某一實施例

中，癌症為復發性/難治性神經膠母細胞瘤、胰臟癌、卵巢癌、結腸癌、前列腺癌或肺癌。

【0072】 在某些實施例中，可藉由適合於投與含抗體之醫藥組合物之任何途徑向對抗體有需要之個體投與抗體，諸如例如皮下、腹膜內、靜脈內、肌肉內、瘤內或腦內投與等。在某些實施例中，靜脈內投與抗體。在某些實施例中，皮下投與抗體。在某些實施例中，瘤內投與抗體。在某些實施例中，以適合之劑量時程投與抗體，例如每週一次、每週兩次、每月一次、每月兩次、每兩週一次、每三週一次或每月一次等。在某些實施例中，每三週一次投與抗體。可以任何治療有效量投與抗體。在某些實施例中，治療上可接受之量在約0.1 mg/kg與約50 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量在約1 mg/kg與約40 mg/kg之間。在某些實施例中，治療上可接受之量在約5 mg/kg與約30 mg/kg之間。治療有效量包括足以減輕與待治療之疾病或病痛相關之一或多種症狀之量。

組合療法之劑量時程

【0073】 可以多種方式投與包含骨膜蛋白結合抗體或多肽及PD-1軸抑制劑之組合治療。可同時以相同時程或在不同時間且以不同時程投與骨膜蛋白結合抗體或多肽及PD-1軸抑制劑。當同時投與時，可藉助於包含骨膜蛋白結合多肽及PD-1軸抑制劑之單獨調配物或單一調配物來投與。可混合投與模式，例如可靜脈內投與骨膜蛋白結合多肽，同時可經口或藉由非經腸注射投與PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，靜脈內、非經腸、皮下、瘤內或經口投與骨膜蛋白結合多肽。在某些實施例中，靜脈內、非經腸、皮下、瘤內或經口投與PD-1軸抑制劑。

【0074】 當以相同時程向個體投與組合治療時，可每週一次、每兩

週一次、每三週一次或每四週一次投與骨膜蛋白結合多肽及PD-1軸抑制劑。可分開或以單一調配物形式投與骨膜蛋白結合多肽及PD-1軸抑制劑。可分開或以單一調配物形式投與NB0828及PD-1軸抑制劑。

【0075】 當以不同時程向個體投與組合治療時，可交替投與骨膜蛋白結合多肽及PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，可在投與骨膜蛋白多肽之前向個體投與PD-1軸抑制劑一或多次。可在投與PD-1軸抑制劑之1天、2天、3天、4天、5天或6天內投與骨膜蛋白結合多肽。可在投與PD-1軸抑制劑之1週、2週、3週或4週內投與骨膜蛋白結合多肽。可在投與PD-1軸抑制劑之1天、2天、3天、4天、5天或6天內投與NB0828抗體。可在投與PD-1軸抑制劑之1週、2週、3週或4週內投與NB0828抗體。

【0076】 可在投與PD-1軸抑制劑之前向個體投與骨膜蛋白結合多肽一或多次。在某些實施例中，可在投與骨膜蛋白結合多肽之1天、2天、3天、4天、5天或6天內投與PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，可在投與骨膜蛋白結合多肽之1週、2週、3週或4週內投與PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，可在投與NB0828抗體之1天、2天、3天、4天、5天或6天內投與PD-1軸抑制劑。在某些實施例中，可在投與NB0828抗體之1週、2週、3週或4週內投與PD-1軸抑制劑。

【0077】 在某些實施例中，可每週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每兩週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每三週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與

PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每四週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每週一次向個體投與PD1軸抑制劑，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽。在某些實施例中，可每兩週一次向個體投與PD1軸抑制劑，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽。在某些實施例中，可每三週一次向個體投與PD1軸抑制劑，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽。在某些實施例中，可每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與骨膜蛋白結合多肽。在某些實施例中，可在投與PD-1軸抑制劑之前向個體投與NB0828一或多次。在某些實施例中，可每週一次向個體投與NB0828，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每兩週一次向個體投與NB0828，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每三週一次向個體投與NB0828，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。在某些實施例中，可每四週一次向個體投與NB0828，且可每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次向個體投與PD1軸抑制劑。

【0078】根據本發明之組合治療可包含以下組合，其中活化成分(例如骨膜蛋白結合多肽及PD-1之抑制劑)中之一者或兩者本身並不有效，但在作為組合治療之一部分投與時為有效的。在某些實施例中，以單一療法無效但與骨膜蛋白結合多肽組合有效之含量投與PD-1之抑制劑。在某些

實施例中，以單一療法無效但與NB0828抗體組合有效之含量投與PD-1之抑制劑。在某些實施例中，以單一療法無效但與PD-1之抑制劑組合有效之含量投與骨膜蛋白結合多肽。在某些實施例中，以單一療法無效但與PD-1之抑制劑組合有效之含量投與NB0828抗體。在某些實施例中，以單一療法無效但組合形式有效之含量投與骨膜蛋白結合多肽及PD-1之抑制劑兩者。在某些實施例中，以單一療法無效但組合形式有效之含量投與NB0828及PD-1之抑制劑兩者。

醫藥學上可接受之賦形劑、載劑及稀釋劑

【0079】 在某些實施例中，本發明之抗骨膜蛋白抗體包括於包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、載劑及稀釋劑之醫藥組合物中。在某些實施例中，將本發明之抗體懸浮於無菌溶液中來投與。在某些實施例中，溶液包含0.9% NaCl。在某些實施例中，溶液進一步包含以下中之一或多者：緩衝劑，例如乙酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸鹽、丁二酸鹽、磷酸鹽、碳酸氫鹽及羥基甲胺基甲烷(Tris)；界面活性劑，例如聚山梨醇酯80 (Tween 80)、聚山梨醇酯20 (Tween 20)及泊洛沙姆188 (poloxamer 188)；多元醇/雙醣/多醣，例如葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖及聚葡萄糖40；胺基酸，例如甘胺酸或精胺酸；抗氧化劑，例如抗壞血酸、甲硫胺酸；或螯合劑，例如EDTA或EGTA。

【0080】 在某些實施例中，本發明之抗體凍乾運送/儲存且在投與之前復原。在某些實施例中，凍乾抗體調配物包含增積劑，諸如甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、聚葡萄糖40或其組合。凍乾調配物可含於由玻璃或其他適合非反應性材料構成之小瓶中。抗體在調配時，不論復原或不復原，均可在某一pH下，一般在小於7.0下緩衝。在某些實施例中，pH值

可在4.5與6.5、4.5與6.0、4.5與5.5、4.5與5.0、或5.0與6.0之間。

【0081】 本文亦描述套組，其包含適合容器中之本文所描述抗體中之一或多者及一或多種選自以下之額外組分：使用說明書、稀釋劑、賦形劑、載劑及投與裝置。

【0082】 在某些實施例中，本文描述一種製備癌症治療之方法，其包含混雜一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑及本發明之抗體。在某些實施例中，本文描述一種製備用於儲存或運送之癌症治療之方法，其包含凍乾本發明之一或多種抗體。

實例

【0083】 以下說明性實例表示本文所述之組合物及方法之實施例且不意謂以任何方式限制。

實例1-抗體生成及篩選

【0084】 使用全人類噬菌體庫進行噬菌體呈現抗體發現操作以分離針對骨膜蛋白之結合子。簡言之，使用重組人類骨膜蛋白、重組小鼠骨膜蛋白或其組合進行三輪淘選，重點係鑑別小鼠交叉反應結合子。根據此淘選策略，鑑別與小鼠骨膜蛋白交叉反應之78序列特有ScFv，且以人類IgG1格式產生以便在細胞附著分析中進行功能篩選。參見圖1。

【0085】 在4°C下在96孔培養盤上塗佈重組人類或小鼠骨膜蛋白隔夜。次日，將培養盤用PBS洗滌且在37°C下用2% BSA封閉1小時。在封閉之後，將抗體添加至培養盤中且在37°C下培育30分鐘。培育之後，接著將50,000個IMR90人類肺纖維母細胞或50,000個MLG小鼠纖維母細胞添加至孔中且使其在37°C下培育2小時。接著用PBS洗滌培養盤兩次且使用IncuCyte平台量測孔之匯合度。藉由500 nM之高濃度單次劑量篩選，

將21個IgG鑑別為得到>50%抑制，如圖1中所示，且繼續結合篩選以測定相對於人類及小鼠骨膜蛋白之親和力，如下表1中所示。

【0086】 為測定重組人類或小鼠骨膜蛋白之相對親和力，在4℃下在maxisorp培養盤上塗佈此等蛋白質隔夜。次日，在37℃下用酪蛋白封閉緩衝液封閉培養盤1小時。向培養盤中滴定各抗體且使其在室溫下結合1小時。用PBST洗滌培養盤4次，隨後與HRP結合之抗人類Fc二級抗體一起在室溫下培育30分鐘。接著用PBST再次洗滌培養盤4次且接著使用TMB底物及1 M HCl顯影。藉由此篩選，選擇與人類及小鼠骨膜蛋白兩者之結合EC50值< 1nM之4個純系(用粗體及斜體標記之表1)。

表1. 圖1中所示之單點細胞附著分析中所鑑別之21個IgG之與人類及小鼠骨膜蛋白之結合EC50值.							
EC50 (nM)	<i>NB0625</i>	<i>NB0627</i>	NB0629	<i>NB0639</i>	NB0640	NB0765	NB0776
HuPOSTN	<i>1.03</i>	<i>0.07</i>	0.09	<i>0.10</i>	9.30	1.08	36.60
MoPOSTN	<i>0.14</i>	<i>0.11</i>	6.08	<i>0.12</i>	6.41	2.41	n.s.
EC50 (nM)	NB0784	NB0791	NB0792	<i>NB0794</i>	NB0798	NB0800	NB0801
HuPOSTN	4.68	n.s.	59.43	<i>0.08</i>	0.48	n.s.	25.16
MoPOSTN	32.76	n.s.	158.50	<i>0.35</i>	62.02	n.s.	22.36
EC50 (nM)	NB0802	NB0803	NB0804	NB0805	NB0806	NB0815	NB0816
HuPOSTN	18.75	19.30	n.s.	n.s.	n.s.	1.05	1.00
MoPOSTN	25.02	27.44	n.s.	n.s.	n.s.	55.79	n.s.
注意n.s.表示分析中未觀測到飽和度。							

實例2-NB0828及序列變異體之生成

【0087】 在細胞附著分析中在劑量反應中再測試4個候選物以測定IC50值。藉由此篩選，將NB0627鑑別為尤其適合之IgG (表2)。

表2. 表1中鑑別之前4個交叉反應結合子/阻斷劑之IC50值.				
IC50 (nM)	NB0625	NB0627	NB0639	NB0794
HuPOSTN	243.3	22.4	236.8	73.1

【0088】 NB0627接著轉化為效應沉默IgG4PAA同型，生成主候選物NB0828。NB0828之序列分析鑑別VH區中之兩種轉譯後修飾之傾向。第一去醯胺化位點位於CDR-H2處，且第二氧化位點位於CDR-H3處。因此，為了試圖移除此等傾向，生成若干單突變體及雙突變體且量測其結合

及活性。NB0828及其變異體之IC50及EC50值之結果概述列於表3中。

表3. NB0828及NB0828變異體之結合及功能資料概述.					
分析	POSTN形式	NB0828	NB1003 (N55S)	NB1010 (N55Q)	NB1011 (N55T)
CAA IC50 (nM)	人類	24.34	10.75	7.97	15.03
	小鼠	25.97	14.91	19.60	22.31
結合EC50 (nM)	人類	0.12	0.08	0.08	0.07
	小鼠	0.15	0.08	0.10	0.07
分析	POSTN形式	NB1015 (N55D)	NB1012 (N55S_M100I)	NB1014 (N55T_M100V)	
CAA IC50 (nM)	人類	13.63	n.s.	n.s.	
	小鼠	20.91	42.34	65.08	
結合EC50 (nM)	人類	0.12	2.28	9.47	
	小鼠	0.18	4.42	19.27	
注意n.s.表示分析中未觀測到飽和度。					

實例3- 小鼠膀胱MB49及結腸CT26腫瘤模型中NB0828之活體內功效

【0089】 在兩個獨立腫瘤模型(膀胱MB49及結腸CT26腫瘤模型)中測試NB0828之功效。簡言之，將250,000個MB49細胞皮內注射至雌性C57BL/6小鼠之側腹，或在雌性Balb/C小鼠之側腹皮內注射50,000個CT26細胞。腫瘤植入後第3天，用NB0828 (50 mg/kg，3QW)或媒劑對照(PBS)腹膜內處理小鼠。在測徑規量測之後每週兩次評定腫瘤體積且將其計算為(長度×寬度²)/2。當腫瘤尺寸在任何單一方向上超過15 mm或由於腫瘤潰瘍而將小鼠安樂死，以作為人道終點。

【0090】 如圖2及圖5中所示，NB0828在兩個模型中在減少腫瘤生長方面均具有一定作用。在MB49模型中，腫瘤生長之此減少與較低百分比之瘤內顆粒球性骨髓細胞(如圖3中所示)及較低膠原蛋白含量(如圖4中所示)相關。如同MB49模型一樣，CT26模型顯示顆粒球性骨髓細胞減少。另外，NB0828減少腫瘤浸潤性巨噬細胞的出現，且存在之巨噬細胞由於NB0828處理而向M1表型偏移，如圖6中所示。在CT26小鼠模型中，

NB0828處理亦與更高量之腫瘤浸潤性CD8⁺及CD4⁺ T細胞及腫瘤浸潤性T細胞中之顯著更高之干擾素 γ 分泌相關，如圖7中所示。

免疫表型分型

【0091】 如所描述，在第3天開始用NB0828或媒劑對照處理MB49或攜帶CT26腫瘤之小鼠。對於所示資料，在腫瘤植入MB49及CT26後第20天及第18天分別進行免疫表型分型。切除腫瘤，移除皮膚，且在使用Miltenyi小鼠腫瘤解離酶混合物(Miltenyi Biotec, CAT # 130-110-187)以酶促方式消化之前使用刮刀刀片進行機械斷裂。經消化之樣品穿過40 μ m濾網，在RPMI中洗滌，隨後在RPMI+10% FBS中進行第二次洗滌。接著將細胞再懸浮以用於計數，且每樣品最多接種 2×10^6 個白血球且加以染色以用於藉由流式細胞量測術進行分析。為了評估CT26模型中之CD8⁺腫瘤浸潤淋巴細胞功能，在抗CD28及佈雷菲爾德菌素A (Brefeldin A)存在下在37℃下用AH1肽[H2-L^d限制gp70 (423-431) MuLV抗原決定基，由CT26細胞表現之免疫顯性CD8⁺ T細胞抗原決定基]刺激來自腫瘤之經消化單細胞懸浮液5小時。在刺激之後，使用流式細胞測量術藉由標準表面/胞內染色方法使細胞染色以偵測CD8⁺ T細胞產生的IFN- γ 。用於評定所示細胞群之流動染色組包括於以下表4中。存活性染色劑(Thermo Fisher，存活/死亡可固定紫色染色劑(Live/Dead Fixable Violet Stain))用於允許探查僅存活細胞事件，且包括泛白血球標記CD45以允許對免疫隔室內之群體進行標準化。相關免疫群體在表型上/功能上如下定義：總骨髓細胞(CD45⁺ CD11b⁺)、粒細胞(CD45⁺ CD11b⁺ Gr-1^{hi}或CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{lo})、巨噬細胞(CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{lo}/neg F4/80⁺)、M1巨噬細胞(MHC II⁺ CD206⁻)、M2巨噬細胞(MHC II-

CD206+)、CD8+ TILs (CD45+ CD11b- CD3+ CD90.2+ CD8+)、CD4+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD90.2+ CD4+)、IFN- γ + CD8+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD8+ IFN- γ +)。使用中間螢光強度(Median Fluorescent Intensity，MFI)測定來自IFN- γ +CD8+TIL之IFN- γ 染色強度。

表4.用於評定MB49及CT26腫瘤中之免疫細胞表型/功能之抗體混合物				
MB49染色組				
MHC II - AF488	iNOS-PE	CD11b-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	Arginase-1-APC
Gr-1-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	F4/80 BV510	CD206 BV650
CT26染色組-TIL分析				
CD3-AF488	PDGFR- α -PE	CD8a-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	AH-1 Tetramer-APC
CD90.2-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
CT26染色組-TIL功能				
CD3-AF488	IFN- γ -PE	CD8a-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	IL-2-AF647
TNF-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
CT26染色組-骨髓細胞				
MHC II - AF488	PD-L1-PE	CD11b-PerCP-Cy5.5	Ly6C-PE-Cy7	F4/80-AF647
Ly6G-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD40 BV510	CD206 BV650

膠原蛋白含量

【0092】 藉由羥脯胺酸之定量使用QuickZyme[®]總膠原蛋白分析(QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands, 目錄號: QZBtotcol1)評定腫瘤之總膠原蛋白含量。對於樣品製備，當腫瘤已達至終點時將MB49腫瘤自攜帶腫瘤之小鼠切除，且在液氮中速凍且在分析之前儲存在-80℃下。將腫瘤物稱重且以200 mg腫瘤/ml HCl再懸浮於6 M HCl中，渦旋並在95℃下培育20小時。冷卻各管，在13,000 RPM下離心10分鐘，且收集上清液。根據製造商之建議方案將上清液稀釋於Milli Q水中，隨後稀釋於4M HCl，且使用所供應之緩衝劑及偵測試劑以技術方式以一式兩份塗鋪以供偵測羥脯胺酸。量測OD570 nm值並將其與使用所供應之膠原

蛋白生成之標準曲線比較以計算各樣品中膠原蛋白之量。各樣品之經計算之總膠原蛋白(μg)除以腫瘤進料之總質量(mg)以對腫瘤樣品之資料進行標準化。

實例4-小鼠結腸MC38腫瘤模型中NB0828之活體內功效

【0093】 在小鼠結腸MC38腫瘤模型中測試NB0828在減少腫瘤生長方面之功效，其中結果顯示於圖8中。NB0828在改變腫瘤微環境方面亦有效以增加CD8⁺ T細胞、減少腫瘤相關巨噬細胞(TAM)的出現且提高促發炎1型巨噬細胞之比率，如圖9A及圖9C中所示。此等變化在此模型中引起NB0828功效，因為在NB0828治療期間CD8⁺ T細胞之耗盡逆轉了NB0828之有利效應，如9D中所示。總體而言，此資料表明NB0828使CD8⁺ T細胞增加至腫瘤部位、減少TAM且增加浸潤性腫瘤中之促發炎M1巨噬細胞表型。

實例5-小鼠結腸MC38腫瘤模型中NB0828及抗PD-1抗體之活體內功效

【0094】 當與PD-1官能性阻斷抗體組合投與時，在小鼠結腸MC38腫瘤模型中測試NB0828在減少腫瘤生長方面之功效。圖10A至C顯示，與單獨抗PD-1相比，抗PD-1與NB0828之組合進一步減少腫瘤生長(10A)且提高總存活率(相比於8/42，10B完全反應(CR)為16/43)。展現對NB0828及抗PD-1組合處理之完全反應之存活小鼠免受使用10 $\times$ MC38腫瘤細胞進行之再攻擊，其表明存活小鼠已獲得對腫瘤之免疫記憶。

【0095】 當用抗PD-1與NB0828之組合處理已建立之單獨對抗PD-1治療具有抗性之MC38腫瘤之小鼠時，抗性逆轉，如圖11中所示。如圖12中所示，NB0828與抗PD-1之組合提高CD8⁺ T細胞之浸潤及功能(圖12A及圖12B)、減少TAM積聚(圖12C)且提高腫瘤內剩餘巨噬細胞之促發炎表

型之比率(圖12D)。腫瘤微環境中之此等修飾與NB0828一致，從而藉由提高CD8 T細胞反應及減少免疫抑制性巨噬細胞來克服抗PD-1抗性。

【0096】 雖然本文中已展示及描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將顯而易知，此等實施例僅藉助於實例提供。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現將進行大量變化、更改及替代。應理解，本文所描述之本發明實施例之各種替代方案可用於實踐本發明。

【0097】 本說明書中所提及之所有公開案、專利申請案、頒佈之專利及其他文獻均以引用之方式併入本文中，其引用程度就如同已特定地且個別地將各個公開案、專利申請案、頒佈之專利或其他文獻以全文引用之方式併入本文中一般。正文中所含之以引用之方式併入之定義若與本發明中之定義矛盾，則將其排除在外。

本文所提供之序列表		
SEQ ID NO:	序列	來源
13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDMLVVPFDYWGQGTLVTVSS	
14	QSVLTQSSSASGTPGQTVTVSCSGSSSDIGSNRVNWYQQLPGTAPKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLQSADEADYYCAAWDDSLSTYVFGSGTKVTVL	
19	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMS WVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	埃本柁單抗 (CAS # 2249882-54-8) HC

20	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFM NWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSVIPARFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEN	埃本柁單抗 (CAS # 2249882-54-8) LC
----	---	-------------------------------------

【序列表】

<110> 加拿大商百靈佳殷格翰IO加拿大有限公司(BOEHRINGER INGELHEIM IO CANADA, INC.)

<120> 使用PD-1軸抑制劑及抗骨膜蛋白抗體治療癌症之方法

<140> TW109131037

<141> 2020-09-10

<150> 62/899,066

<151> 2019-09-11

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 2

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 3
Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 4
Ile Ser Ala Tyr Gln Gly Asn Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

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

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 6
Ile Ser Ala Tyr Asp Gly Asn Thr
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 7
Asp Ile Leu Val Val Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 8
Asp Val Leu Val Val Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 9
Asp Met Leu Val Val Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 10
Ser Ser Asp Ile Gly Ser Asn Arg
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 11

Ser Asn Asp

1

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 12

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Thr Tyr Val

1 5 10

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Met Leu Val Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 14
Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Val Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Arg Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Ala Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 15
<211> 836
<212> PRT
<213> 未知體

<220>
<223> 未知體之描述：骨膜蛋白序列

<400> 15
Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val
1 5 10 15

Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser
20 25 30

Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln
35 40 45

Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr
50 55 60

Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys
65 70 75 80

Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu
85 90 95

Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr
100 105 110

Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly
115 120 125

Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn
130 135 140

Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu
145 150 155 160

Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr
165 170 175

Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu
180 185 190

Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys
195 200 205

Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His
210 215 220

Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln Asp Phe
225 230 235 240

Ile Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ile Thr
245 250 255

Ser Asp Ile Leu Glu Ala Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe
260 265 270

Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu
275 280 285

Arg Ile Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His
290 295 300

Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val
305 310 315 320

Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp
325 330 335

Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val
340 345 350

Thr Asn Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp
355 360 365

Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe
370 375 380

Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp
385 390 395 400

Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp
405 410 415

Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His
420 425 430

Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile
435 440 445

Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr
450 455 460

Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly
465 470 475 480

Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu
485 490 495

Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe
500 505 510

Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro
515 520 525

Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met
530 535 540

Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln
545 550 555 560

Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly
565 570 575

Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys
580 585 590

Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys
595 600 605

Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val
610 615 620

Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu
625 630 635 640

Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys Phe Val
645 650 655

Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr Thr Thr Lys
660 665 670

Ile Ile Thr Lys Val Val Glu Pro Lys Ile Lys Val Ile Glu Gly Ser
675 680 685

Leu Gln Pro Ile Ile Lys Thr Glu Gly Pro Thr Leu Thr Lys Val Lys
690 695 700

Ile Glu Gly Glu Pro Glu Phe Arg Leu Ile Lys Glu Gly Glu Thr Ile
705 710 715 720

Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile
725 730 735

Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu
740 745 750

Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly
755 760 765

Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys Lys Leu Leu Gln Glu Glu Val
770 775 780

Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His Leu Phe Glu
785 790 795 800

Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly Asp Thr Pro Val Arg Lys
805 810 815

Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu
820 825 830

Gly Arg Ser Gln
835

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 任何胺基酸

<400> 16
Ile Ser Ala Tyr Xaa Gly Asn Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 任何胺基酸

<400> 17
Asp Xaa Leu Val Val Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成6×His標籤

<400> 18
His His His His His His
1 5

<210> 19
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 19
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Val
 50 55 60

Lys Gly 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 Ser Asn Val Asn Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 20
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asp Val Ser
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Ile 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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

202124432

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種PD-1軸抑制劑與骨膜蛋白抑制劑之組合之用途，其用於製造用於治療罹患癌症之個體之藥劑。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中該骨膜蛋白抑制劑包含結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段。

【請求項3】

如請求項2之用途，其中該骨膜蛋白抑制劑包含結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段包含：

a)包含SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR1 (CDR-H1)；

b)包含SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT)、3 (ISAYSGNT)、4 (ISAYQGNT)、5 (ISAYTGNT)或6 (ISAYDGNT)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR2 (CDR-H2)；

c)包含SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY)、8 (DVLVVPFDY)或9 (DMLVVPFDY)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR3 (CDR-H3)；

d)包含SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR1 (CDR-L1)；

e)包含SEQ ID NO: 11 (SND)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR2 (CDR-L2)胺基；及

f)包含SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV)中所示之胺基酸序列之免

疫球蛋白輕鏈CDR3 (CDR-L3)。

【請求項4】

如請求項3之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為嵌合性或人類化。

【請求項5】

如請求項3或4之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為IgG抗體。

【請求項6】

如請求項3或4之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為Fab、F(ab)₂、單域抗體或單鏈可變片段(scFv)。

【請求項7】

如請求項3或4之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段包含免疫球蛋白重鏈可變區及免疫球蛋白輕鏈可變區：

a)其中該免疫球蛋白重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及

b)其中該免疫球蛋白輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO: 13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO: 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。

【請求項8】

如請求項2之用途，其中該骨膜蛋白抑制劑包含結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段，該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為包含免疫

球蛋白重鏈可變區及免疫球蛋白輕鏈可變區之重組抗體或其抗原結合片段：

a)其中該免疫球蛋白重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及

b)其中該免疫球蛋白輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO:13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO: 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。

【請求項9】

如請求項8之用途，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為嵌合性或人類化。

【請求項10】

如請求項8或9之用途，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為IgG抗體。

【請求項11】

如請求項8或9之用途，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為Fab、F(ab)₂、單域抗體或單鏈可變片段(scFv)。

【請求項12】

如請求項3、4、8及9中任一項之用途，其中在使用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞細胞進行之細胞黏附分析中，該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段之IC₅₀小於約50奈莫耳濃度。

【請求項13】

如請求項1至4及8至9中任一項之用途，其中該PD-1軸抑制劑為PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑。

【請求項14】

如請求項13之用途，其中該PD-1軸抑制劑為結合至PD-1之抗體或其片段。

【請求項15】

如請求項14之用途，其中該結合至PD-1之抗體或其片段包含含有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之重鏈及含有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之輕鏈。

【請求項16】

如請求項14之用途，其中該結合至PD-1之抗體或其片段包含派姆單抗(pembrolizumab)、納武單抗(nivolumab)、皮立珠單抗(pidilizumab)、替雷利珠單抗(tislelizumab)、斯巴達珠單抗(spartalizumab)、AMP-514 (MEDI0680)或埃本柎單抗(ezabenlimab)或其PD-1結合片段。

【請求項17】

如請求項13之用途，其中該PD-1軸抑制劑為特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體。

【請求項18】

如請求項17之用途，其中該特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體包含德瓦魯單抗(durvalumab)、阿特珠單抗(atezolizumab)、阿維魯單抗(avelumab)、BMS-936559 (MDX-1105)、AMP-224、西米普利單抗(cemiplimab) (REGN2810)、特瑞普利單抗(toripalimab) (JS001-PD-1)、卡瑞利珠單抗(camrelizumab) (SHR-1210)、多塔利單抗(dostarlimab)

(TSR-042)、西利單抗(cetrelimab) (JNJ-63723283)或FAZ053、或其PDL-1或PDL-2結合片段。

【請求項19】

如請求項13之用途，其中PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含結合PD-1、PDL-1或PDL-2之Fc-融合蛋白質。

【請求項20】

如請求項19之用途，其中該Fc-融合蛋白質包含AMP-224或其PD-1結合片段。

【請求項21】

如請求項13之用途，其中PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含PD-1、PDL-1或PDL-2之小分子抑制劑。

【請求項22】

如請求項21之用途，其中經由PD-1、PDL-1或PDL-2進行之信號傳導之小分子抑制劑包含以下中之一或多者：N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基}甲基)胺基]乙基}乙醯胺(BMS 202)；(2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)-5-甲基苯甲基)-D-絲胺酸鹽酸鹽；(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)苯甲基)-4-羥基吡咯啉-2-甲酸；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶；L- α -麩醯胺酸、N2,N6-雙(L-絲胺醯基-L-天冬醯胺醯基-L-蘇胺醯基-L-絲胺醯基-L- α -麩胺醯基-L-絲胺醯基-L-苯基丙胺醯基)-L-離胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-精胺醯基-L-纈胺醯基-L-蘇胺醯基-L-麩醯胺醯基-L-白

胺鹽基-L-丙胺鹽基-L-脯胺鹽基-L-離胺鹽基-L-丙胺鹽基-L-麩胺鹽基-L-異白胺鹽基-L-離胺鹽基；(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸；甘胺鹽基，N-(2-巰基乙鹽基)-L-苯基丙胺鹽基-N-甲基-L-丙胺鹽基-L-天冬胺鹽基-L-脯胺鹽基-L-組胺鹽基-L-白胺鹽基-N-甲基甘胺鹽基-L-色胺鹽基-L-絲胺鹽基-L-色胺鹽基-N-甲基-L-正白胺鹽基-N-甲基-L-正白胺鹽基-L-精胺鹽基-L-半胱胺鹽基-，環(1→14)-硫醚；或其衍生物或類似物。

【請求項23】

如請求項1至4及8至9中任一項之用途，其中在用呈單一療法形式之檢查點抑制劑治療之後，該個體已罹患進行性疾病。

【請求項24】

如請求項23之用途，其中該檢查點抑制劑包含PD-1進入抑制劑。

【請求項25】

如請求項1至4及8至9中任一項之用途，其中分開投與該PD-1軸抑制劑及該骨膜蛋白抑制劑。

【請求項26】

如請求項1至4及8至9中任一項之用途，其中在同一天投與該PD-1軸抑制劑及該骨膜蛋白抑制劑。

【請求項27】

如請求項1至4及8至9中任一項之用途，其中不在同一天投與該PD-1軸抑制劑及該骨膜蛋白抑制劑。

【請求項28】

如請求項1至4及8至9中任一項之用途，其中該癌症包含神經膠母細

胞瘤癌、胰臟癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、頭頸癌、卵巢癌、結腸癌、子宮頸癌、前列腺癌或肺癌。

【請求項29】

一種結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造藥劑，供治療亦接受PD-1軸抑制劑治療之患者。

【請求項30】

如請求項29之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段包含：

a)包含SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR1 (CDR-H1)；

b)包含SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT)、3 (ISAYSGNT)、4 (ISAYQGNT)、5 (ISAYTGNT)或6 (ISAYDGNT)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR2 (CDR-H2)；

c)包含SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY)、8 (DVLVVPFDY)或9 (DMLVVPFDY)中之任一者中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈CDR3 (CDR-H3)；

d)包含SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR1 (CDR-L1)；

e)包含SEQ ID NO: 11 (SND)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR2 (CDR-L2)胺基；及

f)包含SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV)中所示之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈CDR3 (CDR-L3)。

【請求項31】

如請求項29之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為嵌合性或人類化。

【請求項32】

如請求項29至31中任一項之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為IgG抗體。

【請求項33】

如請求項29至31中任一項之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段為Fab、F(ab)₂、單域抗體或單鏈可變片段(scFv)。

【請求項34】

如請求項29至31中任一項之用途，其中該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段包含免疫球蛋白重鏈及免疫球蛋白輕鏈：

a)其中該免疫球蛋白重鏈可變區包含與13中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及

b)其中該免疫球蛋白輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO: 13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO: 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。

【請求項35】

一種結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造藥劑，供治療亦接受PD-1軸抑制劑治療之患者，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段包含免疫球蛋白重鏈及免疫球蛋白輕鏈：

a)其中該免疫球蛋白重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 13中所示之胺基

酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列；及

b)其中該免疫球蛋白輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 14中所示之胺基酸序列有至少約90%、95%、97%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其中SEQ ID NO 13之天冬醯胺酸編號55為天冬醯胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、蘇胺酸或天冬胺酸，且其中SEQ ID NO 13之甲硫胺酸編號100為甲硫胺酸、異白胺酸或纈胺酸。

【請求項36】

如請求項35之用途，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為嵌合性或人類化。

【請求項37】

如請求項35或36之用途，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為IgG抗體。

【請求項38】

如請求項35或36之用途，其中該結合骨膜蛋白之重組抗體或其抗原結合片段為Fab、F(ab)₂、單域抗體或單鏈可變片段(scFv)。

【請求項39】

如請求項29至31、35及36中任一項之用途，其中在用人類肺纖維母細胞及/或小鼠纖維母細胞細胞進行之細胞黏附分析中，該結合骨膜蛋白之抗體或其抗原結合片段之IC₅₀小於約50奈莫耳濃度。

【請求項40】

如請求項29至3、35及36中任一項之用途，其中該PD-1軸抑制劑為PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑。

【請求項41】

如請求項40之用途，其中該PD-1軸抑制劑為結合至PD-1之抗體或其片段。

【請求項42】

如請求項41之用途，其中該結合至PD-1之抗體或其片段包含含有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之重鏈及含有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之輕鏈。

【請求項43】

如請求項41之用途，其中該結合至PD-1之抗體或其片段包含派姆單抗、納武單抗、皮立珠單抗、替雷利珠單抗、斯巴達珠單抗、AMP-514 (MEDI0680)或埃本柎單抗、或其PD-1結合片段。

【請求項44】

如請求項40之用途，其中該PD-1軸抑制劑為特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體。

【請求項45】

如請求項44之用途，其中該特異性結合PDL-1或PDL-2之抗體包含德瓦魯單抗、阿特珠單抗、阿維魯單抗、BMS-936559 (MDX-1105)、AMP-224、西米普利單抗(REGN2810)、特瑞普利單抗(JS001-PD-1)、卡瑞利珠單抗(SHR-1210)、多塔利單抗(TSR-042)、西利單抗(JNJ-63723283)、或其PDL-1或PDL-2結合片段。

【請求項46】

如請求項40之用途，其中PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含結合PD-1、PDL-1或PDL-2之Fc-融合蛋白質。

【請求項47】

如請求項46之用途，其中該Fc-融合蛋白質包含AMP-224或其PD-1結合片段。

【請求項48】

如請求項40之用途，其中PD-1、PDL-1或PDL-2信號傳導之抑制劑包含PD-1、PDL-1或PDL-2之小分子抑制劑。

【請求項49】

如請求項48之用途，其中經由PD-1、PDL-1或PDL-2進行之信號傳導之該小分子抑制劑包含以下中之一或多者：N-{2-[(2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基)甲基)胺基]乙基}乙醯胺(BMS 202)；(2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)-5-甲基苯甲基)-D-絲胺酸鹽酸鹽；(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氫苯并[b][1,4]二氧雜環己烯-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)苯甲基)-4-羥基吡咯啶-2-甲酸；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吡啶；3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吡啶；L-α-麩胺酸、N2,N6-雙(L-絲胺醯基-L-天冬胺醯基-L-蘇胺醯基-L-絲胺醯基-L-α-麩胺醯基-L-絲胺醯基-L-苯基丙胺醯基)-L-離胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-精胺醯基-L-纈胺醯基-L-蘇胺醯基-L-麩胺醯基-L-白胺醯基-L-丙胺醯基-L-脯胺醯基-L-離胺醯基-L-丙胺醯基-L-麩胺醯基-L-異白胺醯基-L-離胺醯基；(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-聯苯]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-吡啶甲酸；甘胺醯胺，N-(2-巯基乙醯基)-L-苯基丙胺醯基-N-甲基-L-丙胺醯基-L-天冬胺醯基-L-脯胺醯基-L-組胺醯基-L-白胺醯基-N-甲基甘胺醯基-L-色胺醯基-L-絲胺醯基-L-色胺醯基-N-甲基-L-正白胺醯基-N-甲基-L-正白胺醯基-L-精胺醯基-L-半胱胺醯基-

，環(1→14)-硫醚；或其衍生物或類似物。

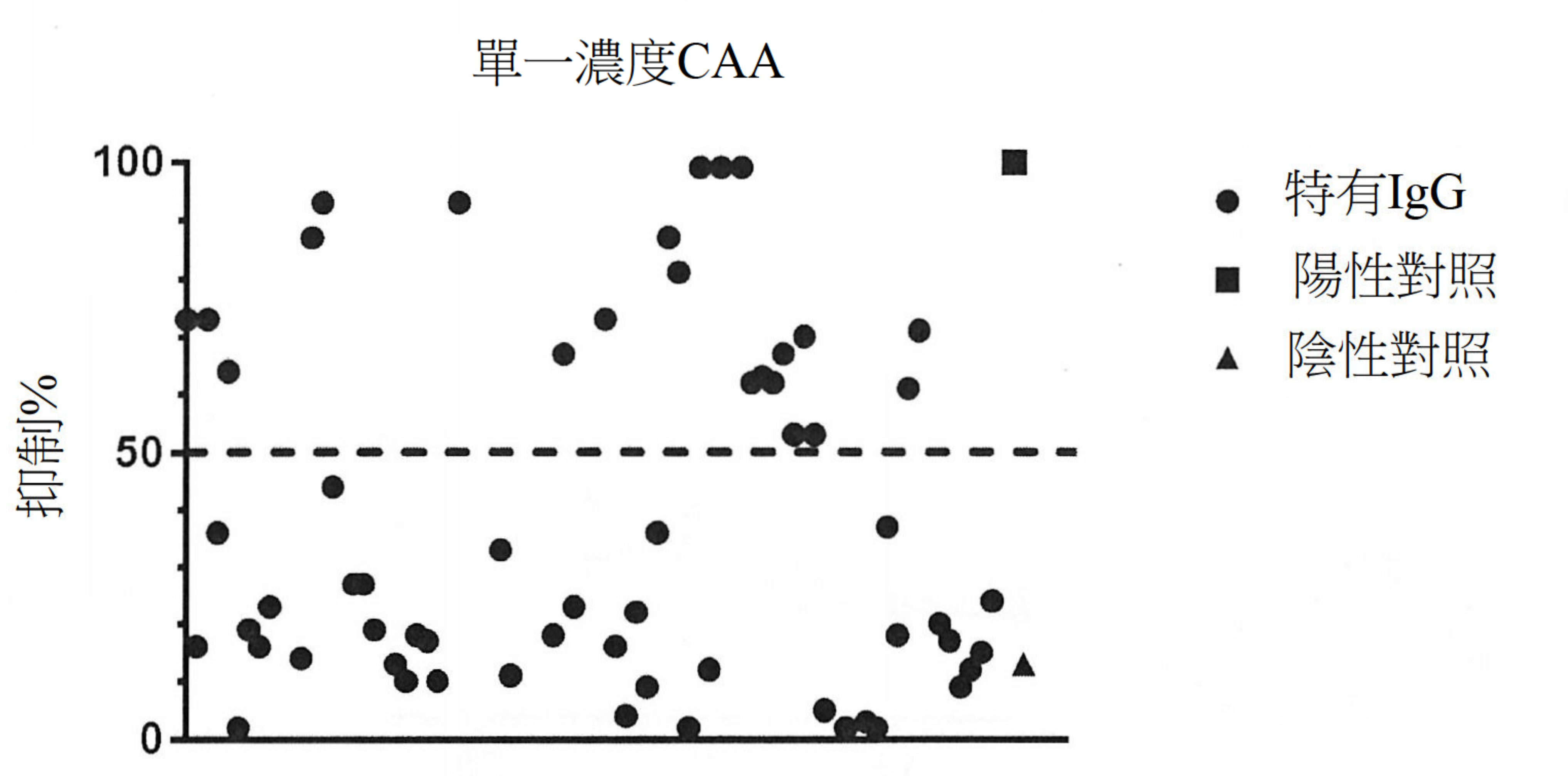
【請求項50】

如請求項29至31、35及36中任一項之用途，其中該患者罹患癌症。

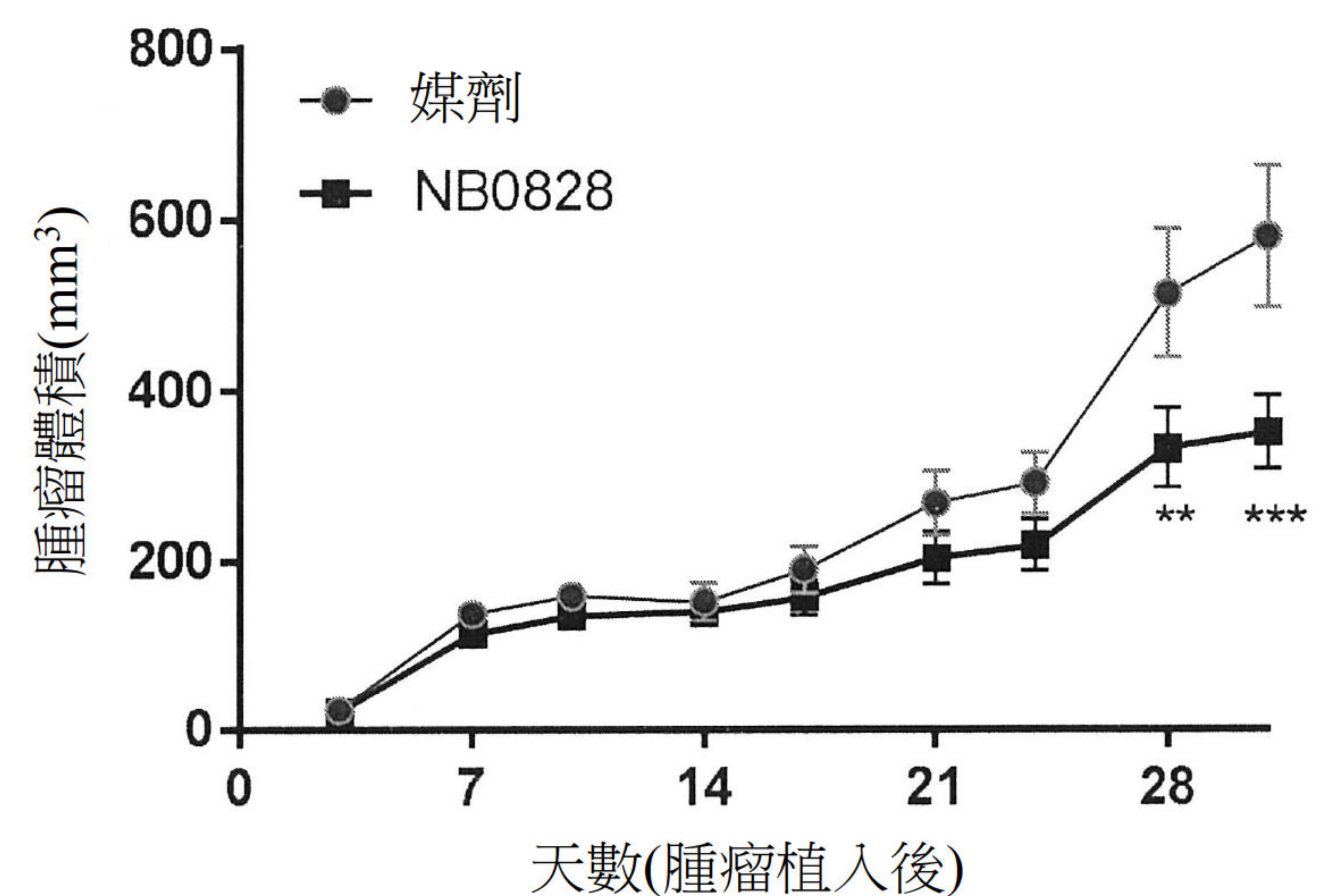
【請求項51】

如請求項50之用途，其中該癌症包含神經膠母細胞瘤癌、胰臟癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、頭頸癌、卵巢癌、結腸癌、子宮頸癌、前列腺癌或肺癌。

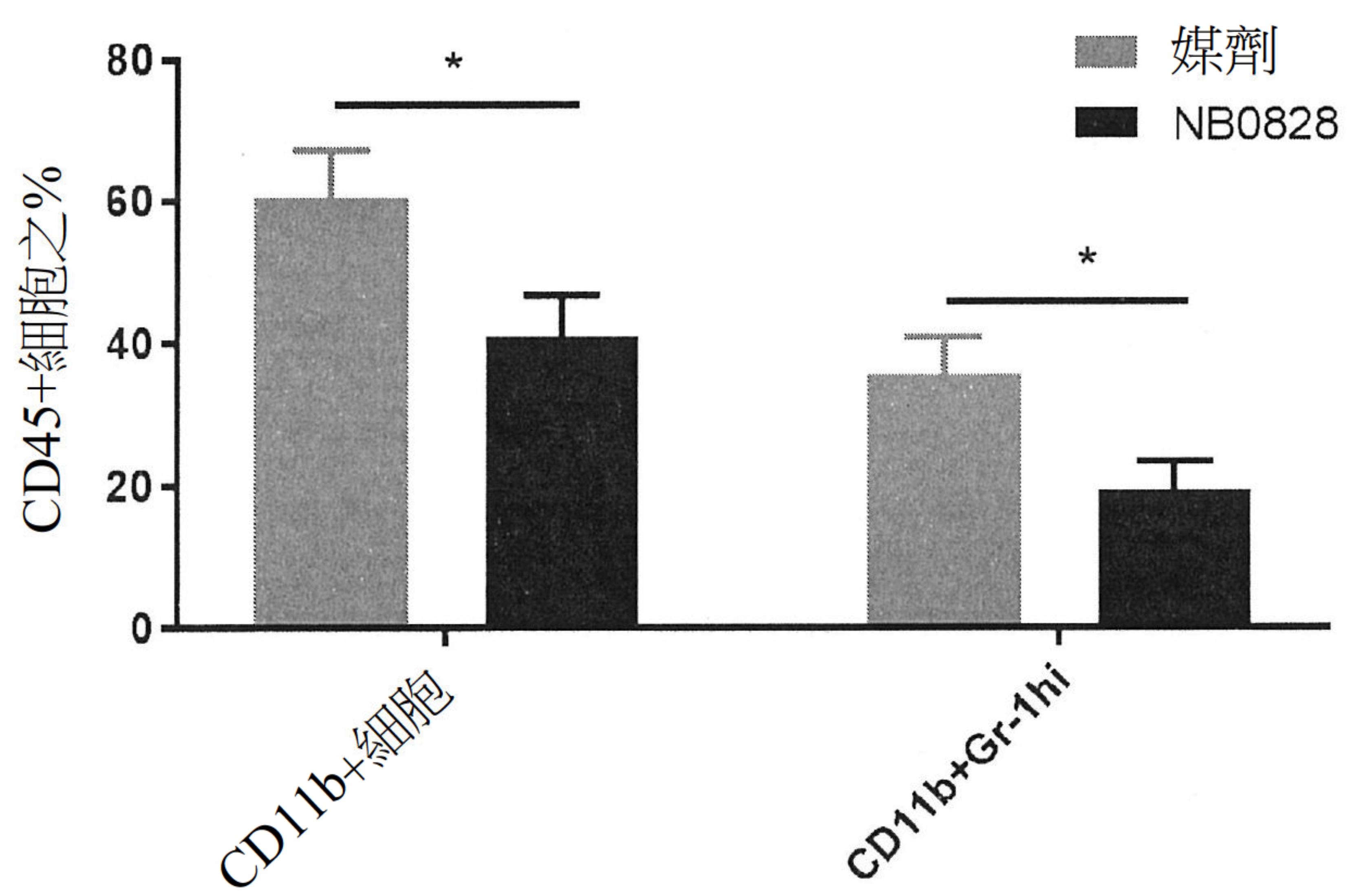
【發明圖式】



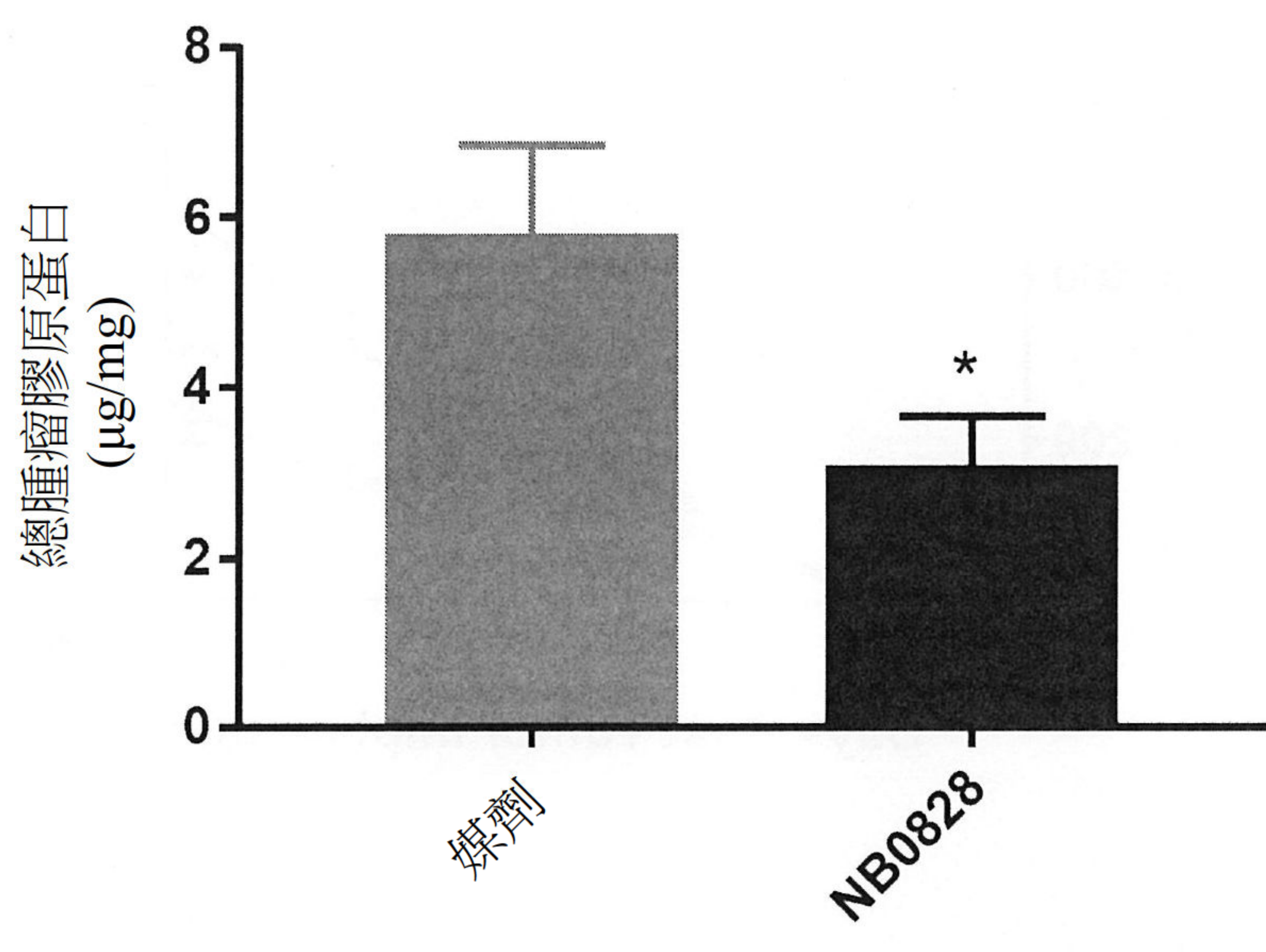
【圖1】



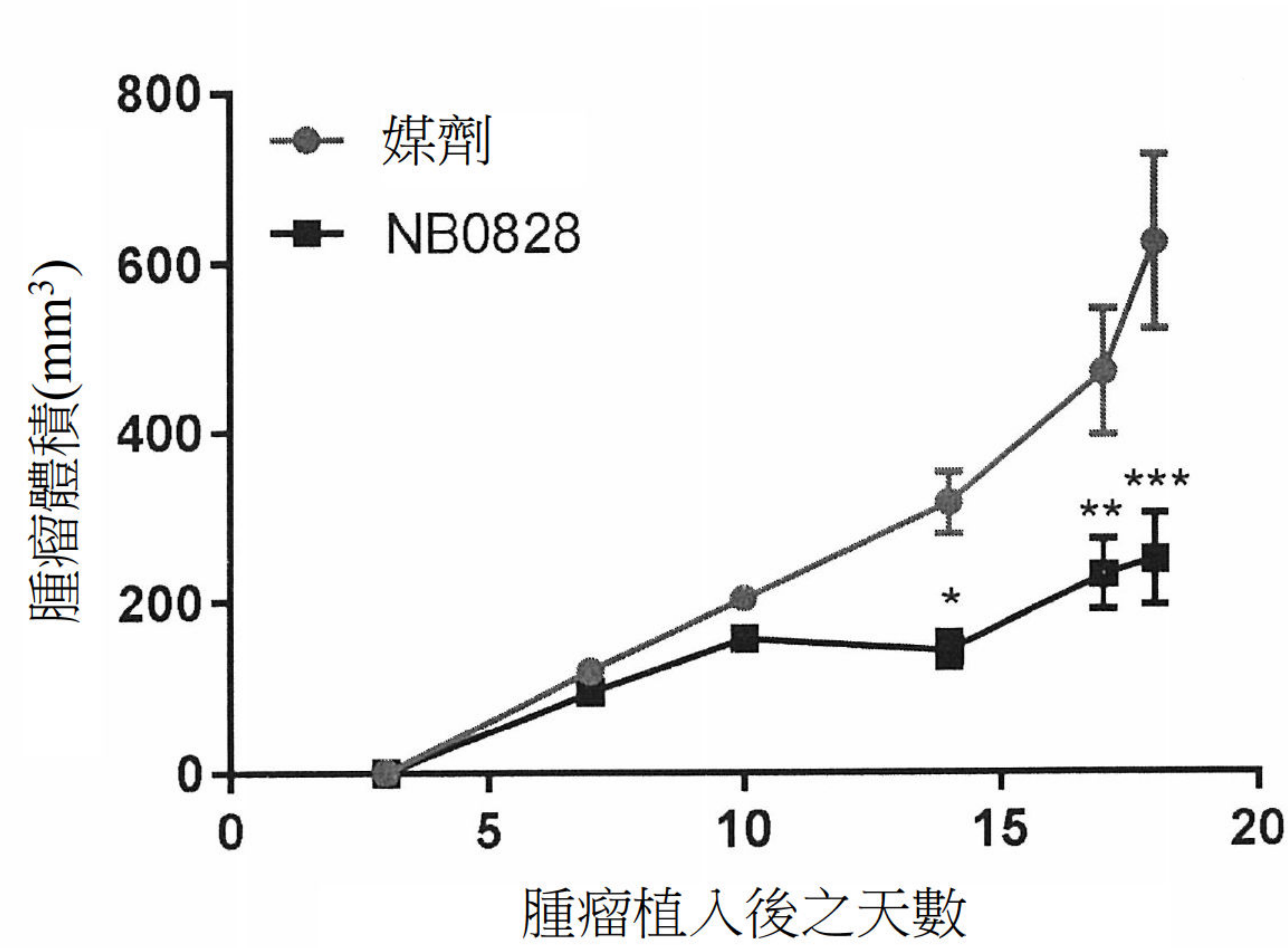
【圖2】



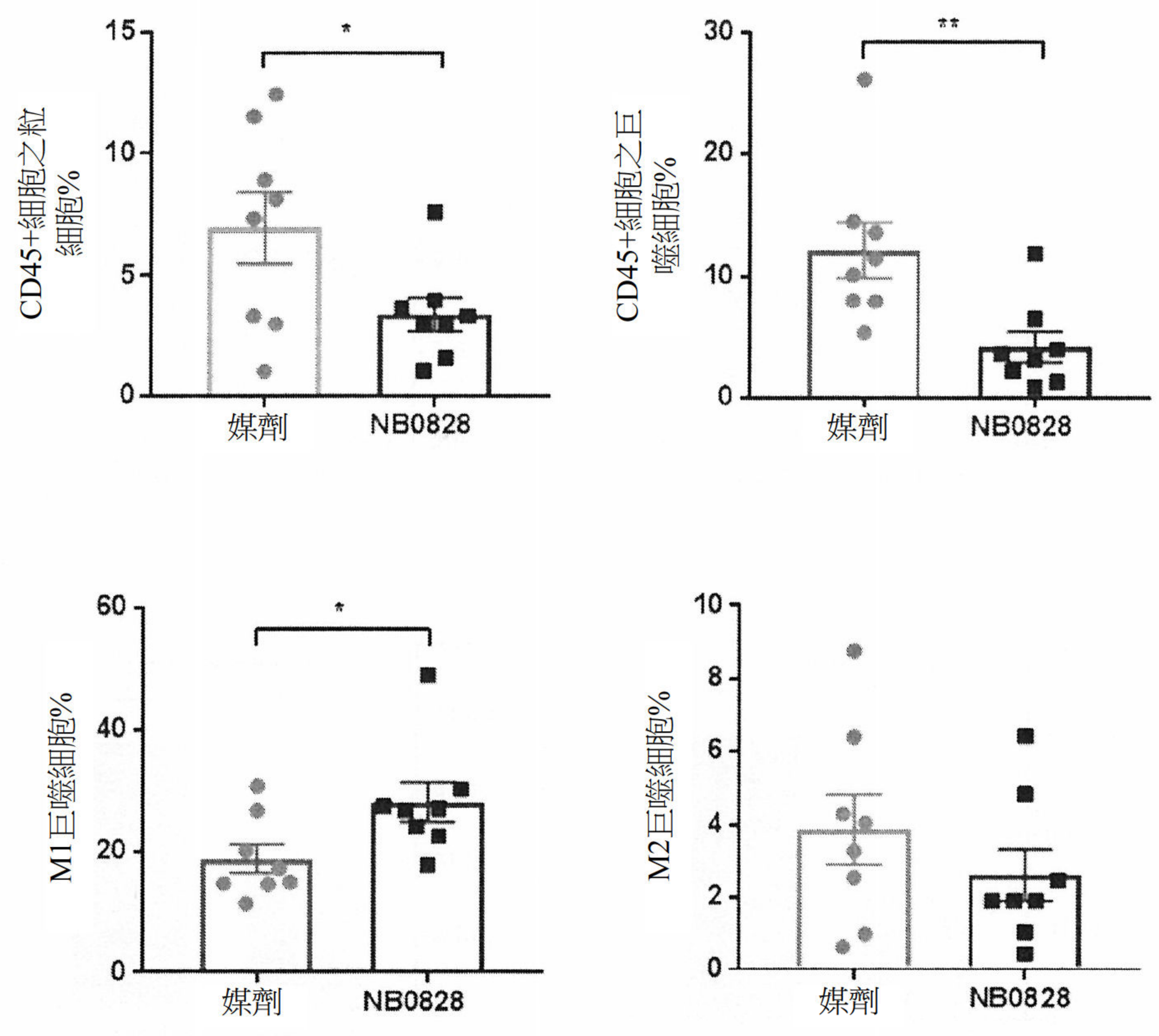
【圖3】



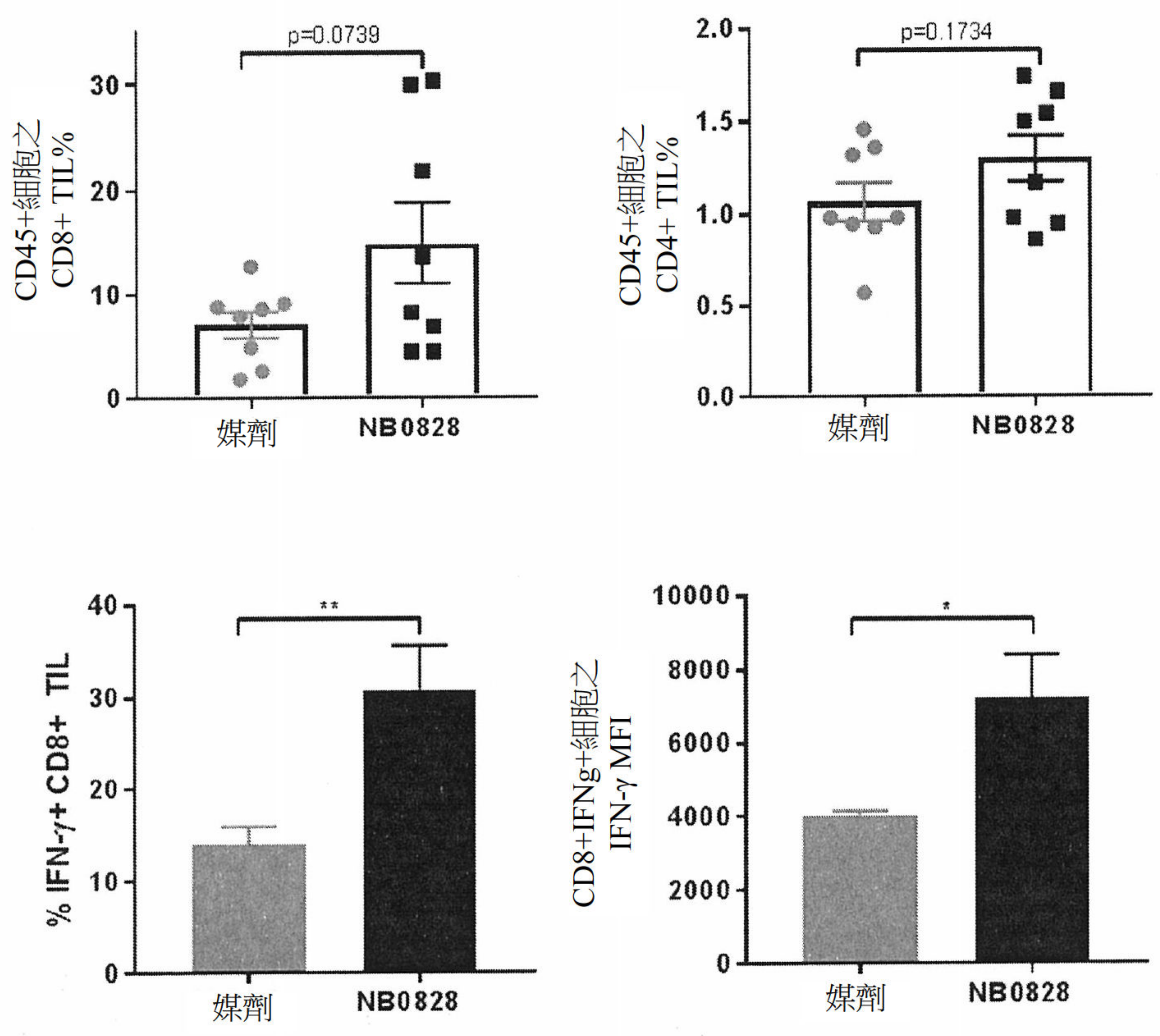
【圖4】



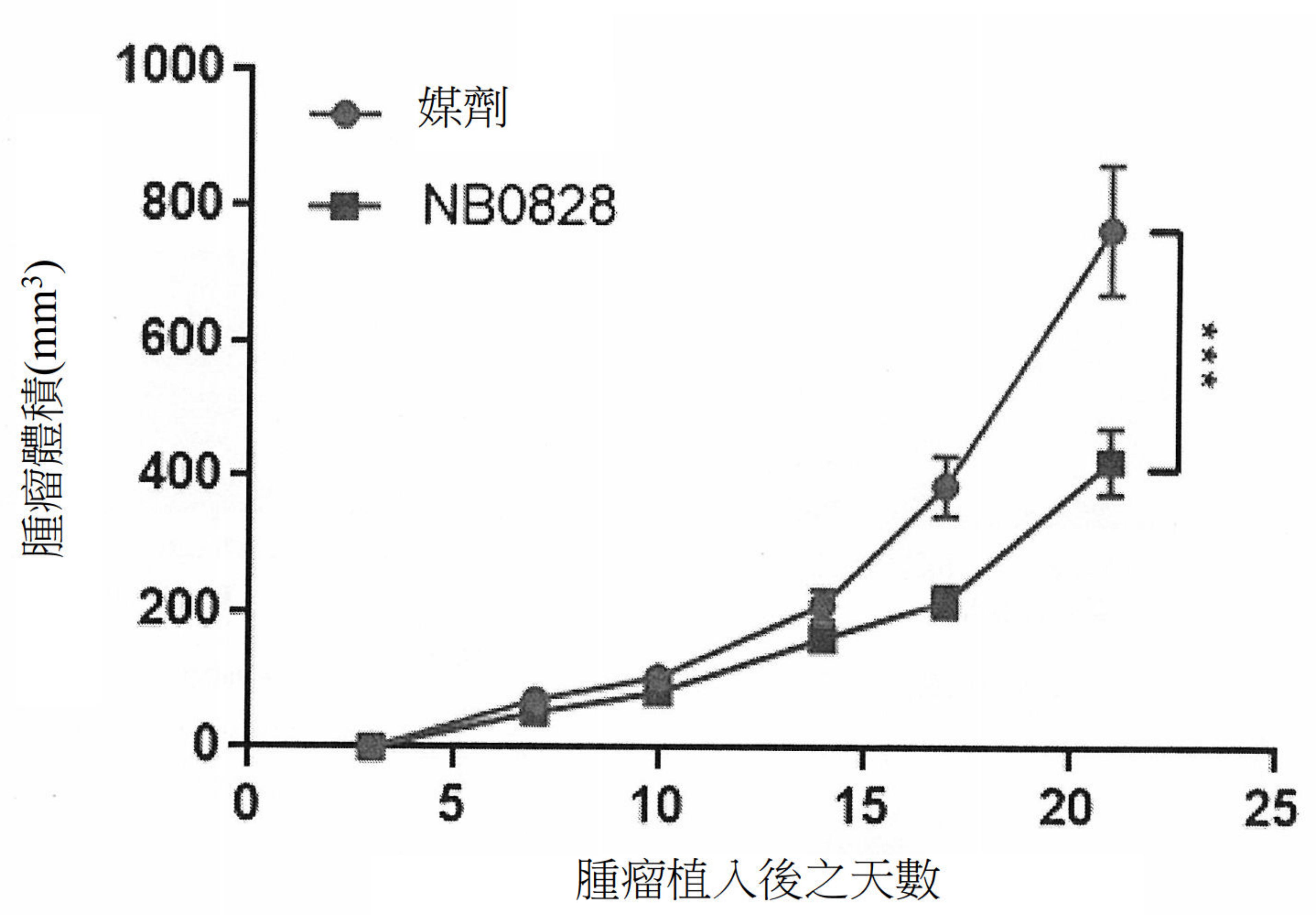
【圖5】



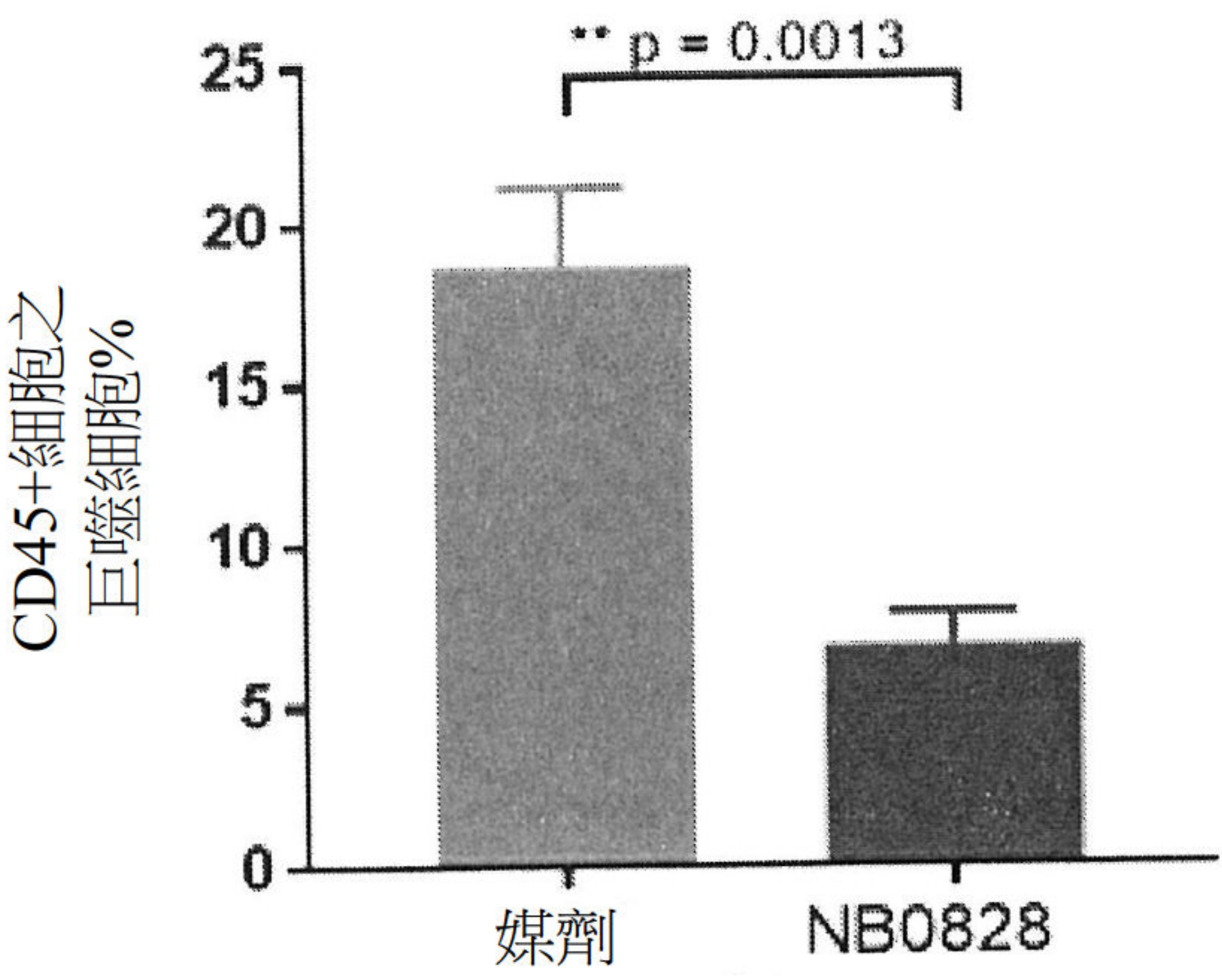
【圖6】



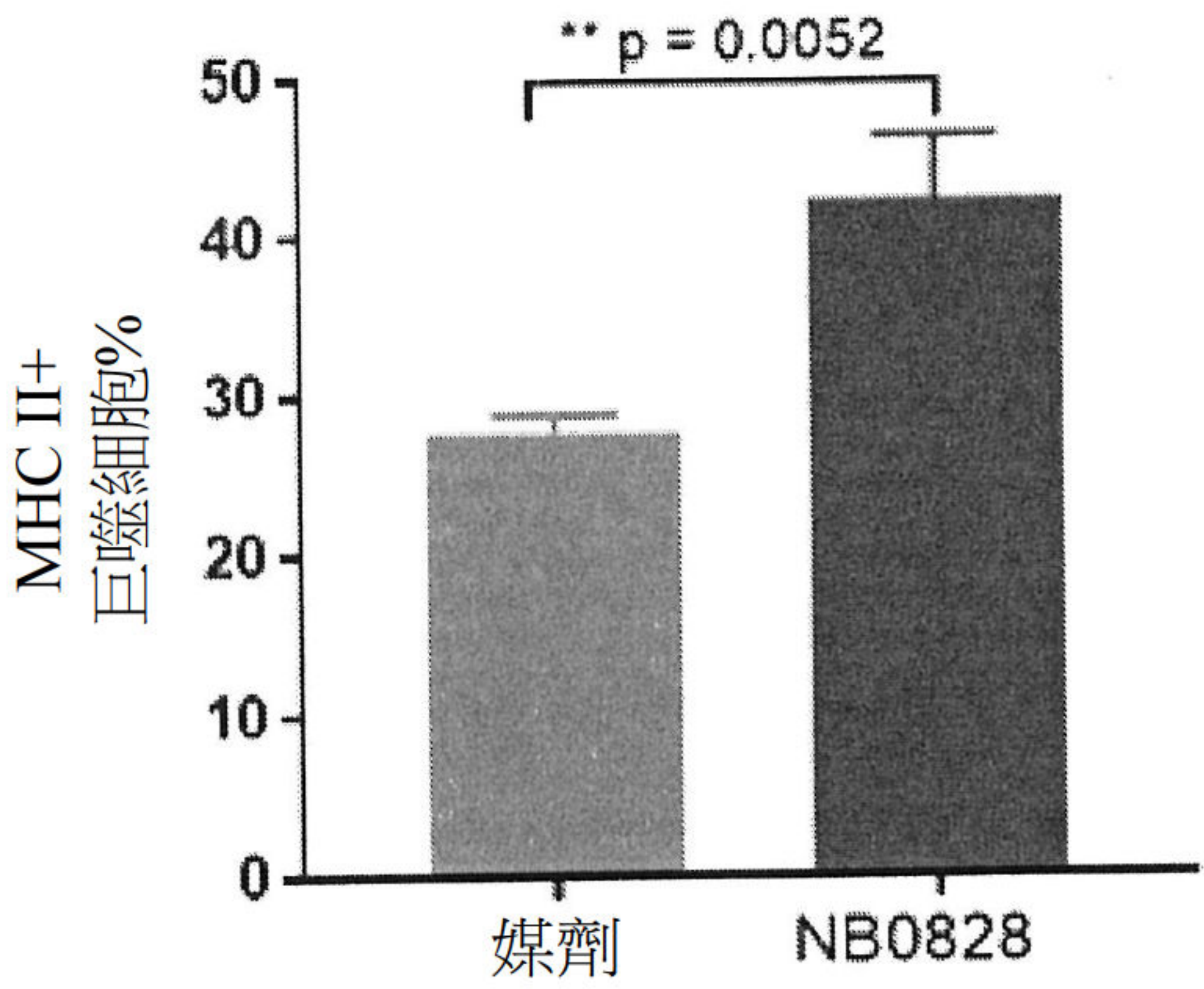
【圖7】



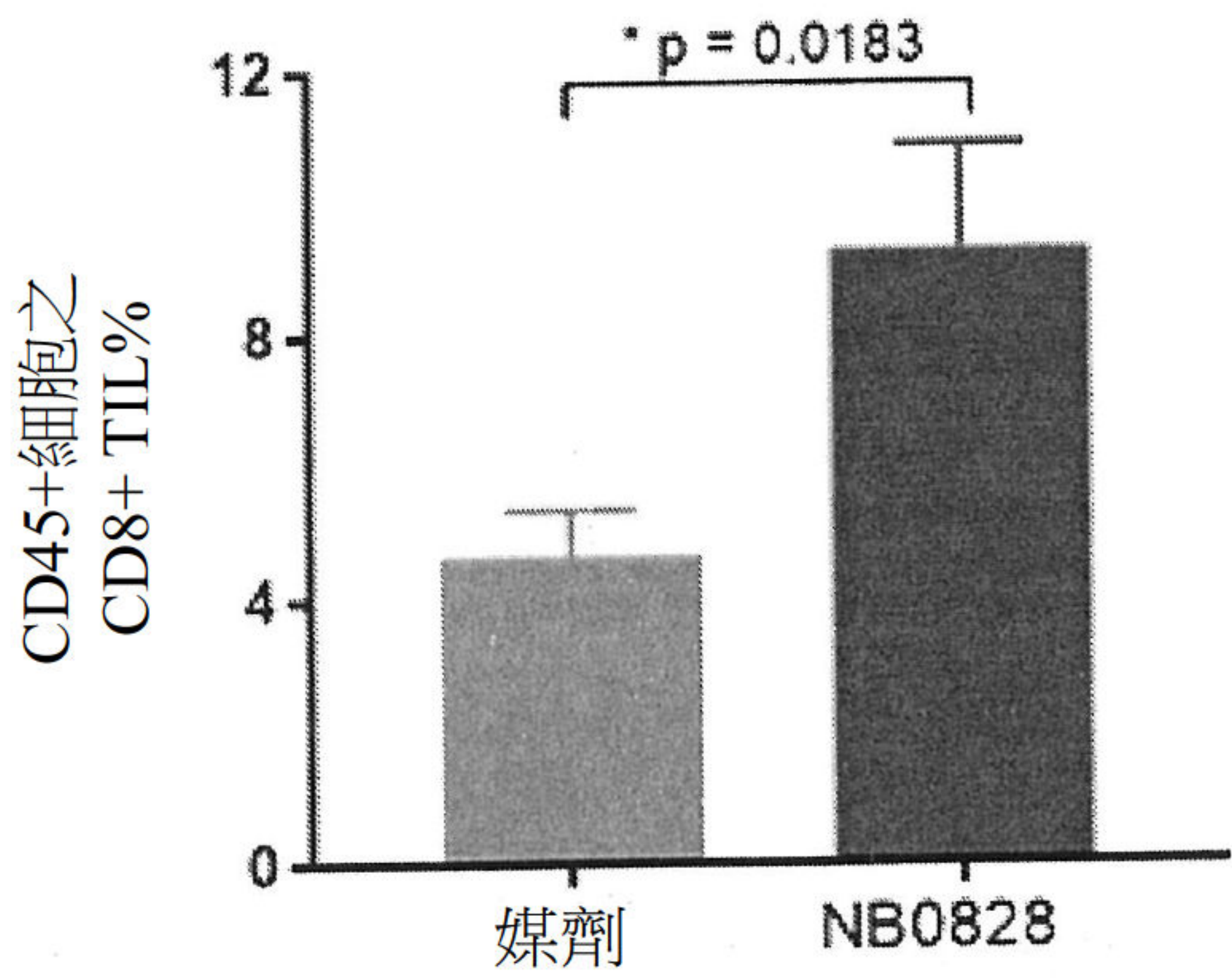
【圖8】



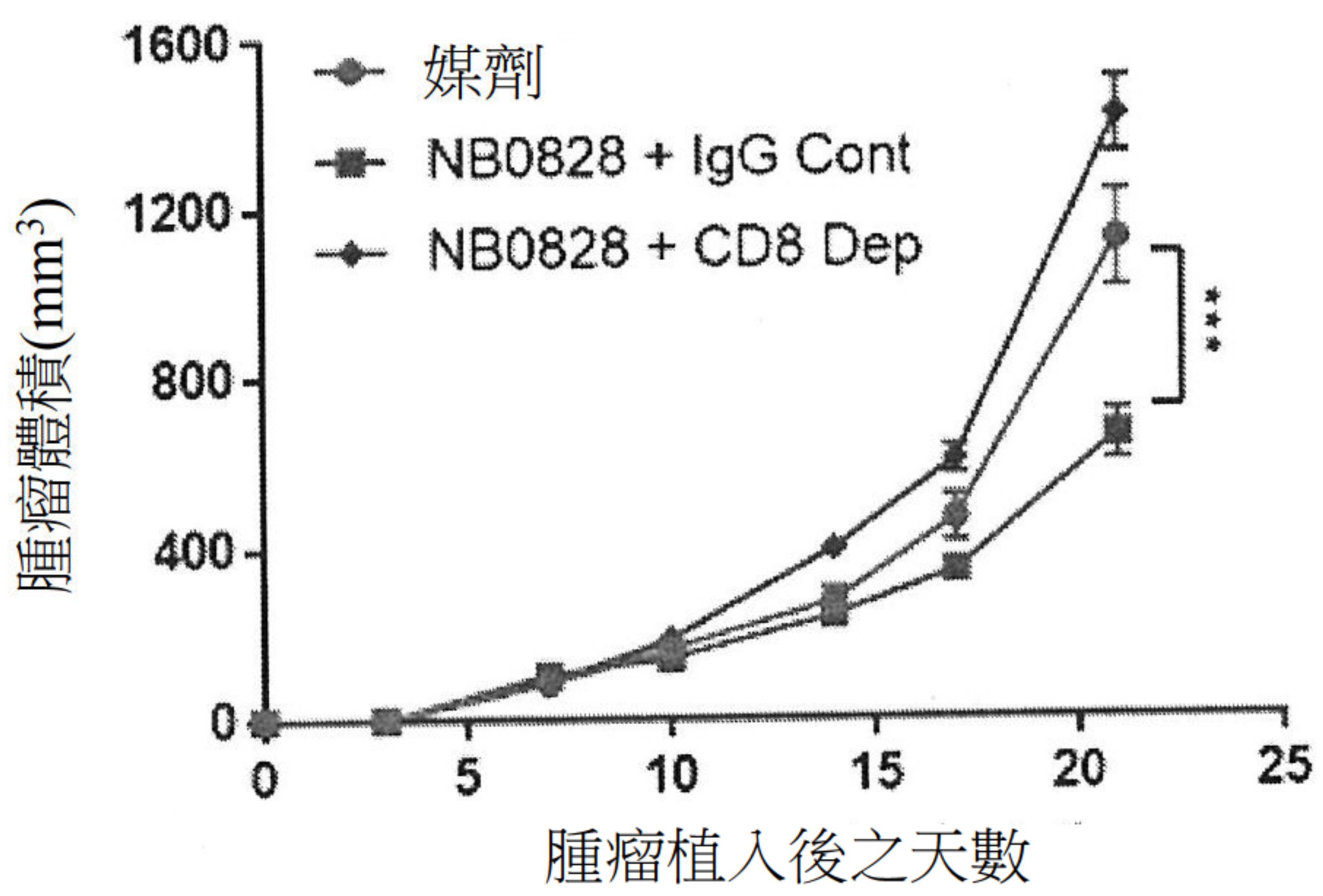
【圖9A】



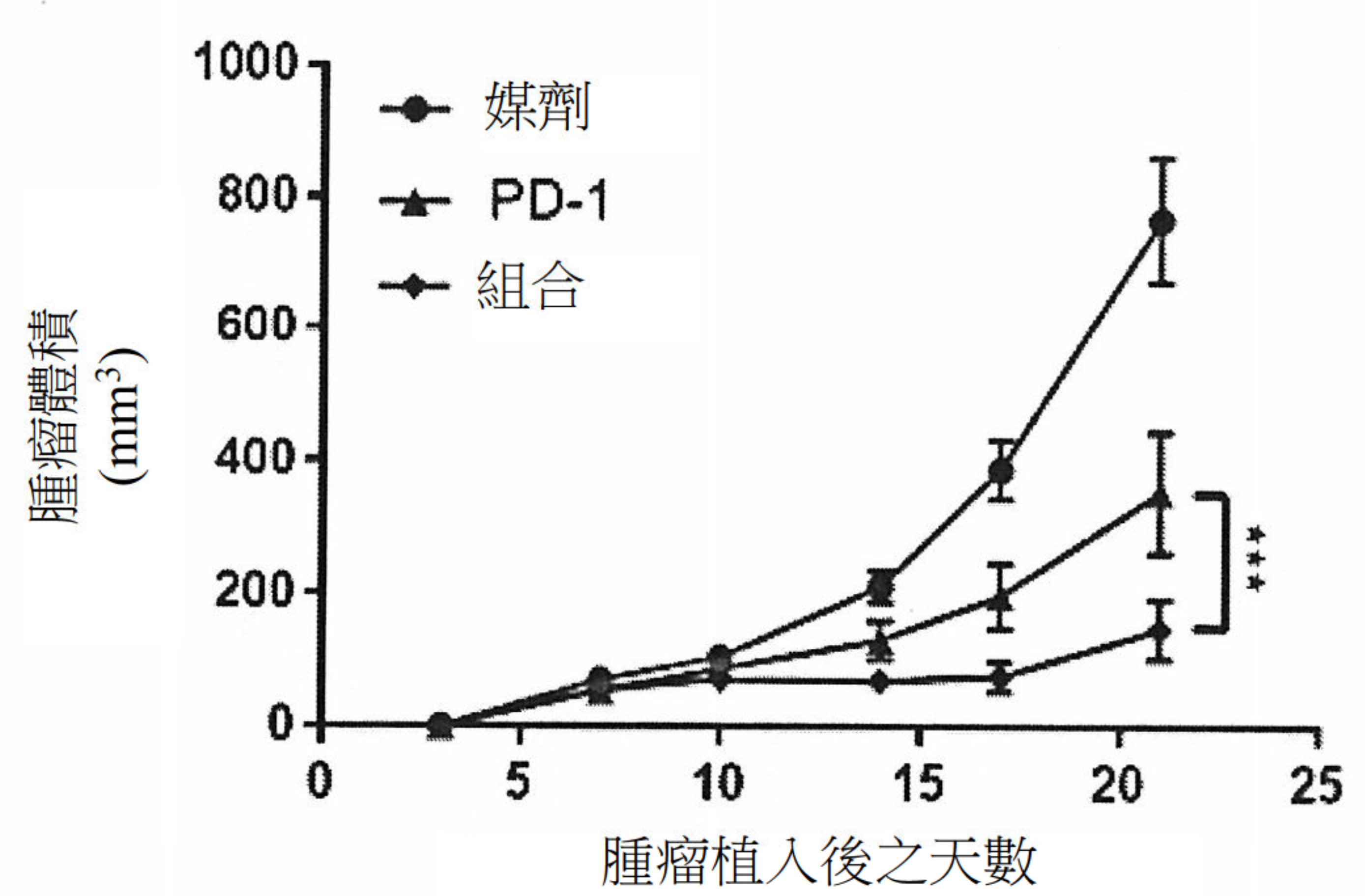
【圖9B】



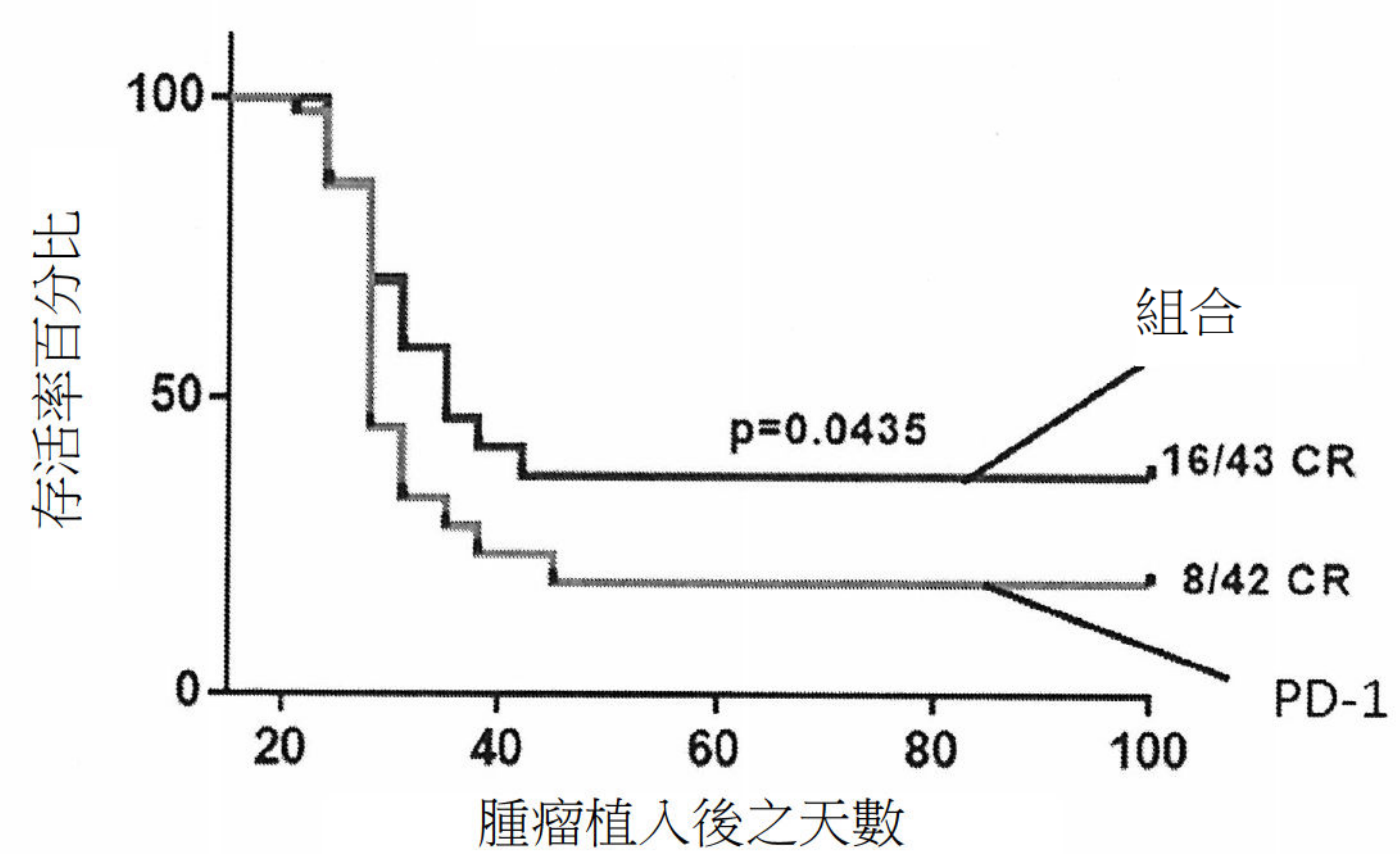
【圖9C】



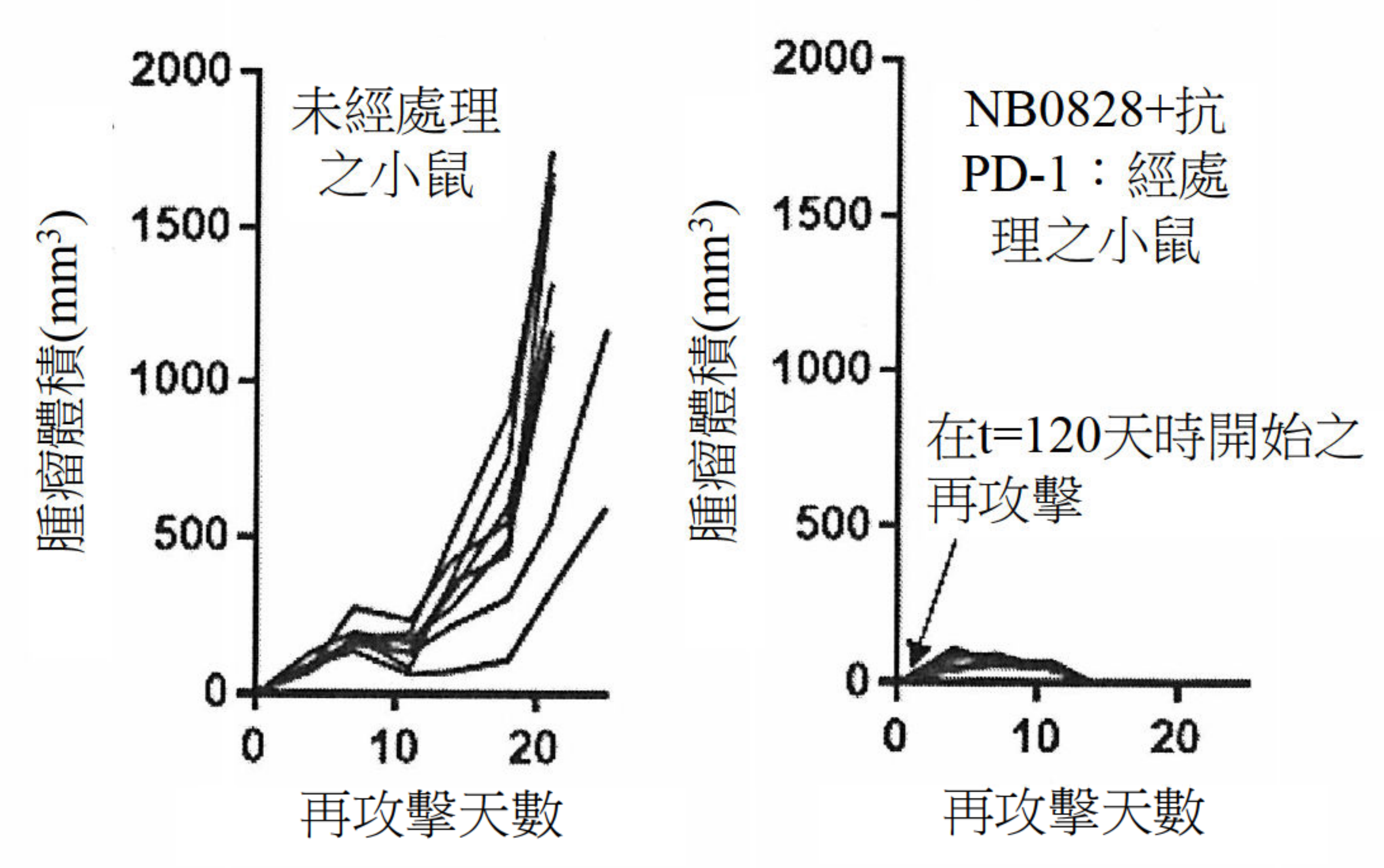
【圖9D】



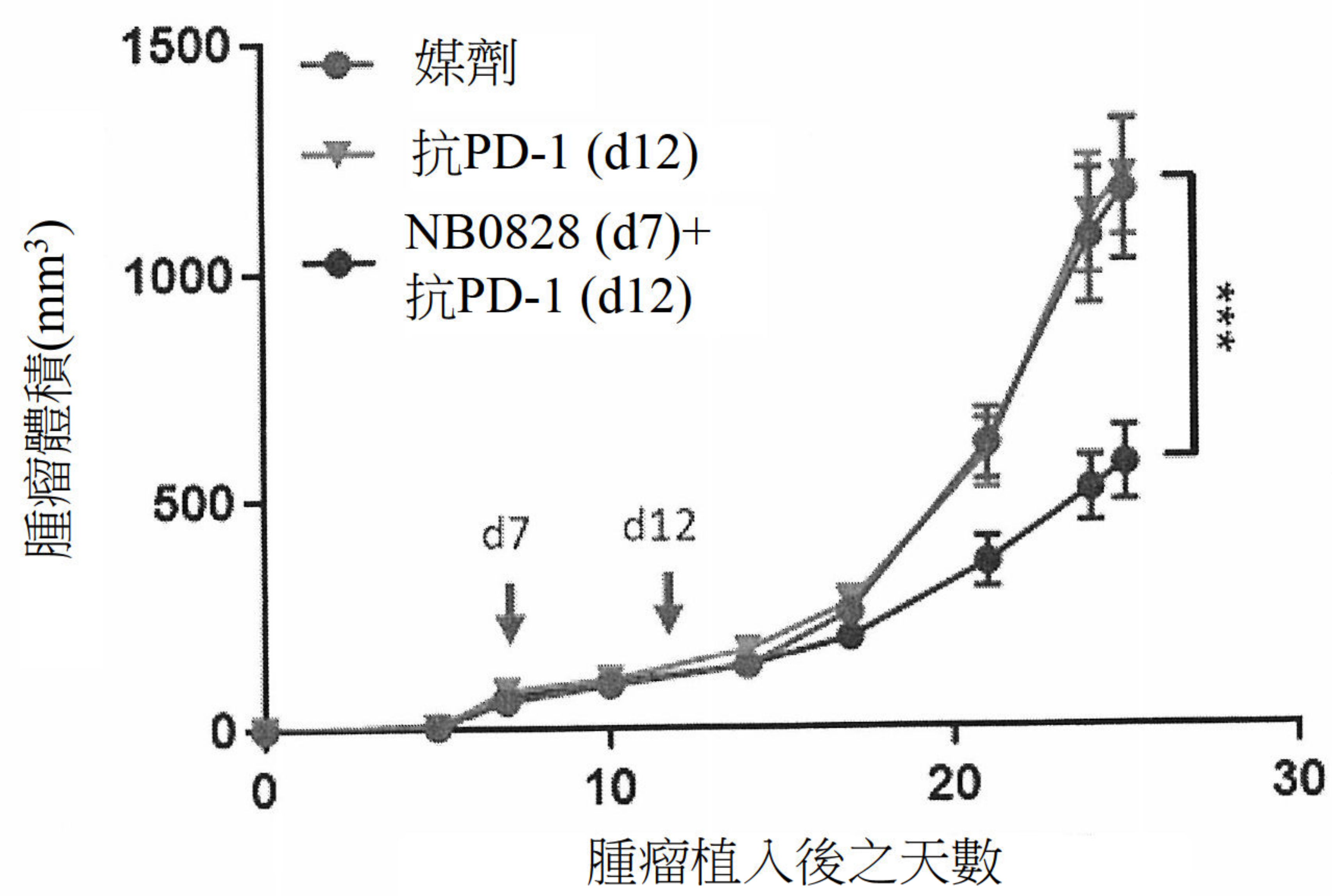
【圖10A】



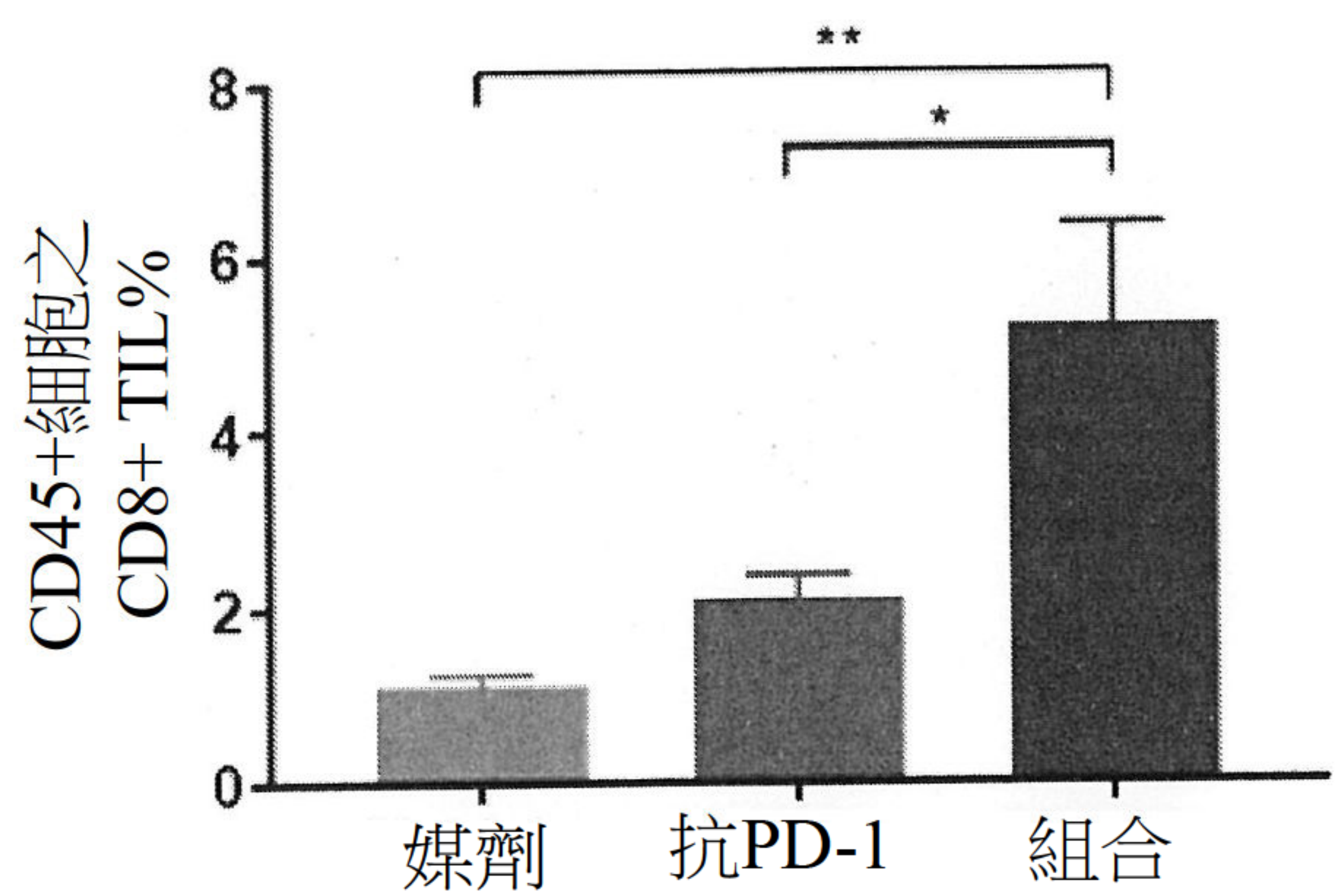
【圖10B】



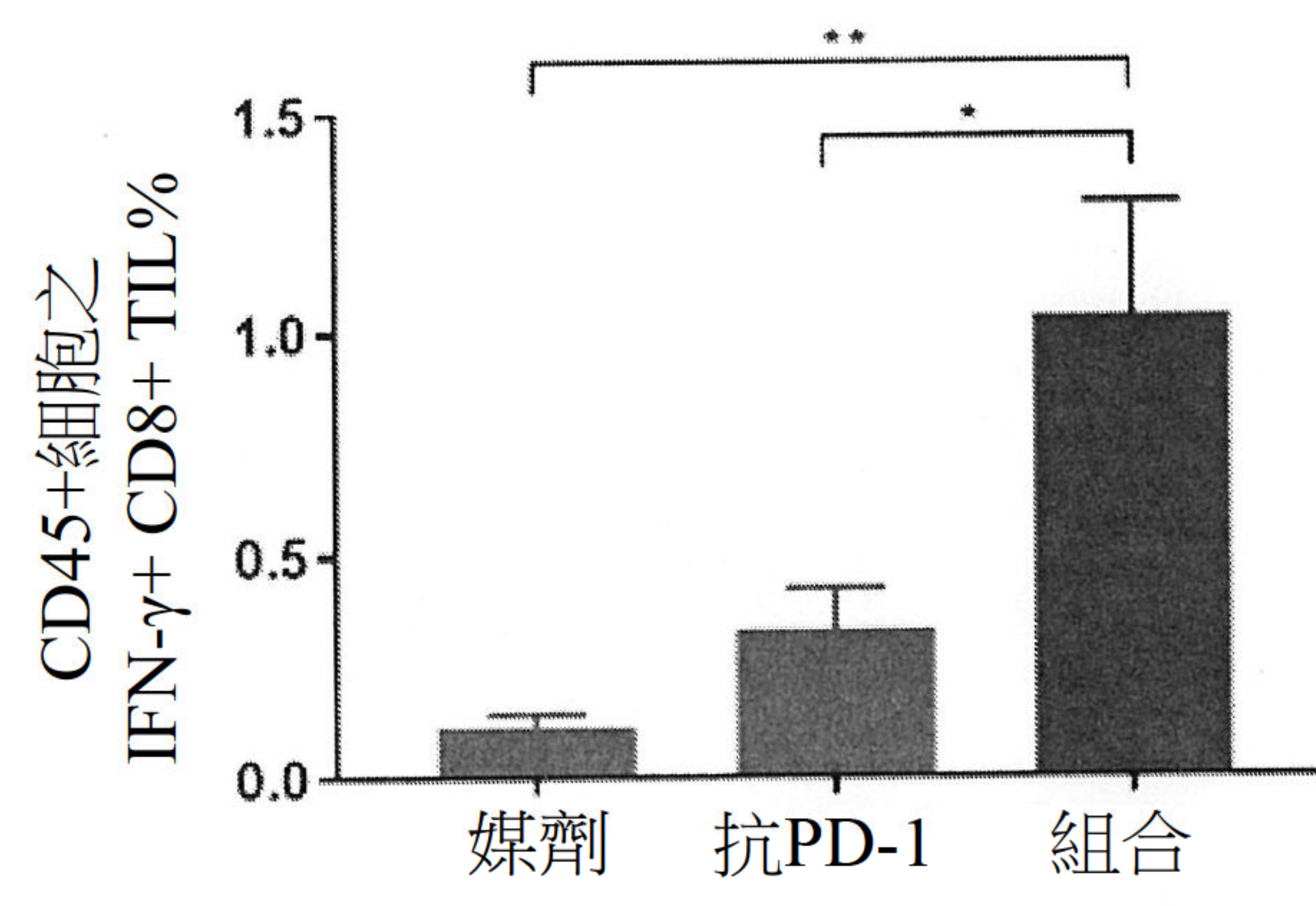
【圖10C】



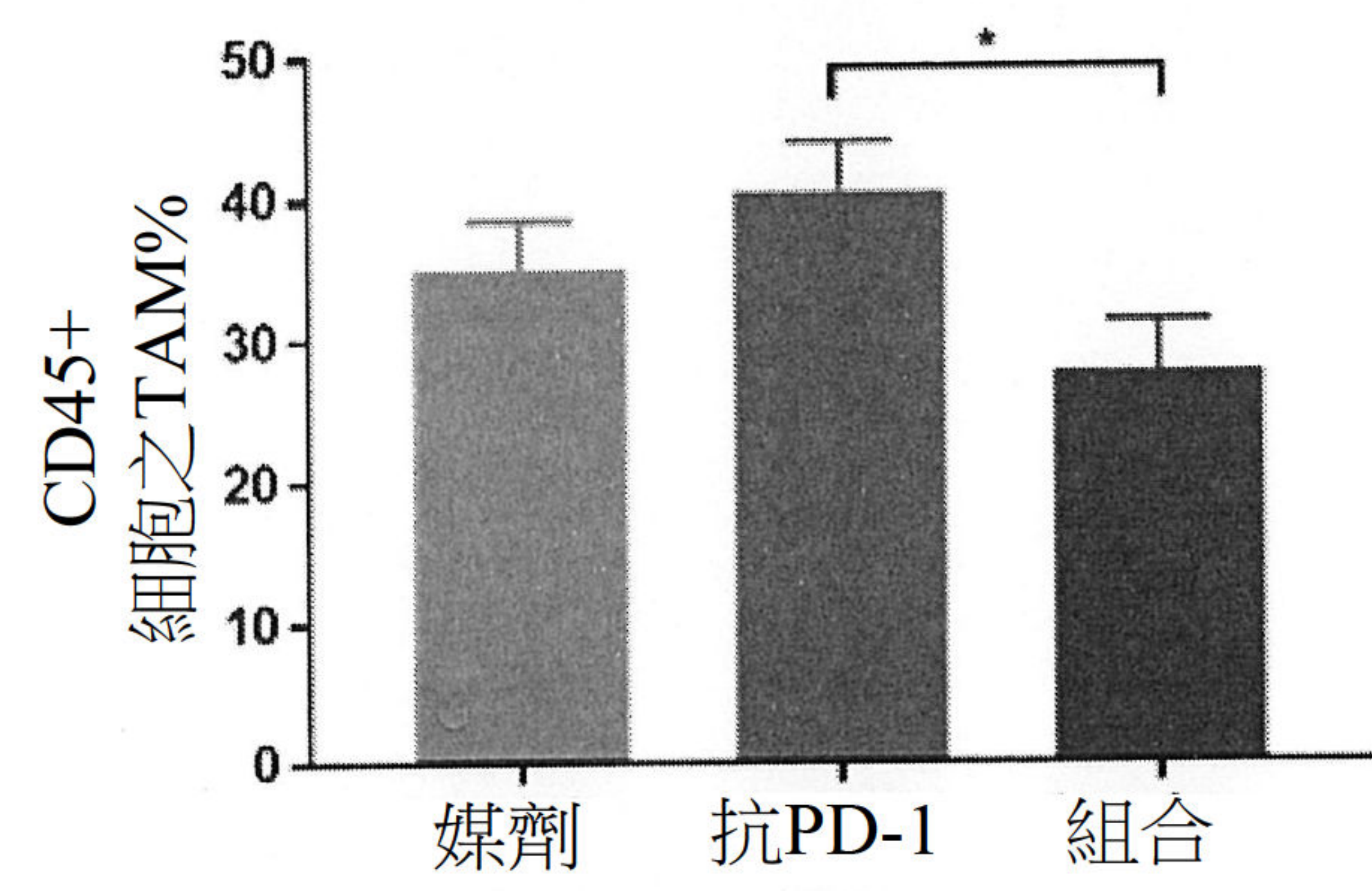
【圖11】



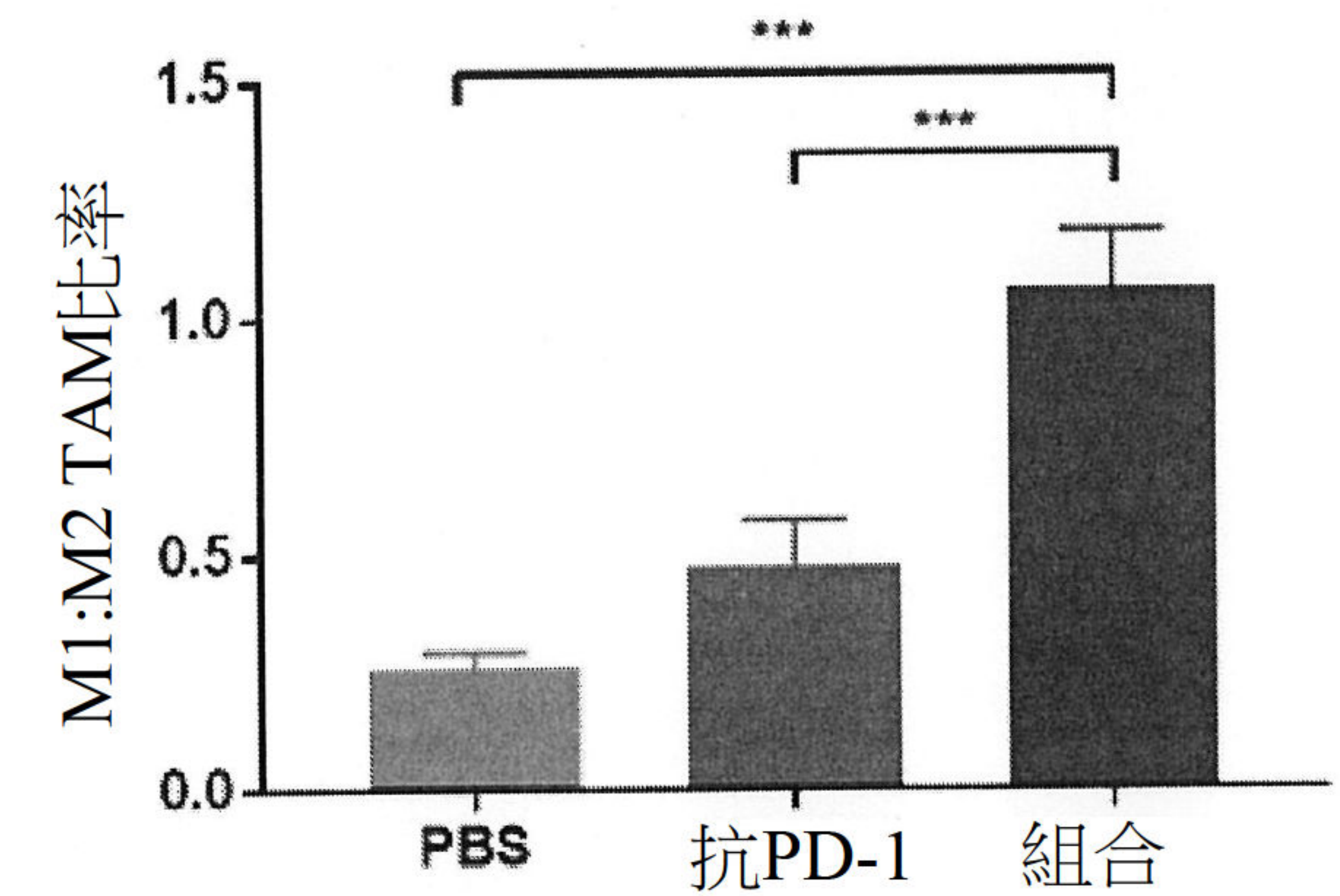
【圖12A】



【圖12B】



【圖12C】



【圖12D】