



(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 202334192 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 01 日

(21) 申請案號：112101090

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 10 日

(51) Int. Cl. :

C07K14/705 (2006.01)

C07K14/47 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

(30) 優先權：2022/01/18 美國

63/300,440

(71) 申請人：香港商 F B D 生物製劑有限公司 (香港地區) FBD BIOLOGICS LIMITED (HK)

香港

美商漢康生物製藥公司 (美國) HANCHOR BIOPHARMA INC. (US)

美國

(72) 發明人：王錦堂 WANG, JIIN-TARNG (TW)；曾琪鈴 TSENG, CHI-LING (TW)；卓宗顯

JUO, ZONG SEAN (TW)

(74) 代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：67 項 圖式數：16 共 104 頁

(54) 名稱

靶向 CD 47 / PD-L1 之蛋白質複合物及其使用方法

(57) 摘要

本發明係關於靶向 CD47、PD-L1 及/或 TGFβ 之蛋白質複合物及其使用方法。在一個態樣中，該蛋白質複合物包含：一或多個 CD47 結合結構域，每個 CD47 結合結構域包含 SIRPα 胞外區之全部或一部分；一或多個 PD-L1 結合結構域，每個 PD-L1 結合結構域包含 PD-1 胞外區之全部或一部分；以及視情況存在之一或多個 TGFβ 結合結構域，每個 TGFβ 結合結構域包含 TGFBR2 胞外區之全部或一部分。

This disclosure relates to protein complexes targeting CD47, PD-L1, and/or TGFβ, and methods of use thereof. In one aspect, the protein complexes include one or more CD47-binding domains, each including all or a portion of the SIRPα extracellular region; one or more PD-L1-binding domains, each including all or a portion of the PD-1 extracellular region; and optionally one or more TGFβ-binding domains, each including all or a portion of the TGFBR2 extracellular region.

指定代表圖：

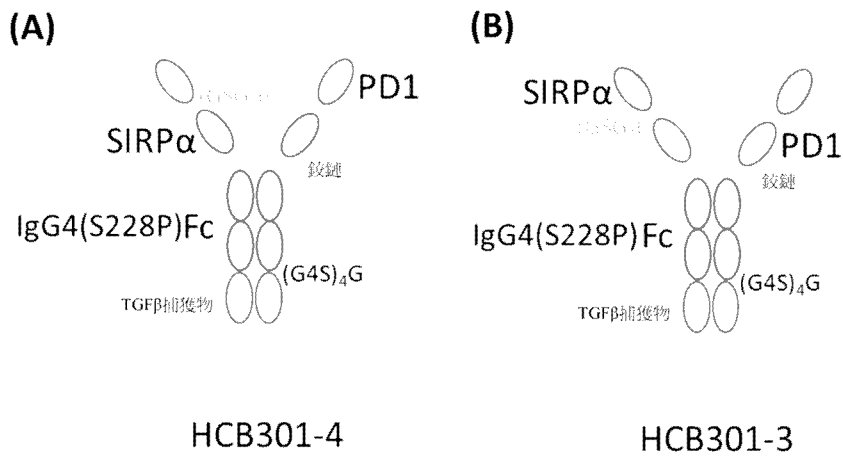


圖1A-1B

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

靶向 CD47/PD-L1 之蛋白質複合物及其使用方法

### 【英文發明名稱】

CD47/PD-L1-TARGETING PROTEIN COMPLEX AND METHODS OF USE THEREOF

### 【中文】

本發明係關於靶向 CD47、PD-L1 及/或 TGF $\beta$  之蛋白質複合物及其使用方法。在一個態樣中，該蛋白質複合物包含：一或多個 CD47 結合結構域，每個 CD47 結合結構域包含 SIRP $\alpha$  胞外區之全部或一部分；一或多個 PD-L1 結合結構域，每個 PD-L1 結合結構域包含 PD-1 胞外區之全部或一部分；以及視情況存在之一或多個 TGF $\beta$  結合結構域，每個 TGF $\beta$  結合結構域包含 TGFBR2 胞外區之全部或一部分。

### 【英文】

This disclosure relates to protein complexes targeting CD47, PD-L1, and/or TGF $\beta$ , and methods of use thereof. In one aspect, the protein complexes include one or more CD47-binding domains, each including all or a portion of the SIRP $\alpha$  extracellular region; one or more PD-L1-binding domains, each including all or a portion of the PD-1 extracellular region; and optionally one or more TGF $\beta$ -binding domains, each including all or a portion of the TGFBR2 extracellular region.

### 【指定代表圖】

圖 1A

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

靶向 CD47/PD-L1 之蛋白質複合物及其使用方法

### 【英文發明名稱】

CD47/PD-L1-TARGETING PROTEIN COMPLEX AND METHODS OF USE  
THEREOF

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於靶向 CD47 及 PD-L1 之蛋白質複合物及其使用方法。

### 【先前技術】

【0002】 信號調節蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 係來自 SIRP 家族之調節性膜糖蛋白。該信號調節蛋白  $\alpha$  主要由骨髓細胞表現，且亦由幹細胞或神經元表現。SIRP $\alpha$  充當抑制性受體且與廣泛表現之跨膜蛋白 CD47 相互作用。此相互作用消極地控制先天免疫細胞之效應子功能，如宿主細胞吞噬。SIRP $\alpha$  在巨噬細胞膜上橫向擴散且在吞噬突觸處積聚以結合 CD47，此抑制巨噬細胞吞噬之細胞骨架密集過程。CD47 藉由與信號調節蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 之 N 末端結合來提供「不要吃」之信號。已發現 CD47 在許多不同之腫瘤細胞中過表現。靶向 CD47 及/或 SIRP $\alpha$  可用於癌症免疫療法。然而，由於 CD47 亦在紅血球 (RBC) 及血小板上表現，因此抑制 CD47/SIRP $\alpha$  相互作用可能導致 RBC 及血小板之吞噬。程式性細胞死亡-1 (PD-1) 為免疫檢查點，且藉由促進淋巴結中之抗原特異性 T 細胞中之細胞凋亡同時減少調節性 T 細胞中之細胞凋亡之雙重機制預防自身免疫。需要開發靶向 CD47/SIRP $\alpha$  路徑及/或 PD-1/PD-L1 路徑之療法。

### 【發明內容】

【0003】 本發明係關於靶向 CD47 及 PD-L1 之蛋白質複合物及其使用方法。

在一些情況下，蛋白質複合物亦可靶向 TGF $\beta$ 。

【0004】在一態樣中，本發明係關於一種蛋白質複合物，該蛋白質複合物包括：(a) Fc；(b) CD47 結合結構域；以及 (c) PD-L1（程式性死亡配位體 1）結合結構域。在一些實施例中，如本文所描述之蛋白質複合物進一步包括 TGFβ（轉化生長因子 β）結合結構域。

【0005】在一些實施例中，該 CD47 結合結構域可以與表現 CD47 之細胞（例如，癌細胞）結合及/或可以阻斷 CD47 與信號調節蛋白 α（SIRPα）之間的相互作用。在一些實施例中，該 CD47 結合結構域係或包括 SIRPα 胞外結構域（例如，人 SIRPα 胞外結構域）。在一些實施例中，該 CD47 結合結構域係抗 CD47 抗體或其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）。在一些實施例中，CD47 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%相同之胺基酸序列。

【0006】在一些實施例中，該 PD-L1 結合結構域可以與表現 PD-L1 之細胞（例如，癌細胞）結合及/或可以阻斷 PD-L1 與程式性細胞死亡蛋白 1（PD-1）之間的相互作用。在一些實施例中，該 PD-L1 結合結構域係或包括 PD-1 胞外結構域（例如，人 PD-1 胞外結構域）。在一些實施例中，該 PD-L1 結合結構域係抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）。在一些實施例中，PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【0007】在一些實施例中，該 TGFβ 結合結構域能夠捕獲 TGFβ，由此增加免疫反應及/或改善腫瘤微環境。在一些實施例中，該 TGFβ 結合結構域係或包括 TGFBR2 胞外結構域（例如，人 TGFBR2 胞外結構域）。在一些實施例中，該 TGFβ 結合結構域係抗 TGFβ 抗體或其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）。在一些實施例中，TGFβ 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【0008】 在一些實施例中，Fc 係人 IgG4 Fc。在一些實施例中，CD47 結合結構域與該 Fc 中之 CH2 結構域之 N 末端連接，視情況藉由鉸鏈區。在一些實施例中，該 PD-L1 結合結構域與該 CD47 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由連接肽。在一些實施例中，PD-L1 結合結構域與該 Fc 中之 CH2 結構域之 N 末端連接，視情況藉由鉸鏈區。在一些實施例中，該 CD47 結合結構域與該 PD-L1 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由連接肽。在一些實施例中，該鉸鏈區係人 IgG4 鉸鏈區，該人 IgG4 鉸鏈區視情況具有根據 EU 編號之 S228P 突變。在一些實施例中，TGFβ 結合結構域與該 Fc 中之 CH3 結構域之 C 末端連接，視情況藉由連接肽。

【0009】 在一些實施例中，蛋白質複合物包括兩個或更多個 CD47 結合結構域。在一些實施例中，蛋白質複合物包括兩個或更多個 PD-L1 結合結構域。在一些實施例中，蛋白質複合物包括兩個或更多個 TGFβ 結合結構域。

【0010】 在一態樣中，本發明係關於一種蛋白質複合物，該蛋白質複合物包括：(a) 第一多肽，該第一多肽自 N 末端至 C 末端包括：第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGFβ 結合結構域；以及 (b) 第二多肽，該第二多肽自 N 末端至 C 末端包括：第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGFβ 結合結構域。在一些實施例中，該第一 PD-L1 結合結構域及/或該第二 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第一 CD47 結合結構域及/或該第二 CD47 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第一 TGFβ 結合結構域及/或該第二 TGFβ 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、

90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第一鉸鏈區及/或該第二鉸鏈區包括與 SEQ ID NO: 16 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第一 Fc 區及/或該第二 Fc 區包括與 SEQ ID NO: 17 至少 80%相同之序列，視情況向 C 末端添加離胺酸或丙胺酸殘基。在一些實施例中，該第一連接肽及/或該第三連接肽包括與 SEQ ID NO: 8 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第二連接肽及/或該第四連接肽包括與 SEQ ID NO: 9 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 1 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

**【0011】** 在一些實施例中，該第一多肽進一步包括第三 PD-L1 結合結構域，且該第二多肽進一步包括第四 PD-L1 結合結構域。在一些實施例中，該第三 PD-L1 結合結構域及/或該第四 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第三 PD-L1 結合結構域與該第一 PD-L1 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由第五連接肽，在一些實施例中，該第四 PD-L1 結合結構域與該第二 PD-L1 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由第六連接肽。在一些實施例中，該第五連接肽及/或該第六連接肽包括與 SEQ ID NO: 10 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 3 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

**【0012】** 在一態樣中，本發明係關於一種蛋白質複合物，該蛋白質複合物包括：(a) 第一多肽，該第一多肽自 N 末端至 C 末端包括：第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域；以及 (b) 第二多肽，該第二多肽自 N 末端至 C 末端包括：第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$

結合結構域。在一些實施例中，該第一 CD47 結合結構域及/或該第二 CD47 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第一 PD-L1 結合結構域及/或該第二 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第一 TGF $\beta$  結合結構域及/或該第二 TGF $\beta$  結合結構域包括與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第一鉸鏈區及/或該第二鉸鏈區包括與 SEQ ID NO: 16 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第一 Fc 區及/或該第二 Fc 區包括與 SEQ ID NO: 17 至少 80%相同之序列，視情況向 C 末端添加離胺酸或丙胺酸殘基。在一些實施例中，該第一連接肽及/或該第三連接肽包括與 SEQ ID NO: 8 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第二連接肽及/或該第四連接肽包括與 SEQ ID NO: 9 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 2 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

**【0013】** 在一些實施例中，該第一多肽進一步包括第三 PD-L1 結合結構域，且該第二多肽進一步包括第四 PD-L1 結合結構域。在一些實施例中，該第三 PD-L1 結合結構域及/或該第四 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。在一些實施例中，該第三 PD-L1 結合結構域融合在該第一 PD-L1 結合結構域與該第一鉸鏈區之間，視情況藉由該第一 PD-L1 結合結構域與該第三 PD-L1 結合結構域之間的第五連接肽，在一些實施例中，該第四 PD-L1 結合結構域融合在該第二 PD-L1 結合結構域與該第二鉸鏈區之間，視情況藉由該第二 PD-L1 結合結構域與該第四 PD-L1 結合結構域之間的第六連接肽。在一些實施例中，該第五連接肽及/或該第六連接肽包括與 SEQ ID NO: 10 至少 80%相同之序列。在一些實施例中，該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 4 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【0014】 在一態樣中，本發明係關於一種核酸，該核酸包括編碼如本文所描述之蛋白質複合物之聚核苷酸。在一些實施例中，該核酸係 DNA(例如，cDNA) 或 RNA(例如，mRNA)。

【0015】 在一態樣中，本發明係關於一種載體，該載體包括如本文所描述之核酸中之一或多種核酸。

【0016】 在一態樣中，本發明係關於一種細胞，該細胞包括如本文所描述之載體。在一些實施例中，該細胞為 CHO 細胞。

【0017】 在一態樣中，本發明係關於一種細胞，該細胞包括如本文所描述之核酸中之一或多種核酸。

【0018】 在一態樣中，本發明係關於一種產生蛋白質複合物之方法，該方法包括：(a) 在足以使如本文所描述之細胞產生該蛋白質複合物之條件下培養該細胞；以及 (b) 收集由該細胞產生之該蛋白質複合物。

【0019】 在一態樣中，本發明係關於一種蛋白質結合物，該蛋白質結合物包括如本文所描述之蛋白質複合物，該蛋白質複合物與治療劑共價結合。在一些實施例中，該治療劑係細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。

【0020】 在一態樣中，本發明係關於一種治療患有癌症之個體之方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之包括如本文所描述之蛋白質複合物之組合物或如本文所描述之蛋白質結合物。在一些實施例中，個體具有表現 CD47 及/或 PD-L1 之癌細胞。在一些實施例中，該癌症係乳癌、前列腺癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤、間皮瘤、肺癌、卵巢癌、大腸癌、胸膜腫瘤、膠質母細胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宮內膜癌、胃癌、膽管癌、頭頸癌、血癌或其組合。

【0021】 在一態樣中，本發明係關於一種降低腫瘤生長速率之方法，該方法包括使腫瘤細胞與有效量之包括如本文所描述之蛋白質複合物之組合物或如

本文所描述之蛋白質結合物接觸。

**【0022】** 在一態樣中，本發明係關於一種殺死腫瘤細胞之方法，該方法包括使腫瘤細胞與有效量之包括如本文所描述之蛋白質複合物之組合物或如本文所描述之蛋白質結合物接觸。

**【0023】** 在一態樣中，本發明係關於一種醫藥組合物，該醫藥組合物包括如本文所描述之蛋白質複合物以及藥學上可接受之載劑。

**【0024】** 如本文所使用的，術語「蛋白質複合物」或「蛋白質構築體」係指具有一或多種多肽之複合物。在一些實施例中，蛋白質複合物具有兩個或更多個多肽，其中多肽可以彼此締合，形成二聚體或多聚體。

**【0025】** 如本文所使用的，術語「CD47 結合結構域」係指可以與 CD47 結合之蛋白質結構域。在一些實施例中，該 CD47 結合結構域可為抗 CD47 抗體、其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）或 CD47 結合蛋白或其一部分。在一些實施例中，CD47 結合結構域可以具有一或多個自穩定結構域。在一些實施例中，CD47 結合結構域包括 SIRP $\alpha$  胞外結構域或由其組成。SIRP $\alpha$  可為野生型 SIRP $\alpha$ 、人 SIRP $\alpha$ 、源自野生型 SIRP $\alpha$  之多肽（例如，具有突變）或其一部分（例如，SIRP $\alpha$  之胞外區或 SIRP $\alpha$  之 IgV 結構域）。在一些實施例中，源自野生型 SIRP $\alpha$  之多肽可以具有一或多個突變。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域包括 SIRP $\alpha$  或其變體之整個胞外區或基本上由其組成。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域包括 SIRP $\alpha$  之 IgV 結構域或其變體或由其組成。在一些實施例中，IgV 結構域具有一或多個突變。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域具有一或多個突變。

**【0026】** 如本文所使用的，術語「PD-L1 結合結構域」係指可以與 PD-L1 結合之蛋白質結構域。在一些實施例中，該 PD-L1 結合結構域可為抗 PD-L1 抗體、其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）或 PD-L1 結合蛋白或其一部分。在一些實施例中，PD-L1 結合結構域可以具有一或多個自穩定結構域。在一些實施

例中，PD-L1 結合結構域包括 PD-1 胞外結構域或由其組成。PD-1 可為野生型 PD-1、人 PD-1、源自野生型 PD-1 之多肽（例如，具有突變）或其一部分（例如，PD-1 之胞外區）。在一些實施例中，源自野生型 PD-1 之多肽可以具有一或多個突變。在一些實施例中，PD-1 胞外結構域包括 PD-1 或其變體之整個胞外區或基本上由其組成。在一些實施例中，PD-1 胞外結構域包括 PD-1 或其變體之胞外區之一部分或由其組成。在一些實施例中，PD-1 胞外結構域具有一或多個突變。

**【0027】** 如本文所使用的，術語「癌症」係指具有自主生長能力之細胞。此類細胞之實例包含具有以使細胞生長迅速激增為特徵之異常狀態或狀況之細胞。該術語旨在包含癌性生長，例如腫瘤、致癌過程、轉移性組織及惡性轉化之細胞、組織或器官，而不論組織病理學類型或侵襲性階段。亦包含如呼吸系統、心血管系統、腎臟系統、生殖系統、血液系統、神經系統、肝臟系統、胃腸道系統及內分泌系統等各種器官系統之惡性腫瘤；以及包含惡性腫瘤之腺癌，如大多數大腸癌、腎細胞癌、前列腺癌及/或睪丸腫瘤、非小細胞肺癌及小腸癌。「自然出現」之癌症包含並非藉由將癌細胞移植至個體活體內來實驗性誘導之任何癌症，且包含例如自發出現之癌症、由於患者暴露於致癌物質所引起之癌症、由插入轉基因致癌基因或敲除腫瘤抑制基因而引起之癌症以及由於感染，例如病毒感染，所引起之癌症。術語「癌 (carcinoma)」是此項技術熟知的且係指上皮或內分泌組織之惡性腫瘤。術語亦包含癌肉瘤，該癌肉瘤包含由癌性組織及肉瘤組織構成之惡性腫瘤。「腺癌」係指源自腺體組織之癌或其中腫瘤細胞形成可識別之腺體結構之癌。術語「肉瘤」是此項技術熟知的，且係指間充質衍生之惡性腫瘤。術語「造血系統腫瘤病症」包含係關於造血來源之增生性/腫瘤細胞之疾病。造血系統腫瘤病症可以由髓系、淋巴系或紅血球譜系或其前體細胞引起。血液癌症係始於如骨髓等造血組織或免疫系統細胞之癌症。血液癌症之實例包含例如

白血病、淋巴瘤及多發性骨髓瘤等。

**【0028】** 如本文所使用的，術語「個體」及「患者」在整個說明書中可互換使用，且描述提供根據本發明之方法進行治療之動物、人或非人。在本發明中設想獸醫應用及非獸醫應用。人類患者可為成年人或青少年（例如，18 歲以下之人）。除了人類，患者包含但不限於小鼠、大鼠、倉鼠、豚鼠、家兔、雪貂、貓、犬及靈長類動物。包含例如非人靈長類動物（例如，猴子、黑猩猩、大猩猩等）、嚙齒動物（例如，大鼠、小鼠、沙鼠、倉鼠、雪貂、家兔）、兔類動物、豬類動物（例如，豬、小型豬）、馬、犬、貓、牛及其他家畜動物、農場動物及動物園動物。

**【0029】** 如本文所使用的，術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用以指代至少兩個胺基酸中之任意長度之胺基酸之聚合物。

**【0030】** 如本文所使用的，術語「聚核苷酸」、「核酸分子」及「核酸序列」在本文中可互換使用以指代至少兩個核苷酸中之任意長度之核苷酸之聚合物，且包含但不限於 DNA、RNA、DNA/RNA 雜交體及其修飾。

**【0031】** 除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之普通技術人員通常理解之相同之含義。本文描述用於本發明之方法及材料；亦可使用其他在此項技術已知之合適之方法及材料。材料、方法及實例僅為說明性的，而不旨在為限制性的。本文提及之所有出版物、專利申請案、專利、序列、資料庫條目及其他參考文獻藉由引用以其全文併入。在衝突之情況下，將以本說明書（包含定義）為準。

**【0032】** 本發明之其他特徵及優點將藉由以下詳細描述及附圖以及申請專利範圍變得顯而易知。

### **【圖式簡單說明】**

### **【0033】**

圖 1A-1D 分別示出 HCB301-4、HCB301-3、HCB301-2 及 HCB301-1 之示意性結構。

圖 2 示出 HCB301 蛋白與表現 CD47 之轉染 CHO-S 細胞之全細胞結合結果。

圖 3 示出 HCB301 蛋白與表現 PD-L1 之轉染 CHO-S 細胞之全細胞結合結果。

圖 4 示出 HCB301 蛋白與表現 CD47 之 FaDu 細胞之全細胞結合結果。

圖 5A-5B 示出 HCB301 蛋白之 RBC 結合結果。圖 5B 示出在無 Hu5F9-G4 曲線之情況下之結果。

圖 6A-6B 示出 HCB301 蛋白之血小板結合結果。圖 6B 示出在無 Hu5F9-G4 曲線之情況下之結果。

圖 7A 示出人 TGF $\beta$ 1 結合結果及 HCB301 蛋白之 EC50 值。IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作陽性對照。

圖 7B 示出人 TGF $\beta$ 2 結合結果及 HCB301 蛋白之 EC50 值。IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作陽性對照。

圖 7C 示出人 TGF $\beta$ 3 結合結果及 HCB301 蛋白之 EC50 值。IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作陽性對照。

圖 8A 示出在 32 pM 濃度下之 HCB301 蛋白與未轉染之 OE19 細胞及轉染之表現 PD-L1 之 OE19 細胞之結合百分比。

圖 8B-8G 示出 SIRP $\alpha$ \_G4、PD1\_G4、HCB301-3、HCB301-4、HCB301-1 及 HCB301-2 與未轉染之 OE19 細胞及轉染之表現 PD-L1 之 OE19 細胞之結合曲線。

圖 9 示出 HCB301 蛋白之 RBC 血凝結果。

圖 10 示出 HCB301 蛋白對表現 CD47 之轉染之 CHO-S 細胞之 SIRP $\alpha$ /CD47

阻斷結果。

圖 11 示出 HCB301 蛋白與表現 PD-L1 之轉染 CHO-S 細胞之 PD-1/PD-L1 阻斷結果。生物素-PD1-ECD-Fc 表示生物素化之 PD1\_G4。

圖 12A 示出 HCB301 蛋白抑制之 TGF $\beta$ -1 介導之 smad2 報告基因活性。

圖 12B 示出 HCB301 蛋白抑制之 TGF $\beta$ -2 介導之 smad2 報告基因活性。

圖 12C 示出 HCB301 蛋白抑制之 TGF $\beta$ -3 介導之 smad2 報告基因活性。

圖 13 示出 Raw264.7 小鼠巨噬細胞對表現 CD47 之 Jurkat 細胞之誘導之 HCB301 蛋白吞噬活性。

圖 14A 示出在存在 TGF $\beta$ 1 之情況下 MLR 測定中之 HCB301 蛋白誘導之細胞增殖。

圖 14B 示出在存在 TGF $\beta$ 1 之情況下 MLR 測定中之 HCB301 蛋白誘導之 IL-2 分泌，如藉由 ELISA 測定的。

圖 14C 示出在存在 TGF $\beta$ 1 之情況下 MLR 測定中之 HCB301 蛋白誘導之 IFN- $\gamma$  分泌，如藉由 ELISA 測定的。

圖 15A-15B 示出彙總活體外測定結果之表格。

圖 16 列出本發明中討論之序列。

## 【實施方式】

### 【0034】

#### 相關申請交叉引用

本發明主張於 2022 年 1 月 18 日提交之美國臨時專利申請案第 63/300,440 號之優先權及權益，該美國臨時專利申請藉由引用整體併入本文。

### 【0035】

#### 序列表

本申請案含有已經作為命名為 52246-0002TW1\_SL\_ST26.xml 之 XML 檔案

以電子方式提交之序列表。創建於 2022 年 12 月 15 日之 XML 檔案之大小為 24,297 位元組。XML 檔案中之材料特此藉由引用整體併入。

**【0036】** 本發明提供與 CD47 及 PD-L1 結合之蛋白質複合物。此等蛋白質複合物可用於同時靶向 CD47/SIRP $\alpha$  路徑及 PD-1/PD-L1 路徑。結果表明，該蛋白質複合物可以有效地與表現 CD47 之癌細胞結合且阻斷內源性 SIRP $\alpha$  與 CD47 之間的相互作用，從而誘導先天免疫反應（例如，巨噬細胞對癌細胞之吞噬）。在另一態樣中，蛋白質複合物示出與 RBC 細胞或血小板之最小結合，從而抑制宿主細胞之清除，如藉由抗 CD47 抗體莫洛利單抗（magrolimab）所觀察至的。另外，結果表明蛋白質複合物可以選擇性地與表現 PD-L1 之癌細胞結合且阻斷內源性 PD-1 與 PD-L1 之間的相互作用。進一步地，蛋白質複合物亦可包含 TGF $\beta$  捕獲物，從而抑制 TGF $\beta$  誘導之免疫抑制反應，增加 T 細胞增殖及細胞因子分泌。

**【0037】** 因此，本文所描述之蛋白質複合物可用於利用以下癌症治療：藉由增加巨噬細胞之吞噬（例如，藉由滅活 CD47 介導之吞噬抑制）之增強之腫瘤免疫原性及抗原呈遞；及藉由抑制 PD-1/PD-L1 以及 TGF $\beta$  信號傳導路徑之增強之 T 細胞激活。

### **【0038】**

#### **IRP $\alpha$ 胞外結構域**

信號調節蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ 、SIRPa、Sirpa 或 CD172A) 係一種跨膜蛋白。該信號調節蛋白  $\alpha$  具有包括三個 Ig 樣結構域之胞外區及含有基於免疫受體酪胺酸之抑制模體之胞質區，該基於免疫受體酪胺酸之抑制模體介導蛋白酪胺酸磷酸酶 SHP1 及 SHP2 之結合。SIRP $\alpha$  之酪胺酸磷酸化受各種生長因子及細胞因子以及至胞外基質蛋白之整合素介導之細胞黏附之調節。SIRP $\alpha$  在如巨噬細胞及樹突細胞等骨髓細胞中含量特別豐富，而在 T、B、NK 及 NKT 細胞中僅以低水準表現。

【0039】 SIRP $\alpha$  之胞外區可以與其配位體 CD47 相互作用。巨噬細胞上之 SIRP $\alpha$  與紅血球上之 CD47 相互作用防止巨噬細胞在活體外及活體內之 Ig 調理之紅血球之吞噬。吞噬細胞上之 SIRP $\alpha$  與相鄰細胞上表現之 CD47 之連接引起 SIRP $\alpha$  細胞質免疫受體基於酪胺酸之抑制模體之磷酸化，從而導致 SHP-1 及 SHP-2 磷酸酶之募集。一種由此產生之下游效應為防止肌球蛋白-IIA 在吞噬突觸處積累且因此抑制吞噬。因此，CD47-SIRP $\alpha$  相互作用以陰性免疫檢查點之形式用於發送「別吃我」信號，以確保健康之自體細胞不會被不當吞噬。然而，在幾乎所有類型之腫瘤中亦發現 CD47 之過度表現，該幾乎所有類型之腫瘤中之一些包含急性髓性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)、膀胱癌及乳癌。可以藉由阻斷 CD47 與 SIRP $\alpha$  之結合來最小化巨噬細胞之此類負調節。因此，阻斷 CD47/SIRP $\alpha$  相互作用之藥劑可以促進抗體依賴性細胞吞噬 (ADCP)，且在一些情況下，觸發抗體依賴性細胞毒性 (ADCC)，因此可以用於治療各種癌症。

【0040】 阻斷 CD47/SIRP $\alpha$  相互作用可以促進細胞吞噬，因此可以用於治療各種癌症。其藉由先天免疫觸發識別及消除癌細胞。靶向 CD47 或 SIRP $\alpha$  之藥劑可用於治療各種腫瘤及癌症，例如實體瘤、血液惡性腫瘤 (例如復發性或難治性血液惡性腫瘤)、急性髓性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、乳癌、膀胱癌、卵巢癌及小細胞肺癌腫瘤。

【0041】 另外，SIRP $\alpha$  用於抑制巨噬細胞對表現 CD47 之宿主細胞 (包含紅血球及血小板) 之活體內清除。CD47-SIRP $\alpha$  相互作用似乎對於造血幹細胞之植入亦為必不可少的。阻斷 CD47/SIRP $\alpha$  相互作用可能會意外殺死正常紅血球，從而可能導致貧血且觸發炎症。因此，重要的是調節 SIRP $\alpha$  靶向劑與 CD47 之相互作用，例如，對紅血球之影響有限或受控。

【0042】 SIRP $\alpha$  及其功能之詳細描述可見於例如 Yanagita 等人「抗 SIRP $\alpha$

抗體作為癌症免疫療法之潛在新工具 (Anti-SIRP $\alpha$  antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy)」。《臨床研究透視期刊 (JCI insight)》2.1 (2017)；Seiffert 等人「信號調節蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 而不是 SIRP $\beta$  參與 T 細胞激活，以高親和力與 CD47 結合，且在未成熟之 CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> 造血細胞上表現 (Signal-regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) but not SIRP $\beta$  is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> hematopoietic cells)」。《血液 (Blood)》97.9 (2001): 2741-2749；該文獻藉由引用整體併入本文。

**【0043】** 人 SIRP $\alpha$  係信號調節蛋白 (SIRP) 之成員。信號調節蛋白係介導必需細胞表面蛋白相互作用及信號轉導之細胞表面 Ig 超家族蛋白。SIRP 均含有 N 末端胞外區、單個跨膜結構域及 C 末端胞內區。

**【0044】** 人 SIRP $\alpha$  (UniProt 標識符：P78324) 之胞外區具有 IgV 結構域、Ig 樣 C1-型 1 結構域及 Ig 樣 C1-型 2 結構域。其對應於人 SIRP $\alpha$  蛋白 (SEQ ID NO: 23；NP\_542970.1) 之胺基酸 32-137、胺基酸 148-247 及胺基酸 254-348。胺基酸 1-30 為信號肽。人 SIRP $\alpha$  亦有長的胞內結構域，該長的胞內結構域包括兩個推定之基於免疫受體酪胺酸之抑制模體 (ITIM)。SIRP $\alpha$  ITIM 之激活遞送負向調節細胞反應之抑制性信號。

**【0045】** 在一些實施例中，蛋白質複合物包括一或多個 CD47 結合結構域。在一些實施例中，CD47 結合結構域包括 SIRP $\alpha$  胞外結構域或由其組成。如本文所使用的，「SIRP $\alpha$  胞外結構域」係指 SIRP $\alpha$  或其變體之胞外區之全部或一部分，其中胞外區之一部分可以與 CD47 結合。SIRP $\alpha$  胞外結構域可以具有一或多個可以獨立摺疊且形成自穩定結構之蛋白質結構域。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域包括一或多個選自以下之結構域或由其組成：IgV 結構域、Ig 樣 C1-型 1 結構域及 Ig 樣 C1-型 2 結構域。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域包括 IgV 結構

域或由其組成。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域包括 IgV 結構域及 Ig 樣 C1-型 1 結構域或由其組成。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  胞外結構域包括 IgV 結構域、Ig 樣 C1-型 1 結構域及 Ig 樣 C1-型 2 結構域或由其組成。

**【0046】** 在一些實施例中，本文所描述之 SIRP $\alpha$  胞外結構域包含與人 SIRP $\alpha$  蛋白 (NCBI 登錄號：AAH26692.1；SEQ ID NO: 12) 之胺基酸 31-148 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之 CD47 結合結構域或 SIRP $\alpha$  結構域包含與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之 CD47 結合結構域或 SIRP $\alpha$  胞外結構域包含人 SIRP $\alpha$  蛋白之 IgV 結構域。在一些實施例中，本文所描述之 CD47 結合結構域或 SIRP $\alpha$  胞外結構域包含鼠 SIRP $\alpha$  蛋白之 IgV 結構域。

#### **【0047】**

#### **PD-1 胞外結構域**

PD-1 (程式性死亡-1) 為免疫檢查點，且藉由促進淋巴結中之抗原特異性 T 細胞中之細胞凋亡 (程式性細胞死亡) 同時減少調節性 T 細胞 (抗炎抑制性 T 細胞) 中之細胞凋亡之雙重機制預防自身免疫。

**【0048】** PD-1 主要在 T 細胞及原代 B 細胞之表面上表現；PD-1 之兩種配位體 (PD-L1 及 PD-L2) 在抗原呈遞細胞 (APC) 中廣泛表現。PD-1 與其配位體之相互作用在免疫反應之負調節中起重要作用。抑制 PD-1 與其配位體之間的結合可以使腫瘤細胞暴露於免疫系統之殺傷作用中，且因此可以達至殺傷腫瘤組織並治療癌症之作用。

**【0049】** PD-L1 在許多不同癌症之贅生性細胞上表現。藉由在導致其抑制之 T 細胞上與 PD-1 結合，PD-L1 表現成為腫瘤細胞可以藉由其逃避免疫攻擊之主要機制。PD-L1 過表現在概念上可為由於 2 種機制引起的，亦即內在機制及適

應性機制。PD-L1 在癌細胞上之內在表現與此等贅生性細胞中之細胞/基因畸變有關。包含 AKT 及 STAT 路徑之細胞信號傳導之活化使 PD-L1 表現增加。在原發性縱隔 B 細胞淋巴瘤中，MHC II 類反式激活因子（CIITA）與 PD-L1 或 PD-L2 之基因融合發生，導致此等蛋白質之過表現。PD-L1 及 PD-L2 所位於之染色體 9p23-24 之擴增導致兩種蛋白質在經典霍奇金淋巴瘤（Hodgkin lymphoma）中之表現增加。適應性機制與誘導腫瘤微環境中之 PD-L1 表現有關。PD-L1 可以回應干擾素  $\gamma$  在贅生性細胞上經誘導。在微衛星不穩定性大腸癌中，使 PD-L1 主要在腫瘤中之髓樣細胞上表現，該髓樣細胞隨後抑制細胞毒性 T 細胞功能。

【0050】 使用 PD-1 阻斷以增強抗腫瘤免疫力源於慢性感染模型中之觀察，其中防止 PD-1 相互作用逆轉 T 細胞耗竭。類似地，PD-1 之阻斷防止 T 細胞 PD-1/腫瘤細胞 PD-L1 或 T 細胞 PD-1/腫瘤細胞 PD-L2 相互作用，從而導致藉由 T 細胞介導之抗腫瘤免疫力得以恢復。

【0051】 對 PD-1 以及抗 PD-1 抗體用於治療癌症之用途之詳細說明在以下進行了描述：例如，Topalian、Suzanne L. 等人「抗 PD-1 抗體在癌症中之安全性、活性及免疫相關性（Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer）」.《新英格蘭醫學雜誌（New England Journal of Medicine）》366.26 (2012): 2443-2454；Hirano, Fumiya 等人「單株抗體對 B7-H1 及 PD-1 之阻斷增強了癌症治療免疫力（Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity）」.《癌症研究（Cancer research）》65.3 (2005): 1089-1096；Raedler, Lisa A. 「可瑞達（帕博利珠單抗）：首個批准用於經過先前治療之不可切除之或轉移性黑色素瘤之 PD-1 抑制劑（Keytruda (pembrolizumab): first PD-1 inhibitor approved for previously treated unresectable or metastatic melanoma）」. 美國衛生與藥物權益 8. 《規範特徵（Spec Feature）》(2015): 96；Kwok、Gerry 等人「帕博利珠單抗(可瑞達)」. (2016): 2777-2789; US 20170247454; US 9,834,606

B 及 US 8,728,474，該文獻中之每個文獻藉由引用整體併入本文。

**【0052】** 根據 UniProt 標識符 Q15116，人 PD-1 之胞外區對應於 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 24-170，人 PD-1 之跨膜區對應於 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 171-191，且人 PD-1 之胞質區對應於 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 192-288。PD-1 胞外區亦具有 IgV 結構域，該 IgV 結構域對應於人 PD-1 蛋白 (SEQ ID NO: 11；NP\_005009.2) 之胺基酸 35-145。信號肽對應於 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 1-23。人 SIRP $\alpha$  之胞質區亦具有基於免疫受體酪胺酸之抑制模體 (ITIM；對應於 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 221-226) 及基於免疫受體酪胺酸之轉換模體 (ITSM；對應於 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 241-251)。

**【0053】** 在一些實施例中，蛋白質複合物包括一或多個 PD-L1 結合結構域。在一些實施例中，PD-L1 結合結構域包括 PD-1 胞外結構域或由其組成。如本文所使用的，「PD-1 胞外結構域」係指 PD-1 或其變體之胞外區之全部或一部分，其中胞外區之一部分可以與 PD-L1 結合。PD-1 胞外結構域可以具有一或多個可以獨立摺疊且形成自穩定結構之蛋白質結構域。在一些實施例中，PD-1 胞外結構域包括 IgV 結構域或由其組成。在一些實施例中，PD-1 胞外結構域不包含信號肽。

**【0054】** 在一些實施例中，本文所描述之 PD-1 胞外結構域包含與人 PD-1 蛋白 (NCBI 登錄號：NP\_005009.2；SEQ ID NO: 11) 之胺基酸 26-170 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之 PD-L1 結合結構域或 PD-1 胞外結構域包含與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之 PD-L1 結合結構域或 SIRP $\alpha$  胞外結構域包含人 PD-1 蛋白之 IgV 結構域。在一些實施例中，本文所描述之 PD-L1 結合結構域或 SIRP $\alpha$  胞外結構域包含鼠 PD-L1 蛋白之胞外結構域之全部或一部分。

## 【0055】

**TGFBR2 胞外結構域**

TGF- $\beta$  受體 2 型 (TGFBR2) 為 TGF- $\beta$  家族所有成員之配位體結合受體，且在包含纖維母細胞之幾乎所有細胞類型中表現。配位體誘導之細胞反應藉由典型之 Smad 依賴性或非典型之 Smad 非依賴性信號傳導路徑介導，如 c-Jun N 末端激酶、Akt、Src、胞外信號調節激酶及 p38 絲裂原激活蛋白激酶路徑。與 TGFBR2 結合之配位體導致受體二聚化及自身磷酸化，隨後與 TGF- $\beta$  受體 1 型 (TGFBR1) 或 3 型 (TGFBR3) 結合。新形成之異四聚體複合物進而募集及磷酸化調節性 SMAD (SMAD2 或 SMAD3)，其在磷酸化狀態下與共 SMAD 分子 SMAD4 結合。調節性 SMAD/共 SMAD 複合物易位至細胞核，在該細胞核它充當調節靶基因表現之轉錄因子。

【0056】對 TGF $\beta$ 、TGFBR2 以及 TGF $\beta$  捕獲物用於治療癌症之用途之詳細描述描述於以下中：例如 Bierie, B. 等人「TGF $\beta$ ：癌症之分子 Jekyll 及 Hyde (TGF $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer)」. 《自然綜述：癌症 (Nature Reviews Cancer)》6.7 (2006): 506-520；Kim, B. 等人「腫瘤學中出現之靶向 TGF- $\beta$  路徑之新穎療法 (Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- $\beta$  pathway)」. 《血液學與腫瘤學雜誌 (Journal of Hematology & Oncology)》14.1 (2021): 1-20；以及 Lind, H. 等人「藉由雙功能抗 PD-L1/TGF- $\beta$ R2 藥劑雙重靶向 TGF- $\beta$  及 PD-L1：臨床前及臨床進展狀況 (Dual targeting of TGF- $\beta$  and PD-L1 via a bifunctional anti-PD-L1/TGF- $\beta$ R2 agent: status of preclinical and clinical advances)」. 《癌症免疫療法雜誌 (Journal for immunotherapy of cancer)》8.1 (2020)，該文獻中之每個文獻藉由引用整體併入。

【0057】根據 UniProt 標識符 P37173，人 TGFBR2 之胞外區對應於 SEQ ID NO: 13 之胺基酸 23-166，人 TGFBR2 之跨膜區對應於 SEQ ID NO: 13 之胺基酸

167-187，且人 TGFBR2 之胞質區對應於 SEQ ID NO: 13 之胺基酸 188-567。信號肽對應於 SEQ ID NO: 13 之胺基酸 1-22。

**【0058】** 在一些實施例中，蛋白質複合物包括一或多個 TGF $\beta$  結合結構域。在一些實施例中，TGF $\beta$  結合結構域包括 TGFBR2 胞外結構域或由其組成。如本文所使用的，「TGFBR2 胞外結構域」係指 TGFBR2 或其變體之胞外區之全部或一部分，其中胞外區之一部分可以與 TGF $\beta$  結合。TGFBR2 胞外結構域可以具有一或多個可以獨立摺疊且形成自穩定結構之蛋白質結構域。在一些實施例中，TGFBR2 胞外結構域不包含信號肽。

**【0059】** 在一些實施例中，本文所描述之 TGFBR2 胞外結構域包含與人 TGFBR2 蛋白（NCBI 登錄號：NP\_003233.4；SEQ ID NO: 13）之胺基酸 24-159 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之 TGF $\beta$  結合結構域或 TGFBR2 胞外結構域包含與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之 TGF $\beta$  結合結構域或 TGFBR2 胞外結構域包含人 TGFBR2 胞外結構域之全部或一部分。在一些實施例中，本文所描述之 TGF $\beta$  結合結構域或 TGFBR2 胞外結構域包含鼠 PD-L1 蛋白之胞外結構域之全部或一部分。

#### **【0060】**

#### **靶向 CD47、PD-L1 及/或 TGF $\beta$ 之蛋白質複合物**

本發明提供可以與 CD47 特異性結合之蛋白質複合物。在一些實施例中，此等蛋白質複合物可以阻斷 CD47/SIRP $\alpha$  信號傳導路徑，從而增加免疫反應。在一些實施例中，此等蛋白質複合物可以啟動吞噬。

**【0061】** 本發明亦提供可以與 PD-L1 特異性結合之蛋白質複合物。在一些實施例中，此等蛋白質複合物可以阻斷 PD-1/PD-L1 信號傳導路徑，從而增加免

疫反應。在一些實施例中，此等蛋白質複合物可以誘導 T 細胞激活、增殖及/或細胞因子釋放。

**【0062】** 在一態樣中，本發明提供一種蛋白質複合物或蛋白質構築體，該蛋白質複合物或蛋白質構築體包括 Fc、一或多個 CD47 結合結構域、一或多個 PD-L1 結合結構域及視情況一或多個 TGF $\beta$  結合結構域或由其組成。如本文所使用的，術語「Fc」係指抗體之可片段結晶區（例如，IgG、IgE、IgM、IgA 或 IgD）。術語「Fc 區」或「Fc 區序列」係指形成 Fc 區之重鏈肽中之重鏈恆定結構域（例如，CH2 及 CH3）。在一些實施例中，蛋白質複合物或蛋白質構築體包括 1、2、3、4、5 或 6 個 CD47 結合結構域。在一些實施例中，蛋白質複合物或蛋白質構築體包括 1、2、3、4、5 或 6 個 PD-L1 結合結構域。在一些實施例中，蛋白質複合物或蛋白質構築體包括 1、2、3、4、5 或 6 個 TGF $\beta$  結合結構域。

**【0063】** 在一些實施例中，蛋白質複合物或蛋白質構築體包括 Fc、與分化簇 47 (CD47) 特異性結合之第一結構域及與程式性死亡配位體 1 (PD-L1) 特異性結合之第二結構域或由其組成。

**【0064】** 在一些實施例中，第一結構域可以與表現 CD47 之細胞（例如，癌細胞）結合及/或可以阻斷 CD47 與信號調節蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 之間的相互作用。在一些實施例中，第一結構域包括 SIRP $\alpha$  之胞外區之全部或一部分。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  係人 SIRP $\alpha$ 。在一些實施例中，第一結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0065】** 在一些實施例中，第二結構域可以與表現 PD-L1 之細胞（例如，癌細胞）結合及/或刺激 T 細胞激活及增殖。在一些實施例中，第二結構域包括程式性細胞死亡蛋白 1 (PD-1) 之胞外區之全部或一部分。在一些實施例中，PD-1 是人 PD-1。在一些實施例中，第二結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【0066】 在一些實施例中，Fc 係人 IgG4 Fc。在一些實施例中，第一結構域與該 Fc 中之 CH2 結構域之 N 末端連接，視情況藉由鉸鏈區。在一些實施例中，第二結構域與該 Fc 中之 CH2 結構域之 N 末端連接，視情況藉由鉸鏈區。在一些實施例中，該鉸鏈區係人 IgG4 鉸鏈區，該人 IgG4 鉸鏈區視情況具有根據 EU 編號之 S228P 突變。

【0067】 在一些實施例中，蛋白質複合物或蛋白質構築體進一步包括與轉化生長因子  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 特異性結合之第三結構域。在一些實施例中，第三結構域與該 Fc 中之 CH3 結構域之 C 末端連接，視情況藉由連接肽。

【0068】 在一些實施例中，蛋白質複合物包括兩個或更多個第一結構域。在一些實施例中，蛋白質複合物包括兩個或更多個第二結構域。在一些實施例中，蛋白質複合物包括兩個或更多個第三結構域。

【0069】 在一些實施例中，CD47 結合結構域、PD-L1 結合結構域及 TGF $\beta$  結合結構域藉由如本文所描述之連接肽或鉸鏈區序列中之任一者與 Fc 區連接。

【0070】 蛋白質複合物之一些實施例示出於圖 1A-1D。下文詳細描述了該實施例。

【0071】

#### ***HCB301-4***

在一態樣中，本發明係關於包含第一多肽及第二多肽之蛋白質複合物。第一多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域。第二多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之

第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$  結合結構域。具有 HCB301-4 格式之示例性蛋白質複合物之示意性結構示出於圖 1A。

**【0072】** 在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域包含 PD-1 之胞外結構域之全部或一部分，例如人 PD-1 蛋白（NCBI 登錄號：NP\_005009.2；SEQ ID NO: 11）或 SEQ ID NO: 5 之胺基酸 26-170。在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域相同。在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域不同。在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域包含與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0073】** 在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三及/或第四連接肽包含與 SEQ ID NO: 8-10 中之任何一個至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三及/或第四連接肽包含與 GGGGS（SEQ ID NO: 18）或 GSGGSG（SEQ ID NO: 19）之一或多個（例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8）重複序列至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0074】** 在一些實施例中，第一及/或第二多肽包含與 SEQ ID NO: 1 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

### **【0075】**

#### ***HCB301-2***

在一態樣中，本發明係關於包含第一多肽及第二多肽之蛋白質複合物。第一多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第三 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第五連接肽、第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視

情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域。第二多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第四 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第六連接肽、第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$  結合結構域。具有 HCB301-2 格式之示例性蛋白質複合物之示意性結構示出於圖 1C。

**【0076】** 在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域包含 PD-1 之胞外結構域之全部或一部分，例如人 PD-1 蛋白（NCBI 登錄號：NP\_005009.2；SEQ ID NO: 11）或 SEQ ID NO: 5 之胺基酸 26-170。在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域相同。在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域不同。在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域包含與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0077】** 在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三、第四、第五及/或第六連接肽包含與 SEQ ID NO: 8-10 中之任何一個至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三、第四、第五及/或第六連接肽包含與 GGGGS (SEQ ID NO: 18) 或 GSGGSG (SEQ ID NO: 19) 之一或多個（例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8）重複序列至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0078】** 在一些實施例中，第一及/或第二多肽包含與 SEQ ID NO: 3 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0079】**

***HCB301-3***

在一態樣中，本發明係關於包含第一多肽及第二多肽之蛋白質複合物。第一多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域。第二多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$  結合結構域。具有 HCB301-4 格式之示例性蛋白質複合物之示意性結構示出於圖 1B。

**【0080】** 在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域包含 PD-1 之胞外結構域之全部或一部分，例如人 PD-1 蛋白（NCBI 登錄號：NP\_005009.2；SEQ ID NO: 11）或 SEQ ID NO: 5 之胺基酸 26-170。在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域相同。在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域不同。在一些實施例中，第一及/或第二 PD-L1 結合結構域包含與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0081】** 在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三及/或第四連接肽包含與 SEQ ID NO: 8-10 中之任何一個至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三及/或第四連接肽包含與 GGGGS（SEQ ID NO: 18）或 GSGGSG（SEQ ID NO: 19）之一或多個（例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8）重複序列至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0082】** 在一些實施例中，第一及/或第二多肽包含與 SEQ ID NO: 2 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【0083】

***HCB301-1***

在一態樣中，本發明係關於包含第一多肽及第二多肽之蛋白質複合物。第一多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第五連接肽、第三 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域。第二多肽較佳地自 N 末端至 C 末端包含：第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第六連接肽、第四 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$  結合結構域。具有 HCB301-2 格式之示例性蛋白質複合物之示意性結構示出於圖 1D。

【0084】 在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域包含 PD-1 之胞外結構域之全部或一部分，例如人 PD-1 蛋白（NCBI 登錄號：NP\_005009.2；SEQ ID NO: 11）或 SEQ ID NO: 5 之胺基酸 26-170。在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域相同。在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域不同。在一些實施例中，第一、第二、第三及/或第四 PD-L1 結合結構域包含與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【0085】 在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三、第四、第五及/或第六連接肽包含與 SEQ ID NO: 8-10 中之任何一個至少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之第一、第二、第三、第四、第五及/或第六連接肽包含與 GGGGS (SEQ ID NO: 18) 或 GSGGSG (SEQ ID NO: 19) 之一或多個（例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8）重複序列至

少 80%、85%、90%、95%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0086】** 在一些實施例中，第一及/或第二多肽包含與 SEQ ID NO: 4 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同之胺基酸序列。

**【0087】** 在本文所描述之蛋白質複合物中之任何蛋白質複合物中，第一及/或第二 CD47 結合結構域可以包含 SIRP $\alpha$  之胞外結構域之全部或一部分，例如人 SIRP $\alpha$  蛋白 (NCBI 登錄號：AAH26692.1；SEQ ID NO: 12) 或 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 31-148。在一些實施例中，第一及第二 CD47 結合結構域相同。在一些實施例中，第一及/或第二 CD47 結合結構域包含與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，第一及/或第二 CD47 結合結構域包含 SIRP $\alpha$  (例如，人 SIRP $\alpha$ ) 之 IgV 結構域。在一些實施例中，SIRP $\alpha$  IgV 結構域包含一或多個突變。在一些實施例中，第一及第二 CD47 結合結構域不同。

**【0088】** 在本文所描述之蛋白質複合物中之任何蛋白質複合物中，第一及/或第二 TGF $\beta$  結合結構域可以包含 TGFBR2 之胞外結構域之全部或一部分，例如人 TGFBR2 蛋白 (NCBI 登錄號：NP\_003233.4；SEQ ID NO: 13) 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸 24-159。在一些實施例中，第一及/或第二 TGF $\beta$  結合結構域相同。在一些實施例中，第一及/或第二 TGF $\beta$  結合結構域不同。在一些實施例中，第一及/或第二 TGF $\beta$  結合結構域包含與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

**【0089】** 在本文所描述之蛋白質複合物中之任何蛋白質複合物中，第一及/或第二鉸鏈區可以包含免疫球蛋白之鉸鏈區之全部或一部分，例如人 IgG4 鉸鏈區 (SEQ ID NO: 16)。在一些實施例中，第一及/或第二鉸鏈區包含與 SEQ ID NO:

16 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。在一些實施例中，第一及第二鉸鏈區相同。在一些實施例中，第一及第二鉸鏈區不同。在一些實施例中，第一及/或第二鉸鏈區包含根據 EU 編號之位置 228 處之脯胺酸。

**【0090】** 在本文所描述之蛋白質複合物之任何蛋白質複合物中，第一及/或第二 Fc 區可以相同且可以形成 Fc 同源二聚體。在一些實施例中，第一及/或第二 Fc 區包含免疫球蛋白之 Fc 區之全部或一部分，例如人 IgG4 Fc 區 (SEQ ID NO: 17)。在本文所描述之蛋白質複合物之任何蛋白質複合物中，第一及/或第二 Fc 區可以不同。在一些實施例中，第一及/或第二 Fc 區可以藉由引入一或多個突變形成 Fc 異源二聚體。例如，第一及/或第二 Fc 區可以包含一或多個杵臼 (KIH) 突變。在一些實施例中，第一及/或第二 Fc 區可以使用此項技術已知之其他技術形成 Fc 異源二聚體。異源二聚體 Fc 技術之詳細資訊可見於例如 Ha 等人「免疫球蛋白 Fc 異源二聚體平台技術：自設計至治療性抗體及蛋白質之應用 (Immunoglobulin Fc heterodimer platform technology: from design to applications in therapeutic antibodies and proteins)」. 《免疫學前沿 (Frontiers In Immunology)》7 (2016): 394，該文獻藉由引用整體併入本文。

**【0091】** 在一態樣中，本發明係關於包含 CD47 結合結構域 (例如，本文所描述之 CD47 結合結構域中之任何 CD47 結合結構域) 及 PD-L1 結合結構域 (例如，本文所描述之 PD-L1 結合結構域中之任何 PD-L1 結合結構域) 之蛋白質複合物。在一些實施例中，蛋白質複合物進一步包含 TGF $\beta$  結合結構域 (例如，本文所描述之 TGF $\beta$  結合結構域中之任何 TGF $\beta$  結合結構域)。在一些實施例中，該 CD47 結合結構域係或包括 SIRP $\alpha$  胞外結構域 (例如，本文所描述之 SIRP $\alpha$  胞外結構域中之任何 SIRP $\alpha$  胞外結構域)。在一些實施例中，該 PD-L1 結合結構域係或包括 PD-1 胞外結構域 (例如，本文所描述之 PD-1 胞外結構域中之任何 PD-

1 胞外結構域)。在一些實施例中，該 TGF $\beta$  結合結構域係或包括 TGFBR2 胞外結構域（例如，本文所描述之 TGFBR2 胞外結構域中之任何 TGFBR2 胞外結構域）。

#### 【0092】

##### 蛋白質複合物之特徵

在一些實施例中，蛋白質複合物可以包括如本文所描述之任何 CD47 結合結構域、PD-L1 結合結構域及/或 TGF $\beta$  結合結構域。本發明亦提供包括編碼本文所描述之多肽之聚核苷酸之核酸。

【0093】 為了判定兩個胺基酸序列或兩個核酸序列之同一性百分比，對序列進行比對以用於最佳比較之目的（例如，可以在第一胺基酸及第二胺基酸或核酸序列中之一個或兩個中引入空位以進行最佳比對，且出於比較之目的，可以忽略非同源序列）。出於比較之目的而比對之參考序列之長度為參考序列之長度之至少 80%，且在一些實施例中為至少 90%、95%或 100%。隨後將對應胺基酸位置或核苷酸位置處之胺基酸殘基或核苷酸進行比較。當第一序列中之位置經與在第二序列中之對應位置相同之胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則此等分子在該位置處是相同的。兩個序列之間的同一性百分比係由該序列共用之相同位置之數目之函數，考慮空位之數目及每個空位之長度，需要引入該函數以進行兩個序列之最佳比對。例如，序列之比較以及兩個序列之間的同一性百分比之判定可以使用其中空位罰分為 12、空位延伸罰分為 4 且移碼空位罰分為 5 之 Blossum 62 評分矩陣來完成。

【0094】 本文所描述之蛋白質複合物可以包含抗體之 Fc。此等抗體可屬於任何類型（例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及 IgY）、種類或子類（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgE1、IgE2）。在一些實施例中，該 Fc 區源自人 IgG（例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）。在一些實施例中，該 Fc 區是 IgG4

Fc 區（例如，人 IgG4 Fc 區）。

【0095】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物藉由抗體鉸鏈區（例如，IgG、IgE 鉸鏈區）與 Fc 區連接。另外，可以修飾 Fc 區以提供期望之效應子功能或血清半衰期。

【0096】 本文所描述之蛋白質複合物可以阻斷 CD47 與在免疫細胞上表現之內源性 SIRP $\alpha$  之間的結合。在一些實施例中，藉由與 CD47 結合，本文所描述之蛋白質複合物可以抑制 CD47（例如，在腫瘤細胞上表現）與在免疫細胞（例如，骨髓細胞、巨噬細胞及樹突細胞）上表現之內源性 SIRP $\alpha$  之結合，從而阻斷 CD47/SIRP $\alpha$  路徑，上調免疫反應，且促進吞噬。

【0097】 本文所描述之蛋白質複合物可以阻斷 PD-L1 與在免疫細胞上表現之內源性 PD-1 之間的結合。在一些實施例中，藉由與 PD-L1 結合，本文所描述之蛋白質複合物可以抑制 PD-L1（例如，在腫瘤細胞上表現）與在免疫細胞（例如，T 細胞）上表現之內源性 PD-1 之結合，從而阻斷 PD-1/PD-L1 路徑，上調免疫反應，激活 T 細胞增殖及細胞因子釋放。

【0098】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以將免疫反應、活性或免疫細胞（例如，骨髓細胞、巨噬細胞、樹突細胞、抗原呈遞細胞）之數目增加至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2 倍、3 倍、5 倍、10 倍或 20 倍。

【0099】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以與 CD47（例如，人 CD47、猴 CD47 或小鼠 CD47）、PD-L1（例如，人 PD-L1、猴 PD-L1 或小鼠 PD-L1）或 TGF $\beta$ （例如，人 TGF $\beta$ 、猴 TGF $\beta$  或小鼠 TGF $\beta$ ）以小於  $0.1 \text{ s}^{-1}$ 、小於  $0.01 \text{ s}^{-1}$ 、小於  $0.001 \text{ s}^{-1}$ 、小於  $0.0001 \text{ s}^{-1}$  或小於  $0.00001 \text{ s}^{-1}$  之解離速率（ $k_{\text{off}}$ ）結合。在一些實施例中，解離速率（ $k_{\text{off}}$ ）大於  $0.01 \text{ s}^{-1}$ 、大於  $0.001 \text{ s}^{-1}$ 、大於  $0.0001 \text{ s}^{-1}$  或大於  $0.000001 \text{ s}^{-1}$ 。在一些實施例

中，動力學締合速率 ( $k_{on}$ ) 大於  $1 \times 10^2/\text{Ms}$ 、大於  $1 \times 10^3/\text{Ms}$ 、大於  $1 \times 10^4/\text{Ms}$ 、大於  $1 \times 10^5/\text{Ms}$  或大於  $1 \times 10^6/\text{Ms}$ 。在一些實施例中，動力學締合速率 ( $k_{on}$ ) 小於  $1 \times 10^5/\text{Ms}$ 、小於  $1 \times 10^6/\text{Ms}$  或小於  $1 \times 10^7/\text{Ms}$ 。親和力可以根據動力學速率常數之商 ( $KD = k_{off}/k_{on}$ ) 推導。在一些實施例中， $KD$  小於  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 、小於  $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 、小於  $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 、小於  $1 \times 10^{-9}\text{M}$  或小於  $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 。在一些實施例中， $KD$  小於 300 nM、200 nM、100 nM、50nM、30 nM、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、900 pM、800 pM、700 pM、600 pM、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、100 pM、90 pM、80 pM、70 pM、60 pM、50 pM、40 pM、30 pM、20 pM 或 10 pM。在一些實施例中， $KD$  大於  $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 、大於  $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 、大於  $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 、大於  $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 、大於  $1 \times 10^{-11}\text{M}$  或大於  $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 。

**【0100】** 用於量測親和力之通用技術包含例如 ELISA、RIA 及表面電漿共振 (SPR)。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以與猴 CD47 及/或小鼠 CD47 結合。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物無法與猴 CD47 及/或小鼠 CD47 結合。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以與猴 PD-L1 及/或小鼠 PD-L1 結合。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物無法與猴 PD-L1 及/或小鼠 PD-L1 結合。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以與猴 TGF $\beta$  及/或小鼠 TGF $\beta$  結合。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物無法與猴 TGF $\beta$  及/或小鼠 TGF $\beta$  結合。

**【0101】** 在一些實施例中，判定熱穩定性。本文所描述之蛋白質複合物之  $T_m$  可以大於 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94 或 95°C。在一些實施例中， $T_m$  小於 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、

86、87、88、89、90、91、92、93、94 或 95°C。

【0102】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤生長抑制百分比 (TGI%) 大於 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190% 或 200%。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤生長抑制百分比小於 60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190% 或 200%。TGI% 可以在治療開始後例如 3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天、22 天、23 天、24 天、25 天、26 天、27 天、28 天、29 天或 30 天判定，或在治療開始後 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、7 個月、8 個月、9 個月、10 個月、11 個月或 12 個月判定。如本文所使用的，使用以下公式計算腫瘤生長抑制百分比 (TGI%)：

$$\text{TGI (\%)} = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$$

$T_i$  係第  $i$  天治療組之平均腫瘤體積。 $T_0$  係在第 0 天治療組之平均腫瘤體積。 $V_i$  係第  $i$  天對照組之平均腫瘤體積。 $V_0$  係在第 0 天對照組之平均腫瘤體積。

【0103】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用與抗 CD47 參考抗體例如 Hu5F9-G4 或抗 SIRP $\alpha$  抗體例如 CC-95251 相當。Hu5F9-G4 描述於例如 Sikic 等人「抗 CD47 抗體 Hu5F9-G4 在晚期癌症患者中之首次人體首創 I 期試驗 (First-in-human, first-in-class phase I trial of the anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 in patients with advanced cancers)」，*《臨床腫瘤學雜誌 (Journal of Clinical Oncology)》* 37.12 (2019): 946 中，該文獻藉由引用整體併入本文。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用比抗 CD47 參考抗體，例如 Hu5F9-G4 或抗 SIRP $\alpha$  抗體，例如 CC-95251 多至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍或 5 倍。在一些實施例中，本

文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用比 SIRP $\alpha$ \_G4 多至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍或 5 倍。SIRP $\alpha$ \_G4 (或 hSIRP $\alpha$ -G4Fc-wt (延齡草公司 (Trillium)), TTI-622) 之詳細資訊可見於例如美國專利申請公開第 US20150329616A1 號, 該美國專利申請公開藉由引用整體併入本文。SIRP $\alpha$ \_G4 之胺基酸序列示出於 SEQ ID NO: 14 中。

**【0104】** 在一些實施例中, 本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用與抗 PD-L1 參考抗體例如 MPDL3280A (阿特珠單抗 (atezolizumab)) 或抗 PD-1 抗體例如派姆單抗 (pembrolizumab) 相當。MPDL3280A 描述於例如 Powles, T. 等人「MPDL3280A (抗 PD-L1) 治療導致轉移性膀胱癌之臨床活性 (MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer)」. 《自然 (Nature)》 515.7528 (2014): 558-562 中, 該文獻藉由引用整體併入本文。在一些實施例中, 本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用比抗 PD-L1 參考抗體, 例如 MPDL3280A 或抗 PD-1 抗體, 例如派姆單抗多至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍或 5 倍。在一些實施例中, 本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用比 PD1\_G4 多至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍或 5 倍。PD1\_G4 用作 HCB301 融合蛋白 (HCB301 蛋白) 之對照蛋白。PD1\_G4 之胺基酸序列示出於 SEQ ID NO: 15。

**【0105】** 在一些實施例中, 本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用與 TGF $\beta$  捕獲物蛋白, 例如 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物或抗 PD-L1 抗體  $\times$  TGF $\beta$  捕獲物 M7824 相當。M7824 描述於例如 Gatti-Mays, M. E. 等人「M7824: 一種有前途之抗癌免疫逃避之新策略 (M7824: a promising new strategy to combat cancer immune evasion)」. 《腫瘤科學 (Oncoscience)》 5.11-12 (2018): 269 中, 該文獻藉由引用整體併入本文。在一些實施例中, 本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用

比 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物或 M7824 多至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍或 5 倍。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物之腫瘤抑制性作用比 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物多至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍或 5 倍。IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作 HCB301 融合蛋白（HCB301 蛋白）之對照蛋白。IgG4-TGF $\beta$  捕獲物之胺基酸序列示出於 SEQ ID NO: 20。

**【0106】** 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物具有功能性 Fc。在一些實施例中，Fc 來自人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4。在一些實施例中，功能性 Fc 之效應子功能為抗體依賴性細胞介導之細胞毒性（ADCC）。在一些實施例中，功能性 Fc 之效應子功能為吞噬。在一些實施例中，功能性 Fc 之效應子功能為 ADCC 及吞噬。在一些實施例中，如本文所描述之蛋白質構築體具有不具有效應子功能之 Fc 區。在一些實施例中，Fc 為人 IgG4 Fc。在一些實施例中，Fc 沒有功能性 Fc 區。例如，Fc 區具有 LALA 突變（EU 編號中為 L234A 及 L235A 突變）或 LALA-PG 突變（EU 編號中為 L234A、L235A、P329G 突變）。

**【0107】** 可以對 Fc 區進行一些其他修飾。例如，可以將半胱胺酸殘基引入至 Fc 區中，由此允許此區中之鏈間二硫鍵形成。由此產生之同源二聚體融合蛋白在活體外及/或活體內可以具有任何增加之半衰期。

**【0108】** 在一些實施例中，IgG4 具有 S228P 突變（EU 編號）。S228P 突變防止活體內及活體外 IgG4 Fab 臂交換。

**【0109】** 在一些實施例中，Fc 區被提供為具有缺少與 Fc 區（直接或間接）連接之岩藻糖之碳水化合物結構。例如，此類 Fc 區組合物中之岩藻糖之量可以為 1%至 80%、1%至 65%、5%至 65%或 20%至 40%。岩藻糖之量係藉由計算 Asn297 處之相對於如藉由 MALDI-TOF 質譜法量測之與 Asn 297 連接之所有糖結構（例如，複合、雜合及高甘露糖結構）之總和之糖鏈內之岩藻糖之平均量判

定的，例如，如 WO 2008/077546 中所描述的。Asn297 係指位於 Fc 區中約位置 297 (Fc 區殘基之 Eu 編號；或 Kabat 編號中之位置 314) 處之天冬醯胺殘基；然而，由於 Fc 區序列中之微小序列變化，Asn297 亦可位於位置 297 上游或下游約  $\pm 3$  個胺基酸處，亦即，位置 294 與 300 之間。此類岩藻糖基化變體可以具有改良之 ADCC 功能。在一些實施例中，為了降低聚糖異質性，可以進一步對 Fc 區進行工程化，以用丙胺酸 (N297A) 替代位置 297 處之天冬醯胺。

**【0110】** 在一些實施例中，HPLC-SEC 之主峰占本文所描述之藉由基於蛋白質 A 之親和層析法及/或尺寸排阻層析法純化後之蛋白質複合物之至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%。

**【0111】** 在一些實施例中，如與抗 CD47 參考抗體 (例如，Hu5F9-G4) 或 SIRP $\alpha$ \_G4 相比，本文所描述之蛋白質複合物可以以至少 10%、至少 20%、30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 110%或至少 120%之親和力與表現人 CD47 之腫瘤細胞 (例如，人 CD47 tf CHO-S 細胞或 FaDu 細胞) 結合。

**【0112】** 在一些實施例中，如與 PD1\_G4 之親和力相比，本文所描述之蛋白質複合物可以以至少 10%、至少 20%、30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 110%或至少 120%之親和力與表現人 PD-L1 之腫瘤細胞 (例如，表現人 PD-L1 之轉染之 CHO-S 細胞) 結合。

**【0113】** 在一些實施例中，如與 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物之親和力相比，本文所描述之蛋白質複合物可以以至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 110%或至少 120%之親和力與人 TGF $\beta$  (例如，TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 或 TGF $\beta$ 3) 結合。在一些實施例中，如與 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物之 EC50 值相比，與人 TGF $\beta$  (例如，TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 或 TGF $\beta$ 3)

結合之蛋白質複合物之 EC50 值小於 10%、小於 20%、小於 30%、小於 40%、小於 50%、小於 60%、小於 70%、小於 80%、小於 90%、小於 1 倍、小於 2 倍、小於 3 倍、小於 4 倍、小於 5 倍或小於 10 倍。

【0114】 在一些實施例中，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）之親和力相比，本文所描述之蛋白質複合物可以以小於 90%、小於 80%、小於 70%、小於 60%、小於 50%、小於 40%、小於 30%、小於 20%、小於 10%、小於 5%、小於 3%或小於 1%之親和力與 RBC 細胞或血小板（例如，來自人供體）結合。

【0115】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物不誘導血凝。在一些實施例中，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）之最小濃度相比，本文所描述之蛋白質複合物可以在大於 500 倍、2000 倍、5000 倍、20000 倍或 50000 倍之最小濃度下誘導血凝。

【0116】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以阻斷 CD47（例如，人 CD47 或其片段）與 SIRP $\alpha$ （例如，人 SIRP $\alpha$  或其片段）之間的相互作用。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以阻斷表現人 CD47 之細胞（例如，CD47 tf CHO-S 細胞或 FaDu 細胞）與人 SIRP $\alpha$  之間的相互作用。在一些實施例中，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）或 SIRPa\_G4 相比，本文所描述之蛋白質複合物之阻斷能力為至少 30%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%或至少 150%。

【0117】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以阻斷 PD-L1（例如，人 PD-L1 或其片段）與 PD-1（例如，人 PD-1 或其片段）之間的相互作用。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以阻斷表現人 PD-L1 之細胞（例如，PD-L1 tf CHO-S 細胞）與人 PD-1 之間的相互作用。在一些實施例中，如與抗 PD-L1 參考抗體（例如，MPDL3280A）或 PD1\_G4 相比，本文所描述之蛋白

質複合物之阻斷能力為至少 30%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%或至少 150%。

**【0118】** 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以誘導小鼠巨噬細胞（例如，Raw264.7 細胞）對表現 CD47 之腫瘤細胞（例如，Jurkat 細胞）之吞噬。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物誘導表現 CD47 之腫瘤細胞之吞噬之 EC50 值小於 30 nM、小於 20 nM、小於 10 nM、小於 5 nM、小於 4 nM、小於 3 nM、小於 2 nM 或小於 1 nM。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物誘導表現 CD47 之腫瘤細胞之吞噬之 EC50 值與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）或 SIRP $\alpha$ \_G4 之 EC50 值相當。在一些實施例中，與 Hu5F9-G4 或 SIRP $\alpha$ \_G4 之能力相比，本文所描述之蛋白質複合物誘導小鼠巨噬細胞對表現 CD47 之腫瘤細胞之吞噬之能力為至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%或至少 90%。在一些實施例中，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）相比，本文所描述之蛋白質複合物具有較弱之（例如，小於 80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或 10%）誘導小鼠巨噬細胞對 RBC 細胞或血小板（例如，Raw264.7 細胞）之吞噬之能力。

**【0119】** 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以誘導人巨噬細胞（例如，MDM 細胞）對表現 CD47 之腫瘤細胞（例如，Jurkat 細胞）之吞噬。在一些實施例中，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）或 SIRP $\alpha$ \_G4 之能力相比，本文所描述之蛋白質複合物誘導人巨噬細胞對表現 CD47 之腫瘤細胞之吞噬之能力為至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%或至少 90%。在一些實施例中，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）相比，本文所描述之蛋白質複合物具有較弱之（小於 80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或 10%）誘導人巨噬細胞對 RBC 細胞或血小板（例

如，MDM 細胞）之吞噬之能力。

【0120】 CD47 在多種細胞類型（包含紅血球）上之內源性表現會產生強大之「抗原沉默」，此可能會限制 CD47 靶向療法之功效。因此，本文所描述之蛋白質複合物誘導 RBC 細胞及/或血小板吞噬之較弱能力可能會增加蛋白質複合物之活體內功效。另外，與抗 CD47 參考抗體（例如，Hu5F9-G4）相比，蛋白質複合物可以以較低之劑量水準及/或頻率較低之劑量方案投與，具有類似之功效。

【0121】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以抑制 TGFβ 誘導之下游路徑，例如 smad2 報告基因路徑。在一些實施例中，與 IgG4-TGFβ 捕獲物、抗 TGFβ 或 M7824 之情況相比，蛋白質複合物可以將 TGFβ1 介導之 smad2 報告基因活性抑制至小於 150%、小於 140%、小於 130%、小於 120%、小於 110%、小於 100%、小於 90%、小於 80%、小於 70%、小於 60%或小於 50%。

【0122】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物可以增強 T 細胞反應（例如，在 MLR 測定中）。混合淋巴細胞反應（MLR）之原理為來自一位供體之 T 細胞將在來自不同供體之 APC 存在之情況下增殖。此係由於識別出兩個不相關之供體之間的 HLA 錯配，從而激發 T 細胞之免疫反應。MLR 通常用作誘導培養物中 T 細胞普遍刺激/激活之手段。在一些實施例中，與本文使用之對照分子或其組合相比，蛋白質複合物可以使 T 細胞增殖增加至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%。在一些實施例中，與本文使用之對照分子或其組合相比，本文所描述之蛋白質複合物可以使細胞因子（例如，IFN-γ 及/或 IL-2）產生增加至少 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍或 10000 倍。

【0123】 在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物不誘導人體細胞因子風暴。在一些實施例中，本文所描述之蛋白質複合物並非超促效劑。細胞因子風暴與超促效劑詳細資訊可見於例如 Shimabukuro-Vornhagen, A. 等人「細胞因子

釋放症候群 (Cytokine release syndrome)」. 《癌症免疫療法雜誌》 6.1 (2018): 1-14 中, 該文獻藉由引用整體併入本文。

**【0124】** 在一些實施例中, 本文所描述之蛋白質複合物可以抑制腫瘤生長。

**【0125】**

### 製備蛋白質複合物之方法

可以藉由將適當之核苷酸變化引入至編碼多肽或其部分之 DNA 中或藉由肽合成來製備本文所描述之蛋白質複合物之變體。此類變體包含例如胺基酸序列內殘基之缺失、插入或取代。

**【0126】** 可以進行篩選以增加 CD47 結合結構域及 PD-L1 結合結構域之結合親和力。可以進行缺失、插入及/或組合之任何組合以獲得對靶標具有增加之結合親和力之變體。引入至變體中之胺基酸改變亦可改變或將新的轉譯後修飾引入至多肽中, 如改變 (例如, 增加或減少) 糖基化位點之數目、改變糖基化位點之類型 (例如, 改變胺基酸序列, 使得由細胞中存在之酶連接不同的糖) 或引入新之糖基化位點。

**【0127】** CD47 結合結構域及/或 PD-L1 結合結構域可源自任何動物物種, 包含哺乳動物。結合結構域變體之非限制性實例包含源自人、靈長類動物例如猴及猿、奶牛、豬、馬、綿羊、駱駝科動物 (例如, 駱駝及美洲駝)、雞、山羊及嚙齒動物 (例如, 大鼠、小鼠、倉鼠及兔) 之序列。

**【0128】** 本發明亦提供包含本文所揭示之分離之聚核苷酸 (例如, 編碼本文所揭示之多肽之聚核苷酸) 的重組載體 (例如, 表現載體)、引入重組載體之宿主細胞 (亦即, 使得宿主細胞含有聚核苷酸及/或包括聚核苷酸之載體) 以及藉由重組技術產生重組多肽或其片段。

**【0129】** 如本文所使用的, 「載體」是在將載體引入至宿主細胞中時能夠將所關注之一或多種聚核苷酸遞送至宿主細胞之任何構築體。「表現載體」能夠在

已引入表現載體之宿主細胞中遞送及表現所關注之一或多種聚核苷酸作為經編碼之多肽。因此，在表現載體中，所關注之聚核苷酸被定位成藉由以下在載體中進行表現：在載體內或在宿主細胞之位於所關注之聚核苷酸之整合位點處或附近或側接該整合位點之基因體中與如啟動子、增強子及/或 poly-A 尾等調節元件可操作地連接，使得將用表現載體引入之宿主細胞中對所關注之聚核苷酸進行轉譯。

**【0130】** 可以藉由此項技術已知之方法將載體引入至宿主細胞中，例如電穿孔、化學轉染（例如，DEAE-葡聚糖）、轉化、轉染以及感染及/或轉導（例如，使用重組病毒）。因此，載體之非限制性實例包含病毒載體（其可以用於產生重組病毒）、裸 DNA 或 RNA、質體、黏粒、噬菌體載體以及與陽離子縮合劑締合之 DNA 或 RNA 表現載體。

**【0131】** 在一些實施例中，本文所揭示之聚核苷酸（例如，編碼本文所揭示之多肽之聚核苷酸）是使用病毒表現系統（例如，牛痘或其他痘病毒、逆轉錄病毒或腺病毒）引入的，此可能係關於使用非病原性（缺陷型）、有複製能力之病毒，或者可以使用複製缺陷型病毒。將 DNA 摻入到此類表現系統中之技術係一般技術者熟知的。DNA 亦可為「裸的」。裸 DNA 之攝取可以藉由將 DNA 包被至可生物降解之珠粒上來增加，該珠粒被高效地運送至細胞中。

**【0132】** 為了進行表現，可以將包括本文所揭示之編碼多肽之聚核苷酸之 DNA 插入物與適當之啟動子（例如，異源啟動子）可操作地連接，該啟動子如噬菌體  $\lambda$  PL 啟動子、大腸桿菌 (*E. coli*) lac、trp 及 tac 啟動子、SV40 早期及晚期啟動子以及逆轉錄病毒 LTR 之啟動子，僅舉幾例。其他適合之啟動子係技術人員已知的。在一些實施例中，啟動子係巨細胞病毒 (CMV) 啟動子。表現構築體可以進一步含有轉錄起始、終止之位點，且在轉錄區中含有用於轉譯之核糖體結合位點。由構築體表現之成熟轉錄物之編碼部分可以包含起始於開始處之

轉譯以及適當定位於待轉譯之多肽之末端處之終止密碼子（UAA、UGA 或 UAG）。

【0133】如所指示的，表現載體可以包含至少一種可選擇標誌物。此類標誌物包含用於真核細胞培養之二氫葉酸還原酶抗性或新黴素抗性，以及用於在大腸桿菌及其他細菌中培養之四環素或胺苄青黴素抗性基因。適合之宿主之代表性實例包含但不限於細菌細胞，如大腸桿菌、鏈黴菌屬（*Streptomyces*）及鼠傷寒沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*）細胞；真菌細胞，如酵母細胞；昆蟲細胞，若蠅 S2 及夜蛾 Sf9 細胞；動物細胞，如 CHO、COS、Bowes 黑色素瘤及 HK 293 細胞；以及植物細胞。本文所描述之宿主細胞之適合之培養基及條件係此項技術已知的。

【0134】用於細菌之非限制性載體包含：pQE70、pQE60 及 pQE-9，可自凱傑公司（Qiagen）獲得；pBS 載體、Phagescript 載體、Bluescript 載體、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A，可自斯特拉特基因公司（Stratagene）獲得；以及 ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5，可自法瑪西亞公司（Pharmacia）獲得。非限制性真核載體包含：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1 及 pSG，可自斯特拉特基因公司獲得；以及 pSVK3、pBPV、pMSG 及 pSVL，可自法瑪西亞公司獲得。其他適合之載體對於技術人員將是顯而易知的。

【0135】適於使用之非限制性細菌啟動子包含大腸桿菌 lacI 及 lacZ 啟動子、T3 及 T7 啟動子、gpt 啟動子、 $\lambda$  PR 及 PL 啟動子以及 trp 啟動子。合適之真核啟動子包含 CMV 即時早期啟動子、HSV 胸苷激酶啟動子、早期及晚期 SV40 啟動子、逆轉錄病毒 LTR 之啟動子，如勞氏肉瘤病毒（RSV）之啟動子，以及金屬硫蛋白啟動子，如小鼠金屬硫蛋白-I 啟動子。

【0136】在酵母釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中，可以使用許多含有如  $\alpha$  因子、醇氧化酶及 PGH 等組成型或誘導型啟動子之載體。

【0137】 可以藉由磷酸鈣轉染、DEAE-葡聚糖介導之轉染、陽離子脂質介導之轉染、電穿孔、轉導、感染或其他方法影響將構築體引入至宿主細胞中。此類方法在許多標準實驗室手冊中進行描述，如 Davis 等人,《分子生物學基礎方法 (Basic Methods In Molecular Biology)》(1986)，該文獻藉由引用整體併入本文。

【0138】 可以藉由將增強子序列插入至載體中來提高由較高真核生物進行之對編碼本發明之多肽之 DNA 之轉錄。增強子係 DNA 之通常為約 10 至 300 bp 之起到增加給定宿主細胞類型中之啟動子之轉錄活性之作用之順式作用元件。增強子之實例包含位於鹼基對 100 至 270 處之複製起點之後側的 SV40 增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、複製起點之後側上之多瘤增強子及腺病毒增強子。

【0139】 為了使經轉譯之蛋白質分泌至內質網的腔、周質空間或細胞外環境中，可以將適合之分泌信號併入至所表現多肽中。該信號對多肽可為內源性的，或者其亦可為異源性信號。

【0140】 多肽可以以經修飾之形式，如融合蛋白（例如，GST-融合物）或用組胺酸標籤表現，且不僅可以包含分泌信號，而且亦可包含另外的異源性功能區。例如，可以將另外的胺基酸，特別是帶電荷之胺基酸之區添加至多肽的 N 末端，以改良在純化期間或在隨後之處理及儲存期間在宿主細胞中之穩定性及持久性。同樣，可以將肽部分添加至多肽中以促進純化。可以在最終製備多肽之前將此類區移除。將肽部分添加至多肽以引起分泌或排泄、改良穩定性且促進純化（除其他外）是此項技術之熟知及習知技術。

## 【0141】

### 治療方法

本發明之蛋白質構築體或多肽可以用於各種治療目的。

【0142】在一態樣中，本發明提供用於治療個體中之癌症的方法、降低隨著時間之推移個體中之腫瘤的體積增加之速率的方法、降低發生轉移之風險的方法或降低個體中發生另外的轉移之風險的方法。在一些實施例中，治療可以停止、減緩、延遲或抑制癌症之進展。在一些實施例中，治療可以使個體中之一或多種癌症症狀之數目、嚴重性及/或持續時間減少。

【0143】在一態樣中，本發明之特徵在於方法，該方法包含向有需要之個體（例如，患有癌症或者被鑑定為或被診斷為患有癌症之個體）投與本文所揭示之治療有效量之蛋白質構築體或多肽，該癌症例如，乳癌（例如，三陰性乳癌）、良性腫瘤癌、宮頸癌、子宮內膜癌、膠質瘤、頭頸癌、肝癌、肺癌、小細胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、腎癌、大腸直腸癌、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、膀胱癌、尿道癌或血液系統惡性腫瘤。在一些實施例中，癌症是不可切除之黑色素瘤或轉移性黑色素瘤、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、膀胱癌或轉移性激素難治性前列腺癌。在一些實施例中，該個體患有實體瘤。在一些實施例中，該癌症為頭頸部鱗狀細胞癌（SCCHN）、腎細胞癌（RCC）、三陰性乳癌（TNBC）或大腸腸癌。在一些實施例中，該癌症為黑色素瘤、胰臟癌、間皮瘤、血液系統惡性腫瘤，尤其非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴細胞白血病或晚期實體瘤。

【0144】在一些實施例中，本文所揭示之組合物及方法可以用於治療有患癌症之風險的患者。患有癌症之患者可以用此項技術已知之各種方法來標識。

【0145】如本文所使用的，「有效量」意謂足以產生有益或所期望結果之量或劑量，該有益或所期望結果包含停止、減慢、延緩或抑制疾病，例如，癌症之進展。有效量將根據例如打算投與蛋白質構築體或多肽、包括編碼蛋白質構築體或多肽及/或其組合物之聚核苷酸之載體之個體的年齡及體重、症狀的嚴重程度及投與途徑而變化，且因此投與可以根據個人情況而判定。

【0146】 可以以一或多次投與來投與有效量。例如，蛋白質構築體或多肽之有效量為足以改善、停止、穩定、逆轉、抑制、減緩及/或延遲患者癌症進展之量或足以改善、在活體外停止、穩定、逆轉、減緩及/或延遲細胞（例如活檢細胞、本文所描述之癌細胞中之任何癌細胞或細胞株（例如，癌細胞株））之增殖之量。如此項技術所理解的，有效量可以變化，尤其取決於患者病史以及其他因素，如所使用之蛋白質構築體或多肽之類型（及/或劑量）。

【0147】 用於投與本文所揭示之蛋白質構築體或多肽、編碼蛋白質構築體或多肽之聚核苷酸及/或組合物之有效量及方案可以憑經驗判定，且進行此類判定在此項技術的技術範圍內。熟習此項技術者將理解，必須投與之劑量將根據例如將接受本文所揭示之蛋白質構築體或多肽、聚核苷酸及/或組合物之哺乳動物、投與途徑、所使用之本文所揭示之聚核苷酸及/或組合物之具體類型以及投與哺乳動物之其他藥物而變化。

【0148】 有效量蛋白質構築體及/或多肽之典型之每日劑量為 0.1 mg/kg 至 100 mg/kg（mg/kg 患者體重）。在一些實施例中，劑量可以小於 100 mg/kg、10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg 或 0.1 mg/kg。在一些實施例中，劑量可以大於 10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg 或 0.1 mg/kg。在一些實施例中，劑量為約 10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg 或 1 mg/kg。在一些實施例中，劑量為約 1 至 10 mg/kg、約 1 至 5 mg/kg 或約 2 至 5 mg/kg。

【0149】 在本文所描述之方法中之任何方法中，蛋白質構築體或多肽可以至少一週一次（例如，一週一次、一週兩次、一週三次、一週四次、一天一次、一天兩次或一天三次）投與個體。

【0150】 在一些實施例中，可以在投與蛋白質構築體或多肽之前或之後將一或多種另外的治療劑投與個體。在一些實施例中，將該一或多種另外的治療劑投與個體，使得個體中之一或多種另外的治療劑及蛋白質構築體或多肽之生物活性期重疊。

【0151】 在一些實施例中，可以將一或多種另外的治療劑投與個體。另外的治療劑可以包括一或多種選自由以下組成之群的抑制劑：B-Raf 抑制劑、EGFR 抑制劑、MEK 抑制劑、ERK 抑制劑、K-Ras 抑制劑、c-Met 抑制劑、間變性淋巴瘤激酶（ALK）抑制劑、磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）抑制劑、Akt 抑制劑、mTOR 抑制劑、PI3K/mTOR 雙重抑制劑、布魯頓氏酪胺酸激酶（Bruton's tyrosine kinase，BTK）抑制劑以及異檸檬酸脫氫酶 1（IDH1）及/或異檸檬酸脫氫酶 2（IDH2）抑制劑。在一些實施例中，該另外的治療劑為吡啶胺 2,3-雙加氧酶-1（IDO1）抑制劑（例如，依帕卡噪司他（epacadostat））。

【0152】 在一些實施例中，另外的治療劑可以包括一或多種選自由以下組成之群的抑制劑：HER3 抑制劑、LSD1 抑制劑、MDM2 抑制劑、BCL2 抑制劑、CHK1 抑制劑、激活之刺蝟信號傳導路徑抑制劑以及選擇性降解雌激素受體之藥劑。

【0153】 在一些實施例中，另外的治療劑可以包括一或多種選自由以下組成之群的治療劑：曲貝替定（Trabectedin）、納布紫杉醇（nab-paclitaxel）、特伯納尼（Trebananib）、帕唑帕尼（Pazopanib）、西地尼布（Cediranib）、帕博西尼（Palbociclib）、依維莫司（everolimus）、氟嘧啶（fluoropyrimidine）、IFL、瑞格拉非尼（regorafenib）、溶血素（Reolysin）、愛甯達（Alimta）、立克癌（Zykadia）、索坦（Sutent）、替西羅莫司（temsirrolimus）、阿昔替尼（axitinib）、依維莫司、索拉非尼（sorafenib）、帕唑帕尼（Votrient）、帕唑帕尼（Pazopanib）、IMA-901、AGS-003、卡博替尼（cabozantinib）、長春氟寧（Vinflunine）、Hsp90 抑制劑、Ad-

GM-CSF、替莫唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFN $\alpha$ 、長春花鹼、沙利度胺(Thalomid)、達卡巴嗪(dacarbazine)、環磷醯胺、來那度胺(lenalidomide)、阿紮胞苷(azacytidine)、來那度胺、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米(carfilzomib)、普拉曲沙(pralatrexate)及恩紮滔林(enzastaurin)。

**【0154】** 在一些實施例中，另外的治療劑可以包括選自由以下組成之群的一或多種治療劑：佐劑、TLR 促效劑、腫瘤壞死因子(TNF) $\alpha$ 、IL-1、HMGB1、IL-10 拮抗劑、IL-4 拮抗劑、IL-13 拮抗劑、IL-17 拮抗劑、HVEM 拮抗劑、ICOS 促效劑、治療靶向 CX3CL1、治療靶向 CXCL9、治療靶向 CXCL10、治療靶向 CCL5、LFA-1 促效劑、ICAM1 促效劑及選擇素促效劑。

**【0155】** 在一些實施例中，向個體投與卡鉑、納布紫杉醇、紫杉醇、順鉑、培美曲塞、吉西他濱、FOLFOX 或 FOLFIRI。

**【0156】** 在一些實施例中，另外的治療劑為抗 OX40 抗體、抗 PD-1 抗體、抗 PD-L1 抗體、抗 PD-L2 抗體、抗 SIRP $\alpha$  抗體、抗 CD47 抗體、抗 LAG-3 抗體、抗 TIGIT 抗體、抗 BTLA 抗體、抗 CTLA-4 抗體或抗 GITR 抗體。在一些實施例中，另外的治療劑為抗 CD20 抗體（例如，利妥昔單抗(rituximab)）或抗 EGF 受體抗體（例如，西妥昔單抗(cetuximab)）。

### **【0157】**

#### **醫藥組合物及投與途徑**

本文亦提供含有本文所描述之蛋白質構築體或多肽之醫藥組合物。醫藥組合物可以此項技術已知之任何方式調配。

**【0158】** 醫藥組合物調配成與其預期投與途徑（例如，靜脈內、動脈內、肌肉內、皮內、皮下或腹膜內）相容。組合物可以包含無菌稀釋劑（例如，無菌水或鹽水）、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶劑、抗菌劑或抗真菌劑，如苧醇或對羥基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞等；抗氧

化劑，如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，如乙二胺四乙酸；緩衝液，如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；以及等滲劑，如糖（例如，葡萄糖）、多元醇（例如，甘露醇或山梨醇）或鹽（例如，氯化鈉）或其任何組合。脂質體懸浮液亦可用作藥學上可接受之載劑。組合物之製劑可以調配且封裝在安瓿、一次性注射器或多劑量小瓶中。在需要之情況下（例如，在可注射調配物中），可以例如藉由使用塗層（如卵磷脂或界面活性劑）來維持適當之流動性。藥劑之吸收可以藉由包含延緩吸收之藥劑（例如，單硬脂酸鋁及明膠）來延長。可替代地，可以藉由植入物及微囊化遞送系統實現控制釋放，該系統可以包含可生物降解之生物相容性聚合物（例如，乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸）。

**【0159】** 含有本文所描述之蛋白質構築體或多肽之組合物可以以劑量單位形式（亦即含有預定量之活性化合物之實體離散單元，以便於投與及劑量均勻）調配用於非經腸（例如，靜脈內、動脈內、肌肉內、皮內、皮下或腹膜內）投與。

**【0160】** 用於非經腸投與之醫藥組合物較佳為無菌的且基本上等滲的，且在良好生產規範（GMP）條件下製造。醫藥組合物可以以單位劑型（亦即單次投與之劑量）提供。醫藥組合物可以使用一或多種生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑調配。調配物取決於所選之投與途徑。對於注射，藥劑可以在水溶液中調配，較佳地在生理上相容之緩衝液中調配，以減少注射部位之不適。溶液可含有調配劑，如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。可替代地，蛋白質構築體或多肽可以呈凍乾形式，用於在使用前用合適之載劑例如無菌之無熱原水構築。

**【0161】** 可以藉由標準藥物程序來判定組合物在細胞培養物或實驗動物（例如，猴子）中之毒性及治療功效。例如，可以判定 LD50（對 50%之群體致死之劑量）及 ED50（對 50%之群體治療有效之劑量）：治療指數為 LD50:ED50 之比率。表現出高治療指數之藥劑為較佳的。當藥物表現出不期望副作用時，應注意最小化潛在損害（亦即，減少不希望之副作用）。毒性及治療功效可藉由其他

標準製藥程序來判定。

**【0162】** 示例性劑量包含每公斤個體體重毫克或微克量之本文所描述之蛋白質構築體或多肽中之任何蛋白質構築體或多肽（例如，約 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至約 500  $\text{mg}/\text{kg}$ ；約 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至約 500  $\text{mg}/\text{kg}$ ；約 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至約 50  $\text{mg}/\text{kg}$ ；約 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至約 5  $\text{mg}/\text{kg}$ ；約 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至約 0.5  $\text{mg}/\text{kg}$ ；約 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至約 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；約 1  $\text{mg}/\text{kg}$  至約 10  $\text{mg}/\text{kg}$ ；或約 1  $\text{mg}/\text{kg}$  至約 5  $\text{mg}/\text{kg}$ ）。雖然此等劑量涵蓋寬泛之範圍，但一般技術者將理解，治療劑之效力可為不同的，且有效量可藉由此項技術已知之方法來判定。典型地，最初投與相對低的劑量，且主治衛生保健專業人員或獸醫專業人員（在治療應用之情況下）或研究人員（當仍在研發階段工作時）可以隨後且逐漸增加劑量，直至獲得適當的反應為止。另外，應理解的是，對任何特定個體之具體劑量水準將取決於各種各樣之因素，包含個體所採用之具體化合物之活性、年齡、體重、總體健康狀況、性別及飲食、投與時間、投與途徑、排泄率及活體內之半衰期。

**【0163】** 醫藥組合物可以與給藥說明書一起包含在容器、包裝或分配器中。本發明亦提供製造用於如本文所描述之各種用途之蛋白質構築體或多肽的方法。

#### **【0164】**

##### **實例**

在以下實例中進一步描述本發明，該實例不限制申請專利範圍中所描述之本發明的範圍。

#### **【0165】**

**實例 1. 使用 PD1 x SIRP $\alpha$  x TGF $\beta$  捕獲物格式設計基於 Fc 之設計者生物製劑 (Designer Biologics) (FBDB™)**

設計及開發不同的三重靶向格式之 FBDB™，以 (1) 將治療導向 PD-L1<sup>+</sup> 腫

瘤細胞；(2) 結合先天免疫（例如，靶向 SIRP $\alpha$ /CD47 路徑）及適應性免疫（例如，靶向 PD-1/PD-L1 路徑）之力量；(3) 逆轉 TGF $\beta$  誘導之免疫抑制。

**【0166】** 每種格式含有至少三種不同類型之免疫模組，該免疫模組直接或間接連接至 IgG（例如，人 IgG4）之 Fc 區。該三種免疫模組為：(1) 一或多個 SIRP $\alpha$  胞外結構域，該一或多個 SIRP $\alpha$  胞外結構域可藉由誘導吞噬刺激抗原呈遞；(2) 一或多個 PD-1 胞外結構域，該一或多個 PD-1 胞外結構域可阻斷 PD-1/PD-L1 路徑以增強 T 細胞功能且將 SIRP $\alpha$  x PD-1 x TGF $\beta$ -捕獲物分子引導至表現 PD-L1 之腫瘤；以及 (3) 一或多個 TGF $\beta$ -捕獲物分子（例如，TGF- $\beta$  受體 2 型 (TGFB2) 之胞外結構域），該一或多個 TGF $\beta$ -捕獲物分子可捕獲免疫抑制性 TGF $\beta$  且改善腫瘤微環境以增強免疫反應。例如，SIRP $\alpha$  胞外結構域可以藉由阻斷腫瘤細胞上的 CD47 與巨噬細胞上的 SIRP $\alpha$  之間的相互作用來釋放對巨噬細胞之「別吃我」制動；PD-1 胞外結構域可以藉由阻斷 PD-1 與 PD-L1 之間的相互作用來釋放對效應子 T 細胞之抑制性制動；且 TGF $\beta$ -捕獲物分子可以抑制 TGF $\beta$  在腫瘤微環境 (TME) 中之功能。

**【0167】** 設計 FBDB™之四種三重靶向格式，如圖 1A-1D 所示。HCB301-4（或 PST\_v2；圖 1A 中所示出之示意性結構）包含兩條相同之多肽鏈，且每條多肽鏈均有 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列。具體地，每條多肽鏈自 N 末端至 C 末端包含 PD-1 胞外結構域（SEQ ID NO: 5；具有與人 PD-1 蛋白（NCBI 登錄號：NP\_005009.2；SEQ ID NO: 11）之胺基酸 26-170 相同的序列）、SIRP $\alpha$  胞外結構域（SEQ ID NO: 6；具有與人 SIRP $\alpha$  蛋白（NCBI 登錄號：AAH26692.1；SEQ ID NO: 12）之胺基酸 31-148 相同的序列）、人 IgG4 鉸鏈區（根據 EU 編號具有 S228P 突變）、人 IgG4 Fc 及 TGFB2 胞外結構域（SEQ ID NO: 7；具有與 NCBI 登錄號：NP\_003233.4；SEQ ID NO: 13 之胺基酸 24-159 相同的序列）。PD-1 胞外結構域及 SIRP $\alpha$  胞外結構域藉由(GSG)<sub>6</sub> 連接肽（SEQ ID NO: 8）連接。

TGFBR2 胞外結構域藉由(G4S)<sub>4</sub>G 連接肽 (SEQ ID NO: 9) 連接至人 IgG4 Fc 之 C 末端。

**【0168】** HCB301-3 (或 SPT\_v2; 圖 1B 中所示出之示意性結構) 包含兩條相同的多肽鏈, 且每條多肽鏈均有 SEQ ID NO: 2 所示之胺基酸序列。具體地, 每條多肽鏈自 N 末端至 C 末端包含 SIRP $\alpha$  胞外結構域 (SEQ ID NO: 6)、PD-1 胞外結構域 (SEQ ID NO: 5)、人 IgG4 鉸鏈區 (根據 EU 編號具有 S228P 突變)、人 IgG4 Fc 及 TGFBR2 胞外結構域 (SEQ ID NO: 7)。SIRP $\alpha$  胞外結構域及 PD-1 胞外結構域藉由(GSG)<sub>6</sub> 連接肽 (SEQ ID NO: 8) 連接。TGFBR2 胞外結構域藉由 (G4S)<sub>4</sub>G 連接肽 (SEQ ID NO: 9) 連接至人 IgG4 Fc 之 C 末端。

**【0169】** HCB301-2 (或 P2ST\_v2; 圖 1C 中所示出之示意性結構) 包含兩條相同之多肽鏈, 且每條多肽鏈均有 SEQ ID NO: 3 所示之胺基酸序列。具體地, 每條多肽鏈自 N 末端至 C 末端包含兩個相同之 PD-1 胞外結構域 (SEQ ID NO: 5), 其藉由(G4S)<sub>3</sub> 連接子 (SEQ ID NO: 10) 連接、SIRP $\alpha$  胞外結構域 (SEQ ID NO: 6)、人 IgG4 鉸鏈區 (根據 EU 編號具有 S228P 突變)、人 IgG4 Fc 及 TGFBR2 胞外結構域 (SEQ ID NO: 7)。該兩個 PD-1 胞外結構域藉由(GSG)<sub>6</sub> 連接肽 (SEQ ID NO: 8) 連接至 SIRP $\alpha$  胞外結構域之 N 末端。TGFBR2 胞外結構域藉由(G4S)<sub>4</sub>G 連接肽 (SEQ ID NO: 9) 連接至人 IgG4 Fc 之 C 末端。

**【0170】** HCB301-1 (或 SP2T\_v2; 圖 1D 中所示出之示意性結構) 包含兩條相同之多肽鏈, 且每條多肽鏈均有 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列。具體地, 每條多肽鏈自 N 末端至 C 末端包含 SIRP $\alpha$  胞外結構域 (SEQ ID NO: 6)、兩個相同之 PD-1 胞外結構域 (SEQ ID NO: 5), 其藉由(G4S)<sub>3</sub> 連接子 (SEQ ID NO: 10) 連接、人 IgG4 鉸鏈區 (根據 EU 編號具有 S228P 突變)、人 IgG4 Fc 及 TGFBR2 胞外結構域 (SEQ ID NO: 7)。SIRP $\alpha$  胞外結構域藉由(GSG)<sub>6</sub> 連接肽 (SEQ ID NO: 8) 連接至兩個 PD-1 胞外結構域中之一。TGFBR2 胞外結構域藉由(G4S)<sub>4</sub>G 連接

肽 (SEQ ID NO: 9) 連接至人 IgG4 Fc 之 C 末端。

【0171】 表現之蛋白質藉由蛋白質 A 柱，隨後藉由 HPLC-SEC (高效液相層析法與尺寸排阻層析法；安捷倫 (Agilent)) 純化，且量測高分子量峰百分比 (HMW%)、主要峰百分比 (主%) 及低分子量峰 (LMW%) 百分比。

【0172】 具體地，HCB301 蛋白在 CHO-S 細胞中表現。收集培養上清液且經受蛋白 A 純化。藉由添加濃縮之平衡緩衝液 (250 mM Tris, 1500 mM NaCl, pH 8.0) 將培養物上清液之 pH 調節至 8.0。接下來，用 10 × 柱體積之平衡緩衝液 (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) 平衡蛋白質 A 柱，隨後將培養物上清液裝載至平衡之蛋白質 A 柱。隨後用 6 × 柱體積之洗滌緩衝液 (100 mM 檸檬酸、500 mM NaCl) 洗滌柱。將蛋白質樣品用 6 × 柱體積之溶離緩衝液 (100 mM 乙酸鹽, 200 mM NaCl, pH 3.0) 溶離，且藉由含有 1 M HEPES, pH 8.0 之緩衝液將 pH 調節至 6.5-7。如下表所示，HCB301-3 及 HCB301-4 之表現量 (滴度) 相當且高於該 HCB301-1 或 HCB302-2。蛋白質 A 純化後，HCB301 蛋白之主峰百分比 (主%) 之範圍為 87.88 % 至 94.38%；HCB301 蛋白之高分子量峰百分比 (HMW%) 之範圍為 1.35% 至 5.43%；HCB301 蛋白之低分子量峰百分比 (LMW%) 之範圍為 1.27% 至 10.78%。結果表明，所有四種 HCB301 蛋白 (HCB301-1、HCB301-2、HCB301-3 及 HCB301-4) 均可以高純度表現及採集。

表 1.

格式	MW (kDa)	pI	滴度 (mg/mL)	HCB301 之 HPLC-SEC (安捷倫) 曲線 蛋白質 A 純化後之 (CHO-S)		
				HMW %	主要 %	LMW %
HCB301-4	145.11	5.77	177.15	4.35	94.38	1.27
HCB301-3	145.11	5.77	179.87	5.43	92.35	2.22
HCB301-2	179.27	6.05	62.07	1.35	87.88	10.78
HCB301-1	179.27	6.05	109.21	2.57	91.22	6.22

【0173】另外，使用去免疫工具分析 HCB301-1、HCB301-2、HCB301-3 及 HCB301-4 之胺基酸序列（免疫表位資料庫及分析資源；Dhandra 等人「開發一種策略及計算應用來選擇具有降低之 HLA 結合及免疫原性之候選蛋白質類似物（Development of a strategy and computational application to select candidate protein analogues with reduced HLA binding and immunogenicity）」. 《免疫學（Immunology）》153.1 (2018): 118-132)以鑑定免疫原性區域。未鑑定出免疫原性。

【0174】

### 實例 2.全細胞與 CD47 tf CHO-S 細胞結合能力之測定

為了判定 HCB301 蛋白與細胞表面上表現之 CD47 之全細胞結合能力，將表現人 CD47 之轉染之 CHO-S 細胞（CD47 tf CHO-S）用作靶細胞。將  $5 \times 10^4$  個細胞與在指定濃度（6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM、100 nM 及 500 nM）下之連續稀釋之 HCB301 蛋白在 FACS 緩衝液（補充有 4%胎牛血清（FBS）之磷酸鹽緩衝鹽水（PBS））中在 4°C 下培育 30 分鐘。培育後，將細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩次，隨後與 R-藻紅蛋白-AffiniPure 山羊抗人 IgG（傑克遜免疫研究所實驗室（Jackson ImmunoResearch），目錄號：109-115-098）在 4°C 下培育 30 分鐘。使用 CytoFLEX 流式細胞儀（美國加利福尼亞州之貝克曼庫爾特公司（Beckman Coulter Inc., CA, USA））分析樣品。SIRP $\alpha$ \_G4 用作陽性對照。SIRP $\alpha$ \_G4 包含兩條相同之多肽鏈，且每條多肽鏈均有 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列。PD1\_G4 用作陰性對照。PD1\_G4 包含兩條相同之多肽鏈，且每條多肽鏈均有 SEQ ID NO: 15 所示之胺基酸序列。

【0175】如圖 2 所示，所有四種 HCB301 蛋白均可與 CD47 tf CHO-S 細胞結合。具體地，陽性對照 SIRP $\alpha$ \_G4 表現出最高之 CD47 結合能力，隨後為 HCB301-3 及 HCB301-1。HCB301-4 及 HCB301-2 亦可以與表現 CD47 之細胞結合。相比之下，陰性對照 PD1\_G4 未偵測到結合信號。

**【0176】****實例 3.全細胞與 PDL1 tf CHO-S 細胞結合能力之測定**

為了判定 HCB301 蛋白與 PD-L1 之結合能力，將表現人 PD-L1 之轉染之 CHO-S 細胞 (PDL1 tf CHO-S) 用作靶細胞。將  $3 \times 10^4$  個細胞與在指定濃度 (6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM 及 100 nM) 下之連續稀釋之 HCB301 蛋白在 FACS 緩衝液 (補充有 4% FBS 之 PBS) 中在 4°C 下培育 30 分鐘。培育後，將細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩次，隨後與 R-藻紅蛋白-AffiniPure 山羊抗人 IgG (傑克遜免疫研究所實驗室，目錄號：109-115-098) 在 4°C 下培育 30 分鐘。使用 CytoFLEX 流式細胞儀 (美國加利福尼亞州之貝克曼庫爾特公司) 分析樣品。PD1\_G4 用作陽性對照。Hu5F9-G4 (抗 CD47 參考抗體) 及 SIRP $\alpha$ \_G4 用作陰性對照。

**【0177】** 如圖 3 所示，所有四種 HCB301 蛋白均可與 PDL1 tf CHO-S 細胞結合。具體地，HCB301-1 及 HCB301-2 表現出比陽性對照 PD1\_G4 更高之結合能力，且 PD1\_G4 表現出比 HCB301-4 及 HCB301-3 更高之結合能力。相比之下，陰性對照 Hu5F9-G4 及 SIRP $\alpha$ \_G4 未偵測到結合信號。

**【0178】****實例 4.全細胞與表現 CD47 之腫瘤細胞之結合能力之測定**

為了判定 HCB301 蛋白與腫瘤細胞表面上表現之 CD47 之全細胞結合能力，表現內源性 CD47 之下咽癌 FaDu 細胞用作靶細胞。將  $3 \times 10^4$  個 FaDu 細胞與在指定濃度 (6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM 及 100 nM) 下的連續稀釋之 HCB301 蛋白在 FACS 緩衝液 (補充有 4% FBS 之 PBS) 中在 4°C 下培育 30 分鐘。培育後，將細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩次，隨後與 R-藻紅蛋白-AffiniPure 山羊抗人 IgG (傑克遜免疫研究所實驗室，目錄號：109-115-098) 在 4°C 下培育 30 分鐘。使用 CytoFLEX 流式細胞儀 (美國加利福尼亞州之貝克曼庫

爾特公司)分析樣品。Hu5F9-G4 及 SIRP $\alpha$ \_G4 用作陽性對照。PD1\_G4 用作陰性對照。

【0179】如圖 4 所示，所有四種 HCB301 蛋白均可以與 FaDu 細胞結合。具體地，HCB301-1 示出最高的結合能力，隨後為 HCB301-3、HCB301-4 及 HCB301-2。相比之下，陰性對照 PD1\_G4 未偵測到結合信號。

【0180】

#### 實例 5.全細胞與 RBC 結合能力之測定

為了判定 HCB301 蛋白與紅血球 (RBC) 之結合能力，將  $1 \times 10^5$  個人 RBC 與在指定濃度 (6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM、100 nM 及 500 nM) 下之連續稀釋之 HCB301 蛋白在 FACS 緩衝液 (補充有 4% FBS 之 PBS) 中在 4°C 下培育 30 分鐘。培育後，將 RBC 用 FACS 緩衝液洗滌兩次，隨後與 R-藻紅蛋白-AffiniPure 山羊抗人 IgG (傑克遜免疫研究所實驗室，目錄號：109-115-098) 在 4°C 下培育 30 分鐘。使用 CytoFLEX 流式細胞儀 (美國加利福尼亞州之貝克曼庫爾特公司) 分析樣品。Hu5F9-G4 用作陽性對照。PD1\_G4 用作陰性對照。

【0181】如圖 5A-5B 所示，陽性對照 Hu5F9-G4 對 RBC 表現出強的結合能力。相比之下，所有四種 HCB301 蛋白均示出與 RBC 之弱結合。具體地，HCB301-3 示出比 HCB301-1 更高的 RBC 結合能力，且 HCB301-3 及 HCB301-1 之結合能力均高於 SIRP $\alpha$ \_G4 之結合能力。HCB301-4 及 HCB301-2 示出較低的 RBC 結合能力，此與 PD1\_G4 之 RBC 結合能力相當。

【0182】

#### 實例 6.全細胞與血小板結合能力之測定

為了判定 HCB301 蛋白與血小板之結合能力，將  $5 \times 10^5$  個人血小板與在指定濃度 (6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM、100 nM 及 500 nM)

下的連續稀釋之 HCB301 蛋白在 FACS 緩衝液（補充有 4% FBS 之 PBS）中在 4°C 下培育 30 分鐘。培育後，將血小板用 FACS 緩衝液洗滌兩次，隨後與 R-藻紅蛋白-AffiniPure 山羊抗人 IgG（傑克遜免疫研究所實驗室，目錄號：109-115-098）在 4°C 下培育 30 分鐘。使用 CytoFLEX 流式細胞儀（美國加利福尼亞州之貝克曼庫爾特公司）分析樣品。Hu5F9-G4 用作陽性對照。PD1\_G4 及 SIRP $\alpha$ \_G4 用作陰性對照。

【0183】如圖 6A-6B 所示，陽性對照 Hu5F9-G4 對血小板表現出強的結合能力。相比之下，所有 HCB301 蛋白均示出與血小板之弱結合。具體地，HCB301-3 示出比 HCB301-2 及 HCB301-1 更高的血小板結合能力。HCB301-4 示出較低的 RBC 結合能力，此與 SIRP $\alpha$ \_G4 之 RBC 結合能力相當。

#### 【0184】

#### 實例 7.與 hTGF $\beta$ 1、hTGF $\beta$ 2 及 hTGF $\beta$ 3 之結合能力的測定

為了判定 HCB301 蛋白與人 TGF $\beta$  之結合能力，使用在指定濃度（25.4 pM、76.2 pM、228.6 pM、685.8 pM、2.1 nM、6.2 nM、18.5 nM、55.6 nM、166.7 nM 或 500 nM）下之 HCB301 蛋白進行結合滴定 ELISA 測定。IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作陽性對照。SIRP $\alpha$ \_G4 用作陰性對照。在 4°C 下，將 96 孔 EIA 微孔板用 1  $\mu$ g/ml 人 TGF $\beta$ （TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 或 TGF $\beta$ 3）包被隔夜。用含有 5% 脫脂牛奶之 1  $\times$  PBS 封閉後，添加稀釋之 HCB301 蛋白且在室溫（RT）下培育 1 小時。藉由用 1  $\times$  PBST（含有 0.1% Tween 20 之 1  $\times$  PBS）洗滌孔三次來移除未結合之蛋白質。在室溫下將 HRP 結合之二級抗體（1:5000）添加至孔中，持續 1 小時。培育後，藉由用 1  $\times$  PBST 洗滌孔三次來移除過量之二級抗體。最後，將 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（TMB）添加至顯色中。停止反應且使用分光光度計在 450 nm 處量測 HRP 活性。

【0185】如圖 7A-7C 所示，亦根據結合曲線測定 EC50 值。結果表明

HCB301 蛋白可以與 hTGFβ1 及 hTGFβ3 結合，但示出與 hTGFβ2 之弱結合能力。具體地，HCB301-1、HCB301-3 及 HCB301-4 與 hTGFβ3 結合之 EC50 值低於其相應與 hTGFβ1 結合之 EC50 值。

### 【0186】

#### 實例 8.與表現 PD-L1 之細胞之選擇性結合

HCB301 蛋白與表現 PD-L1 之細胞之選擇性結合能力測定如下。根據製造商提供之說明，將 OE19 細胞用 CellTrace™ CFSE（賽默公司（Thermo），目錄號：C34554）標記，且將轉染之表現 PD-L1 之 OE19 細胞（PD-L1 tf OE19）用 Celltrace™紫羅蘭（賽默公司，目錄號：C34557）標記。將  $2 \times 10^4$  個細胞/孔之 CellTrace™ CFSE-標記之 OE19 細胞（OE19-CFSE）及  $2 \times 10^4$  個細胞/孔之 CellTrace™紫羅蘭標記之轉染之表現 PD-L1 tf OE19 之 OE19 細胞（OE19-紫羅蘭）與在指定濃度（6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM、100 nM 及 500 nM）下之連續稀釋之 HCB301 蛋白在 FACS 緩衝液（補充有 4% FBS 之 PBS）中在 4°C 下培育 30 分鐘。培育後，將細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩次，隨後與 R-藻紅蛋白-AffiniPure 山羊抗人 IgG（傑克遜免疫研究所實驗室，目錄號：109-115-098）在 4°C 下培育 30 分鐘。使用 CytoFLEX 流式細胞儀（美國加利福尼亞州之貝克曼庫爾特公司）分析樣品。之後，根據 PE 信號對細胞進行門控以藉由 Kaluza 分析軟體（貝克曼庫爾特公司）計算不同細胞類型之百分比。PD1\_G4 用作陽性對照，且 SIRPα\_G4 用作陰性對照。

【0187】如圖 8A 所示，在 32 pM 下，所有 HCB301 蛋白均示出與表現 PD-L1 之 OE19-紫羅蘭細胞之選擇性結合超過 OE19-CFSE 細胞。圖 8B-8G 分別示出 SIRPα\_G4、PD1\_G4 及四種 HCB301 蛋白（HCB301-1、HCB301-2、HCB301-3 及 HCB301-4）與兩種細胞類型之結合曲線。

### 【0188】

### 實例 9.血凝 (HA) 活性

為了判定 HCB301 蛋白誘導之 HA 活性，自健康供體之全血中製備 10% 之 RBC 溶液。將 RBC 用 0.9% NaCl 緩衝液洗滌兩次，隨後在 0.9% NaCl 緩衝液中稀釋至 10% (按體積計)。將 HCB301 蛋白連續稀釋 (3 倍) 至 8.4 pM、25.4 pM、76.2 pM、228.6 pM、685.8 pM、2.1 nM、6.2 nM、18.5 nM、55.6 nM、166.7 nM 或 500 nM 之最終濃度。將稀釋之蛋白質在圓底 96 孔板中與 12  $\mu$ l 之 10% RBC 溶液一起在室溫下培育隔夜。凝集之 RBC 均勻地包被該孔，而非凝集之細胞在孔底部處形成明顯之紅點。Hu5F9-G4 用作陽性對照 PC。SIRP $\alpha$ \_G4、PD1\_G4 及 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作陰性對照。

【0189】第二天捕獲板之圖像，如圖 9 所示。該圖像表明僅 Hu5F9-G4 在高濃度下誘導 HA 活性，而其他測試分子 (包含四種 HCB301 蛋白) 均未在上述指定濃度範圍內誘導 HA 活性。

### 【0190】

### 實例 10.對 SIRP $\alpha$ /CD47 相互作用之阻斷作用之測定

為了判定 HCB301 蛋白之 SIRP $\alpha$  配位體阻斷能力，使用 CD47 tf CHO-S 細胞作為靶細胞進行基於流式細胞術之測定。具體地，將  $3 \times 10^4$  個細胞/孔之 CD47 tf CHO-S 細胞與在指定濃度 (0.2 pM、1.9 pM、15.2 pM、122.1 pM、876.6 pM、7.8 nM、62.5 nM 及 500 nM) 下連續稀釋之 HCB301 蛋白以及固定濃度之生物素化 SIRP $\alpha$ \_G4 一起在 FACS 緩衝液 (補充有 4% FBS 之 PBS) 中在 4°C 下培育 30 分鐘。洗滌後，以每孔 0.3  $\mu$ g 添加鏈黴親和素-PE (e 生物科學公司 (eBioscience)，目錄號：EBS12-4317-87)，且使用 CytoFLEX 流式細胞儀 (貝克曼庫爾特公司) 分析來自細胞之 PE 信號。Hu5F9 及 SIRP $\alpha$ \_G4 用作陽性對照。抗 PD-1 抗體 (具有人 IgG4 Fc) 用作同型對照。

【0191】如圖 10 所示，Hu5F9-G4 表現出最強之阻斷作用，隨後為

SIRP $\alpha$ \_G4 及四種 HCB301 蛋白。更具體地，四種 HCB301 蛋白之阻斷作用可以自強至弱排序為：HCB301-3、HCB301-1、HCB301-4 及 HCB301-2。

### 【0192】

#### 實例 11.對 PD-1/PD-L1 相互作用之阻斷作用之測定

HCB301 蛋白對 PD-1 與 PD-L1 在 CHO-S 細胞之間的相互作用之阻斷作用測定如下。將  $3 \times 10^4$  個細胞/孔之 PD-L1 在 CHO-S 細胞與在指定濃度（0.2 pM、1.9 pM、15.2 pM、122.1 pM、876.6 pM、7.8 nM、62.5 nM 及 500 nM）下連續稀釋之 HCB301 蛋白以及固定濃度之生物素化 PD1\_G4 一起在 FACS 緩衝液（補充有 4% FBS 之 PBS）中在 4°C 下培育 30 分鐘。洗滌後，以每孔 0.3  $\mu$ g 添加鏈黴親和素-PE（e 生物科學公司，目錄號：EBS12-4317-87），且使用 CytoFLEX 流式細胞儀（貝克曼庫爾特公司）分析來自細胞之 PE 信號。MPDL3280A（抗 PD-L1 抗體）及 PD1\_G4 用作陽性對照。

【0193】如圖 11 所示，MPDL3280A 表現出最強之阻斷作用。HCB301-1 及 HCB301-2 表現出比 PD1\_G4 更強之阻斷作用。HCB301-4 示出比 PD1\_G4 之阻斷作用更弱之阻斷作用，但比 HCB301-3 更強之阻斷作用。結果表明，在每條多肽鏈中具有兩個 PD-1 胞外結構域之 HCB301 蛋白可以比在每條多肽鏈中具有一個 PD-1 胞外結構域之蛋白質更有效地阻斷 PD-1/PD-L1 相互作用。

### 【0194】

#### 實例 12.TGF $\beta$ 誘導之 smad2 報告基因活性之抑制

HCB301 蛋白抑制 TGF $\beta$ 1 誘導之 smad2 報告基因活性之能力測定如下。將 HCB301 蛋白連續稀釋（5 倍）至 6.4 pM、32 pM、160 pM、0.8 nM、4 nM、20 nM、100 nM 及 500 nM 之最終濃度。M7824（抗 PD-L1  $\times$  TGF $\beta$  捕獲物）、抗 TGF $\beta$ （抗 TGF $\beta$  抗體，BioXcell 公司（BioXcell），目錄號：BE0057）及 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物用作陽性對照。SIRP $\alpha$ \_G4 用作陰性對照。將  $4 \times 10^3$  個轉染之表現 smad2 報

告基因之 HEK293T 細胞分別與稀釋之 HCB301 蛋白以及 20 ng/ml TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 及 TGF $\beta$ 3 一起培育。在 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中在 37°C 下培育 24 小時後，藉由 Varioskan™ LUX 多模式酶標儀（賽默公司）偵測發光信號。

【0195】如圖 12A 所示，所有四種 HCB301 蛋白均可抑制 TGF $\beta$ 1 介導之 smad2 報告基因活性。每種 HCB301 蛋白均示出比 M7824 及 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物更強之抑制能力。具體地，HCB301-3、HCB301-4 及 HCB301-1 示出比 HCB301-2 之抑制能力更強之抑制能力。如圖 12B-12C 所示，HCB301-3、HCB301-4 及 HCB301-1 可以抑制 TGF $\beta$ 3 介導的但不抑制 TGF $\beta$ 2 介導之 smad2 報告基因活性。特定言之，與 IgG4-TGF $\beta$  捕獲物或 M7824 之抑制效能力相比，HCB301-3、HCB301-4 及 HCB301-1 表現出相當之 TGF $\beta$ 3 抑制效能力。

#### 【0196】

#### 實例 13. 巨噬細胞吞噬表現 CD47 之腫瘤細胞之誘導

為判定癌細胞上 HCB301 蛋白誘導之巨噬細胞介導之吞噬，如下進行吞噬測定。將表現 CD47 之 Jurkat 細胞用 5 nM CellTrace™ CFSE（賽默公司，目錄號：C34554）在 37°C 下標記，持續 10 分鐘，且藉由完全 RPMI-1640 培養基來洗滌。將  $1 \times 10^5$  個細胞/孔之 CFSE 標記之 Jurkat 細胞（靶細胞）與在指定濃度（10 pM、100 pM、1 nM、10 nM、100 nM 及 1  $\mu$ M）下連續稀釋之 HCB301 蛋白在低結合 96 孔 U 形底板中在 37°C 下培育 30 分鐘。之後，將  $5 \times 10^4$  個 Raw264.7 小鼠巨噬細胞添加至每個孔中，且將板在 37°C 下培育 2 小時。將 Raw264.7 細胞用 PE-花青 7 結合之 F4/80 抗體（e 生物科學公司，目錄號：25-4801-82）染色。藉由 CytoFlex 流式細胞儀（貝克曼庫爾特公司）計算來自巨噬細胞之 CFSE + F4/80+（表明巨噬細胞吞噬 CFSE 標記之 Jurkat 細胞）占來自巨噬細胞之總 F4/80 信號之百分比來評估 HCB301 蛋白之吞噬能力。Hu5F9-G4 及 SIRP $\alpha$ \_G4 用作陽性對照。PD1\_G4 用作陰性對照。抗 PD-1 抗體（具有人 IgG4 Fc）用作同型對

照。

【0197】如圖 13 所示，Hu5F9-G4 表現出最強的誘導 Raw264.7 介導之對表現 CD47 之 Jurkat 細胞之吞噬的能力，隨後為 SIRP $\alpha$ \_G4。HCB301-3、HCB301-1 及 HCB301-4 亦誘導小噬細胞吞噬 Jurkat 細胞。相比之下，PD1\_G4 及同型對照在測試濃度下不誘導吞噬。

#### 【0198】

#### 實例 14.在存在 TGF $\beta$ 1 之情況下增強 MLR 測定中之 T 細胞反應

在存在 TGF $\beta$ 1 之情況下進行混合淋巴細胞反應 (MLR) 測定，以判定 HCB301 蛋白對 T 細胞反應之增強。將 T 細胞用 5 nM CellTrace™紫羅蘭 (賽默公司，目錄號：C34557) 在 37°C 下標記，持續 10 分鐘，且隨後藉由完全 RPMI-1640 培養基洗滌兩次。將  $1 \times 10^5$  CellTrace™紫羅蘭標記之 CD4<sup>+</sup> T 細胞及  $1 \times 10^4$  樹突細胞 (DC) 與在 2 nM、20 nM 或 200 nM 下之 HCB301 蛋白一起培育。對照分子或其組合亦用於培育，例如 PDGFR-Fc、SIRP $\alpha$ \_G4、PD1\_G4、IgG4-TGF $\beta$  捕獲物、M7824、SIRP $\alpha$ \_G4+PD1\_G4+IgG4-TGF $\beta$  捕獲物、SIRP $\alpha$ \_G4+PD1\_G4、SIRP $\alpha$ \_G4+IgG4-TGF $\beta$  捕獲物及 PD1\_G4+IgG4-TGF $\beta$  捕獲物。PDGFR-Fc 用作陰性對照。PDGFR-Fc 包含兩條相同之多肽鏈，且每條多肽鏈均有與 Fc 融合之 PDGFR 胞外結構域。隨後添加來自 NCI-H650 細胞之含有 TGF $\beta$ 1 之條件培養基，且共培育 5 天。共培育後，採集細胞且藉由 CytoFLEX-S 流式細胞儀 (貝克曼庫爾特公司) 分析細胞增殖。亦收集培養上清液，且分別使用以下測定 IL-2 分泌及 IFN- $\gamma$  分泌：人 IL-2 ELISA MAX Deluxe 套組 (百進生物公司 (BioLegend)，目錄號：431805) 及人 IFN $\gamma$  ELISA MAX Deluxe 套組 (百進生物公司，目錄號：430105)。

【0199】如圖 14A 所示，使用 CellTrace™紫羅蘭細胞增殖套組 (賽默公司，目錄號：C34557) 測定 MLR 測定中之細胞增殖。具體地，計算較弱之 CellTrace™

紫羅蘭標記之細胞（表示增殖細胞）占 CD3+/7-ADD 細胞（表示總 T 細胞）之百分比。結果表明，與對照分子或其組合相比，用 HCB301-3、HCB301-4 及 HCB301-1 處理之細胞未顯著改變細胞增殖。

【0200】如圖 14B 所示，使用人 IL-2 ELISA MAX Deluxe 套組測定 MLR 測定中之 IL-2 分泌。結果表明，M7824 表現出最高之 IL-2 分泌水準，隨後為 HCB301-1、HCB301-3 及 HCB301-4。特別是，與 IgG4-TGFβ 捕獲物及 SIRPα\_G4+PD1\_G4+IgG4-TGFβ 捕獲物相比，用 HCB301-4 處理之細胞具有類似之 IL-2 分泌水準。用 SIRPα\_G4+IgG4-TGFβ 捕獲物或 PD1\_G4+IgG4-TGFβ 捕獲物處理之細胞具有低 IL-2 分泌水準。

【0201】如圖 14C 所示，使用人 IFN $\gamma$  ELISA MAX Deluxe 套組測定 MLR 測定中之 IFN- $\gamma$  分泌。結果表明，HCB301-1 表現出最高之 IFN- $\gamma$  分泌水準，隨後為 M7824、PD1\_G4+IgG4-TGFβ 捕獲物、HCB301-3 及 HCB301-4。用 PD1\_G4、SIRPα\_G4、SIRPα\_G4+PD1\_G4、SIRPα\_G4+PD1\_G4+IgG4-TGFβ 捕獲物、SIRPα\_G4+PD1\_G4 及 SIRPα\_G4+IgG4-TGFβ 捕獲物處理之細胞具有類似及低 IFN- $\gamma$  分泌水準。

【0202】總而言之，圖 15A-15B 示出如上文所討論之活體外測定結果。選擇 HCB301-3 用於後續實驗，部分因為係其相對於 HCB301-1 及 HCB301-2 之相對較簡單結構以及如活體外測定示出之強大功能。

### 【0203】

#### 其他實施例

應當理解，雖然已經結合本發明之具體描述對本發明進行描述，但前面之描述旨在說明而非限制本發明之範圍，本發明之範圍由所附申請專利範圍之範圍限定。其他態樣、優勢及修改在以下申請專利範圍之範圍內。

## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種蛋白質複合物，其包括：

(a) Fc；

(b) CD47 結合結構域；以及

(c) PD-L1（程式性死亡配位體 1）結合結構域。

【請求項 2】 如請求項 1 之蛋白質複合物，其進一步包括 TGF $\beta$ （轉化生長因子  $\beta$ ）結合結構域。

【請求項 3】 如請求項 1 或 2 之蛋白質複合物，其中該 CD47 結合結構域能夠與表現 CD47 之細胞（例如，癌細胞）結合及/或能夠阻斷 CD47 與信號調節蛋白  $\alpha$ （SIRP $\alpha$ ）之間的相互作用。

【請求項 4】 如請求項 1 至 3 中任一項之蛋白質複合物，其中該 CD47 結合結構域係或包括 SIRP $\alpha$  胞外結構域（例如，人 SIRP $\alpha$  胞外結構域）。

【請求項 5】 如請求項 1 至 3 中任一項之蛋白質複合物，其中該 CD47 結合結構域係抗 CD47 抗體或其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）。

【請求項 6】 如請求項 1 至 5 中任一項之蛋白質複合物，其中該 CD47 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【請求項 7】 如請求項 1 至 6 中任一項之蛋白質複合物，其中該 PD-L1 結合結構域能夠與表現 PD-L1 之細胞（例如，癌細胞）結合及/或能夠阻斷 PD-L1 與程式性細胞死亡蛋白 1（PD-1）之間的相互作用。

【請求項 8】 如請求項 1 至 7 中任一項之蛋白質複合物，其中該 PD-L1 結合結構域係或包括 PD-1 胞外結構域（例如，人 PD-1 胞外結構域）。

【請求項 9】 如請求項 1 至 7 中任一項之蛋白質複合物，其中該 PD-L1 結合結構域係抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）。

【請求項 10】 如請求項 1 至 9 中任一項之蛋白質複合物，其中該 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【請求項 11】 如請求項 2 至 10 中任一項之蛋白質複合物，其中該 TGFβ 結合結構域能夠捕獲 TGFβ，由此增加免疫反應及/或改善腫瘤微環境。

【請求項 12】 如請求項 2 至 11 中任一項之蛋白質複合物，其中該 TGFβ 結合結構域係或包括 TGFBR2 胞外結構域（例如，人 TGFBR2 胞外結構域）。

【請求項 13】 如請求項 2 至 11 中任一項之蛋白質複合物，其中該 TGFβ 結合結構域係抗 TGFβ 抗體或其抗原結合片段（例如，scFv 或 VHH）。

【請求項 14】 如請求項 2 至 13 中任一項之蛋白質複合物，其中該 TGFβ 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同之胺基酸序列。

【請求項 15】 如請求項 1 至 14 中任一項之蛋白質複合物，其中該 Fc 係人 IgG4 Fc。

【請求項 16】 如請求項 1 至 15 中任一項之蛋白質複合物，其中該 CD47 結合結構域與該 Fc 中之 CH2 結構域之 N 末端連接，視情況藉由鉸鏈區。

【請求項 17】 如請求項 16 之蛋白質複合物，其中該 PD-L1 結合結構域與該 CD47 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由連接肽。

【請求項 18】 如請求項 1 至 15 中任一項之蛋白質複合物，其中該 PD-L1 結合結構域與該 Fc 中之 CH2 結構域之 N 末端連接，視情況藉由鉸鏈區。

【請求項 19】 如請求項 18 之蛋白質複合物，其中該 CD47 結合結構域與該 PD-L1 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由連接肽。

【請求項 20】 如請求項 16 至 19 中任一項之蛋白質複合物，其中該鉸鏈區係人 IgG4 鉸鏈區，該人 IgG4 鉸鏈區視情況具有根據 EU 編號之 S228P 突變。

【請求項 21】 如請求項 2 至 20 中任一項之蛋白質複合物，其中該 TGF $\beta$  結合結構域與該 Fc 中之 CH3 結構域之 C 末端連接，視情況藉由連接肽。

【請求項 22】 如請求項 1 至 21 中任一項之蛋白質複合物，其中該蛋白質複合物包括兩個或更多個 CD47 結合結構域。

【請求項 23】 如請求項 1 至 22 中任一項之蛋白質複合物，其中該蛋白質複合物包括兩個或更多個 PD-L1 結合結構域。

【請求項 24】 如請求項 1 至 23 中任一項之蛋白質複合物，其中該蛋白質複合物包括兩個或更多個 TGF $\beta$  結合結構域。

【請求項 25】 一種蛋白質複合物，其包括：

(a) 第一多肽，該第一多肽自 N 末端至 C 末端包括：第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域；以及

(b) 第二多肽，該第二多肽自 N 末端至 C 末端包括：第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$  結合結構域。

【請求項 26】 如請求項 25 之蛋白質複合物，其中該第一 PD-L1 結合結構域及/或該第二 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 27】 如請求項 25 或 26 之蛋白質複合物，其中該第一 CD47 結合結構域及/或該第二 CD47 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 28】 如請求項 25 至 27 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一 TGF $\beta$

結合結構域及/或該第二 TGF $\beta$  結合結構域包括與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 29】 如請求項 25 至 28 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一鉸鏈區及/或該第二鉸鏈區包括與 SEQ ID NO: 16 至少 80%相同之序列。

【請求項 30】 如請求項 25 至 29 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一 Fc 區及/或該第二 Fc 區包括與 SEQ ID NO: 17 至少 80%相同之序列。

【請求項 31】 如請求項 25 至 30 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一連接肽及/或該第三連接肽包括與 SEQ ID NO: 8 至少 80%相同之序列。

【請求項 32】 如請求項 25 至 31 中任一項之蛋白質複合物，其中該第二連接肽及/或該第四連接肽包括與 SEQ ID NO: 9 至少 80%相同之序列。

【請求項 33】 如請求項 25 至 32 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 1 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 34】 如請求項 25 至 33 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一多肽進一步包括第三 PD-L1 結合結構域，且該第二多肽進一步包括第四 PD-L1 結合結構域。

【請求項 35】 如請求項 34 之蛋白質複合物，其中該第三 PD-L1 結合結構域及/或該第四 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 36】 如請求項 34 或 35 之蛋白質複合物，其中該第三 PD-L1 結合結構域與該第一 PD-L1 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由第五連接肽，其中該第四 PD-L1 結合結構域與該第二 PD-L1 結合結構域之 N 末端連接，視情況藉由第六連接肽。

【請求項 37】 如請求項 36 之蛋白質複合物，其中該第五連接肽及/或該第六

連接肽包括與 SEQ ID NO: 10 至少 80%相同之序列。

【請求項 38】 如請求項 34 至 37 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 3 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 39】 一種蛋白質複合物，其包括：

(a) 第一多肽，該第一多肽自 N 末端至 C 末端包括：第一 CD47 結合結構域、視情況選用之第一連接肽、第一 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第一鉸鏈區、第一 Fc 區、視情況選用之第二連接肽及視情況選用之第一 TGF $\beta$  結合結構域；以及

(b) 第二多肽，該第二多肽自 N 末端至 C 末端包括：第二 CD47 結合結構域、視情況選用之第三連接肽、第二 PD-L1 結合結構域、視情況選用之第二鉸鏈區、第二 Fc 區、視情況選用之第四連接肽及視情況選用之第二 TGF $\beta$  結合結構域。

【請求項 40】 如請求項 39 之蛋白質複合物，其中該第一 CD47 結合結構域及/或該第二 CD47 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 6 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 41】 如請求項 39 或 40 之蛋白質複合物，其中該第一 PD-L1 結合結構域及/或該第二 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 42】 如請求項 39 至 41 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一 TGF $\beta$  結合結構域及/或該第二 TGF $\beta$  結合結構域包括與 SEQ ID NO: 7 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 43】 如請求項 39 至 42 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一鉸鏈區及/或該第二鉸鏈區包括與 SEQ ID NO: 16 至少 80%相同之序列。

【請求項 44】 如請求項 39 至 43 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一 Fc 區及/或該第二 Fc 區包括與 SEQ ID NO: 17 至少 80%相同之序列。

【請求項 45】 如請求項 39 至 44 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一連接肽及/或該第三連接肽包括與 SEQ ID NO: 8 至少 80%相同之序列。

【請求項 46】 如請求項 39 至 45 中任一項之蛋白質複合物，其中該第二連接肽及/或該第四連接肽包括與 SEQ ID NO: 9 至少 80%相同之序列。

【請求項 47】 如請求項 25 至 32 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一多肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 2 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 48】 如請求項 39 至 47 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一多肽進一步包括第三 PD-L1 結合結構域，且該第二多肽進一步包括第四 PD-L1 結合結構域。

【請求項 49】 如請求項 48 之蛋白質複合物，其中該第三 PD-L1 結合結構域及/或該第四 PD-L1 結合結構域包括與 SEQ ID NO: 5 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 50】 如請求項 48 或 49 之蛋白質複合物，其中該第三 PD-L1 結合結構域融合在該第一 PD-L1 結合結構域與該第一鉸鏈區之間，視情況藉由該第一 PD-L1 結合結構域與該第三 PD-L1 結合結構域之間的第五連接肽，其中該第四 PD-L1 結合結構域融合在該第二 PD-L1 結合結構域與該第二鉸鏈區之間，視情況藉由該第二 PD-L1 結合結構域與該第四 PD-L1 結合結構域之間的第六連接肽。

【請求項 51】 如請求項 50 之蛋白質複合物，其中該第五連接肽及/或該第六連接肽包括與 SEQ ID NO: 10 至少 80%相同之序列。

【請求項 52】 如請求項 48 至 51 中任一項之蛋白質複合物，其中該第一多

肽及/或該第二多肽包括與 SEQ ID NO: 4 至少 80%、90%、95%或 100%相同之序列。

【請求項 53】一種核酸，其包括編碼如請求項 1 至 52 中任一項之蛋白質複合物之聚核苷酸。

【請求項 54】如請求項 53 之核酸，其中該核酸係 DNA（例如，cDNA）或 RNA（例如，mRNA）。

【請求項 55】一種載體，其包括如請求項 53 或 54 之核酸中之一或多種核酸。

【請求項 56】一種細胞，其包括如請求項 55 之載體。

【請求項 57】如請求項 56 之細胞，其中該細胞係 CHO 細胞。

【請求項 58】一種細胞，其包括如請求項 53 或 54 之核酸中之一或多種核酸。

【請求項 59】一種產生蛋白質複合物之方法，該方法包括：

(a) 在足以使如請求項 56 至 58 中任一項之細胞產生該蛋白質複合物之條件下培養該細胞；以及

(b) 收集由該細胞產生之該蛋白質複合物。

【請求項 60】一種蛋白質結合物，其包括如請求項 1 至 52 中任一項之蛋白質複合物，該蛋白質結合物與治療劑共價結合。

【請求項 61】如請求項 60 之蛋白質結合物，其中該治療劑係細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。

【請求項 62】一種治療患有癌症之個體之方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之包括如請求項 1 至 52 中任一項之蛋白質複合物之組合物或如請求項 60 或 61 之蛋白質結合物。

【請求項 63】如請求項 62 之方法，其中該個體具有表現 CD47 及/或 PD-L1

之癌細胞。

【請求項 64】如請求項 62 或 63 之方法，其中該癌症係乳癌、前列腺癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤、間皮瘤、肺癌、卵巢癌、大腸癌、胸膜腫瘤、膠質母細胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宮內膜癌、胃癌、膽管癌、頭頸癌、血癌或其組合。

【請求項 65】一種降低腫瘤生長速率之方法，該方法包括使腫瘤細胞與有效量之包括如請求項 1 至 52 中任一項之蛋白質複合物之組合物或如請求項 60 或 61 之蛋白質結合物接觸。

【請求項 66】一種殺死腫瘤細胞之方法，該方法包括使腫瘤細胞與有效量之包括如請求項 1 至 52 中任一項之蛋白質複合物之組合物或如請求項 60 或 61 之蛋白質結合物接觸。

【請求項 67】一種醫藥組合物，其包括如請求項 1 至 52 中任一項之蛋白質複合物以及藥學上可接受之載劑。

(發明圖式)

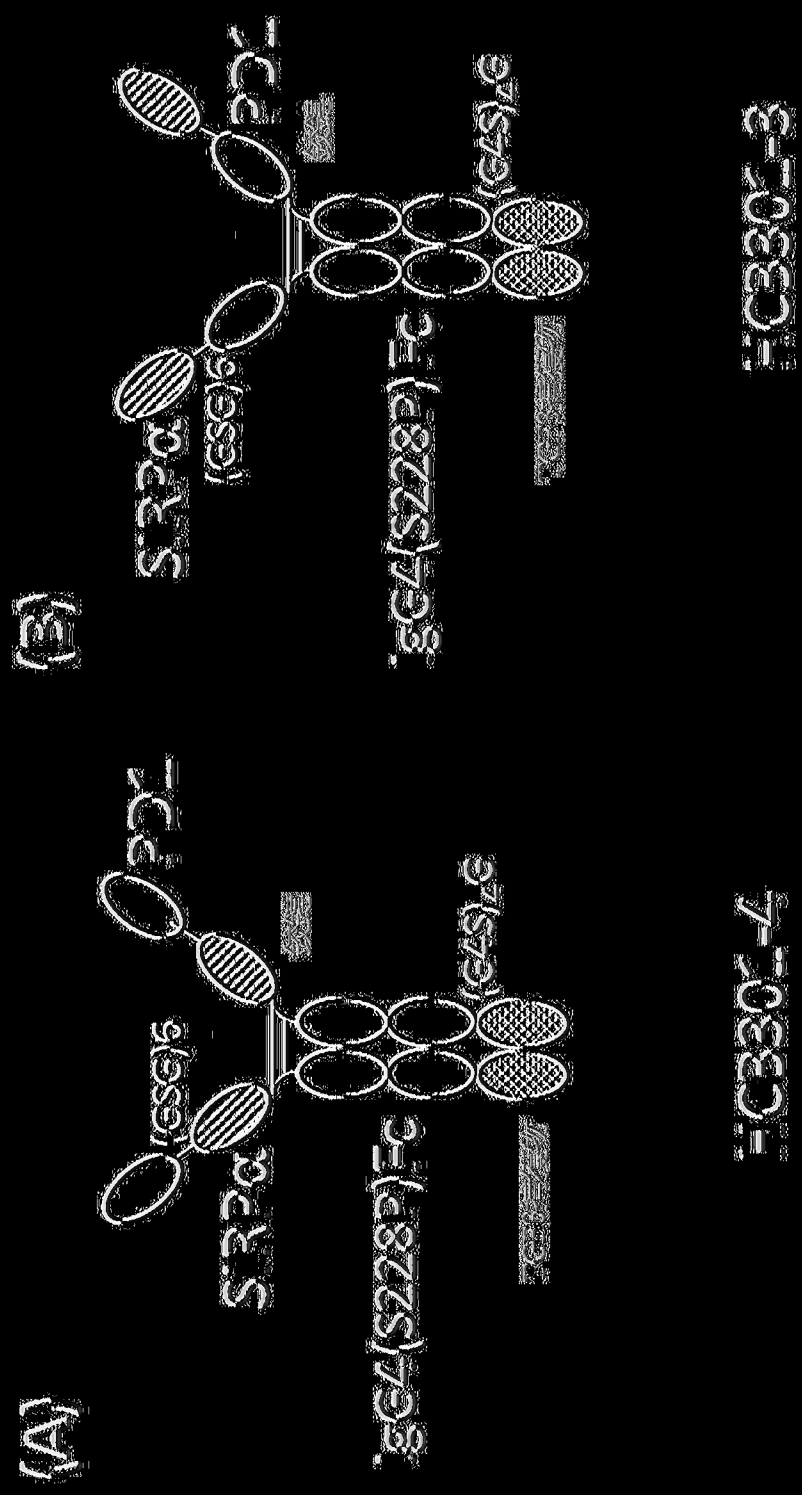


圖 1A-3

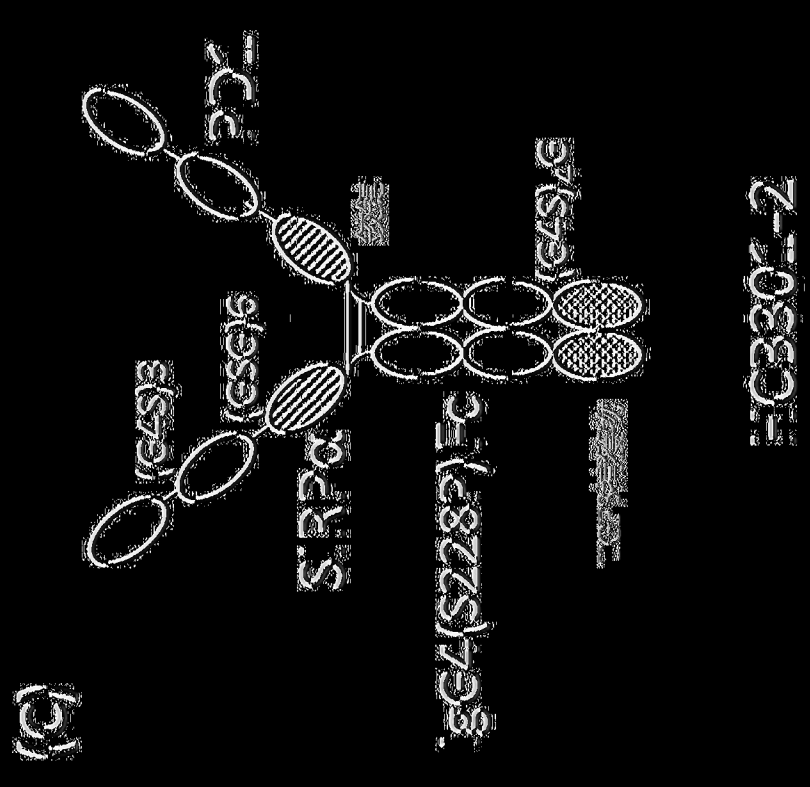
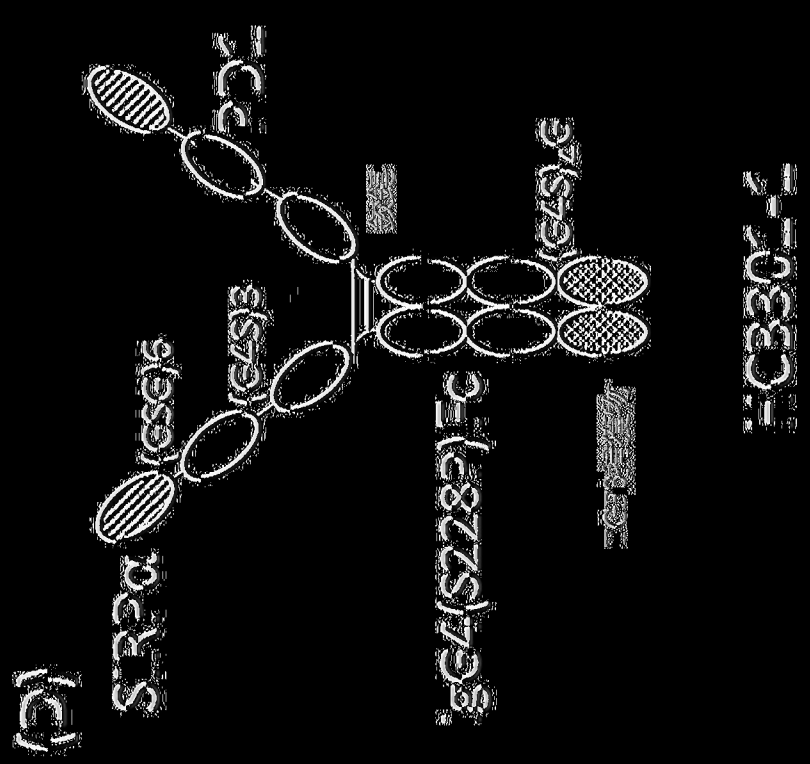


圖 10

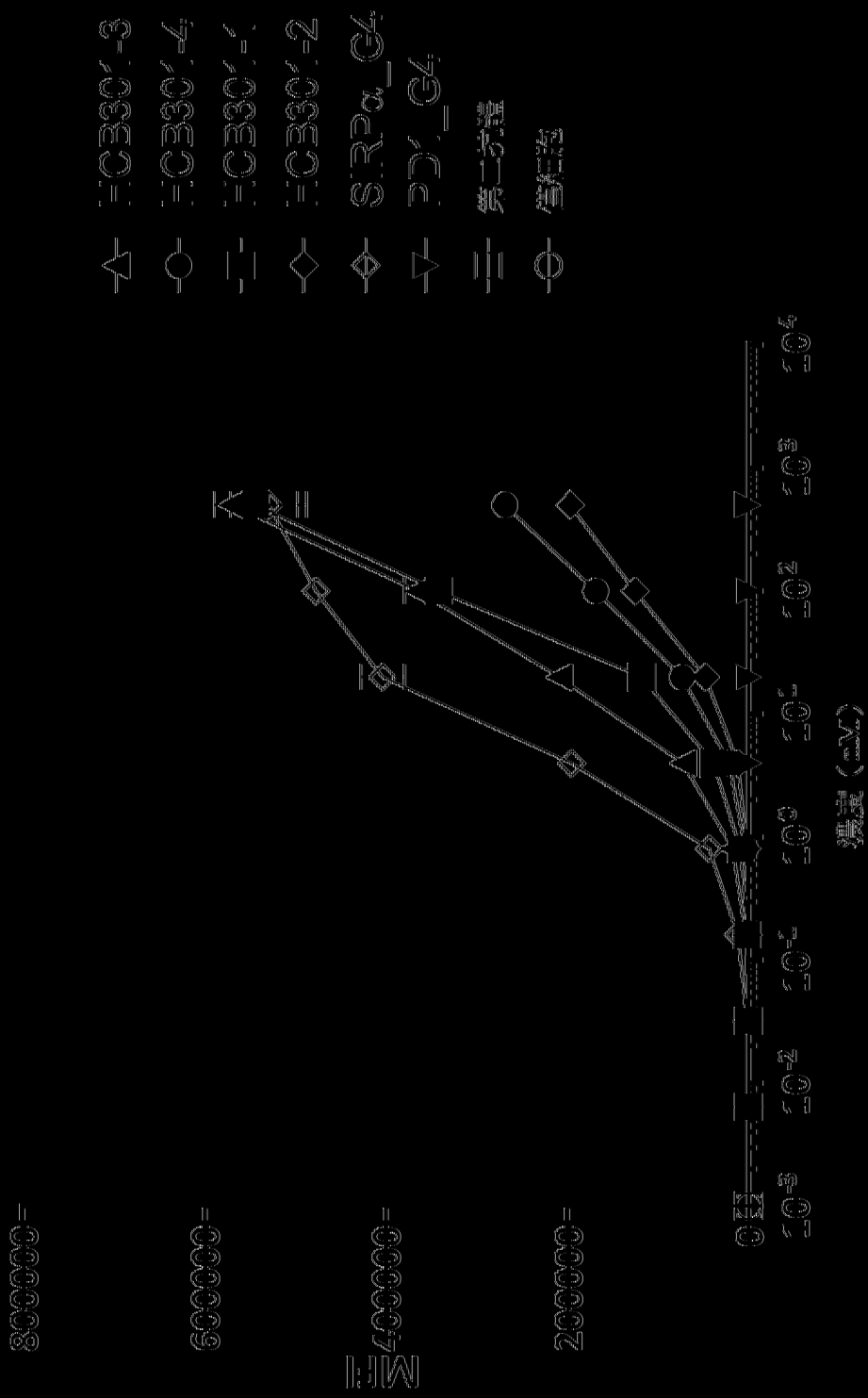
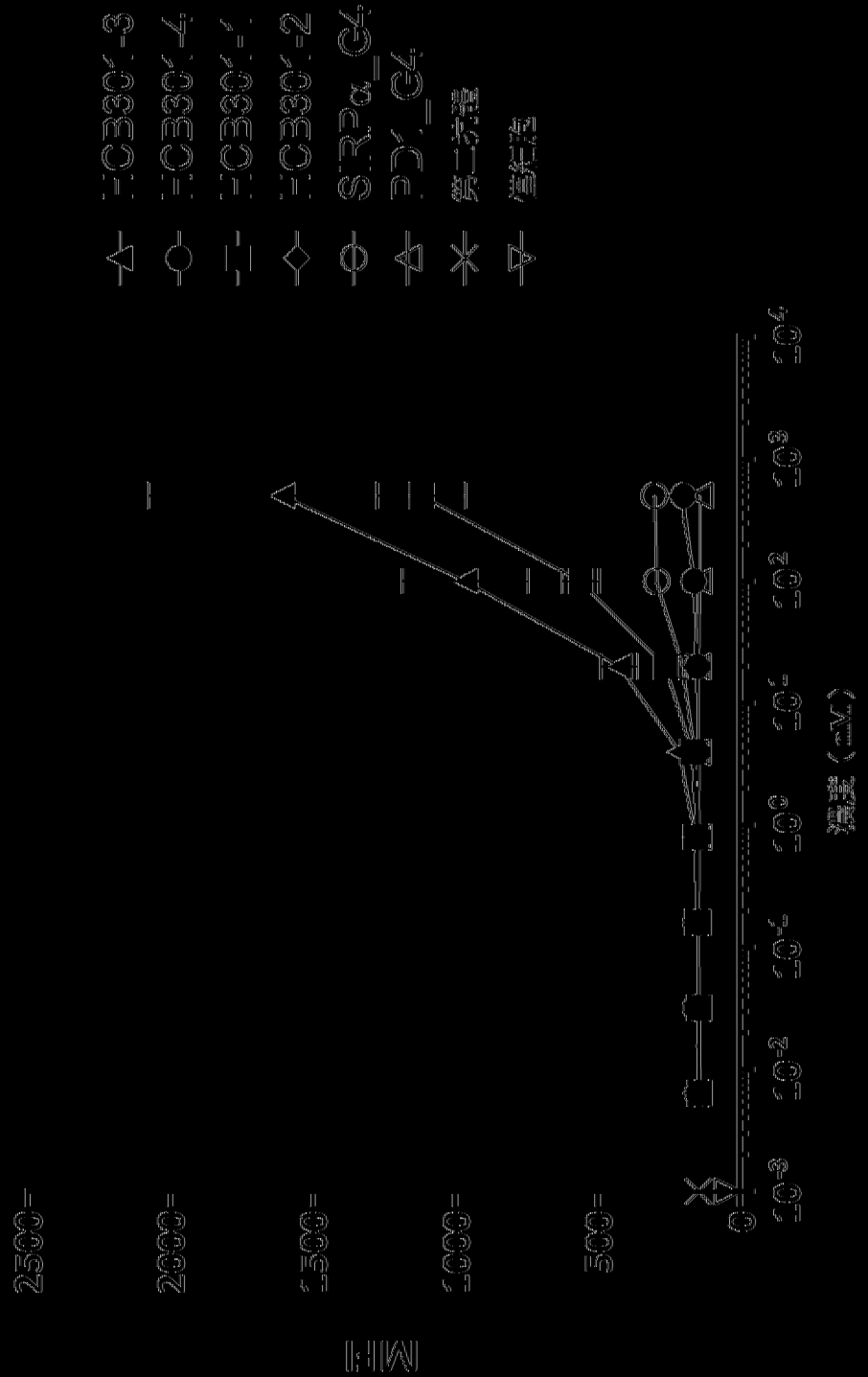


圖2









CS53



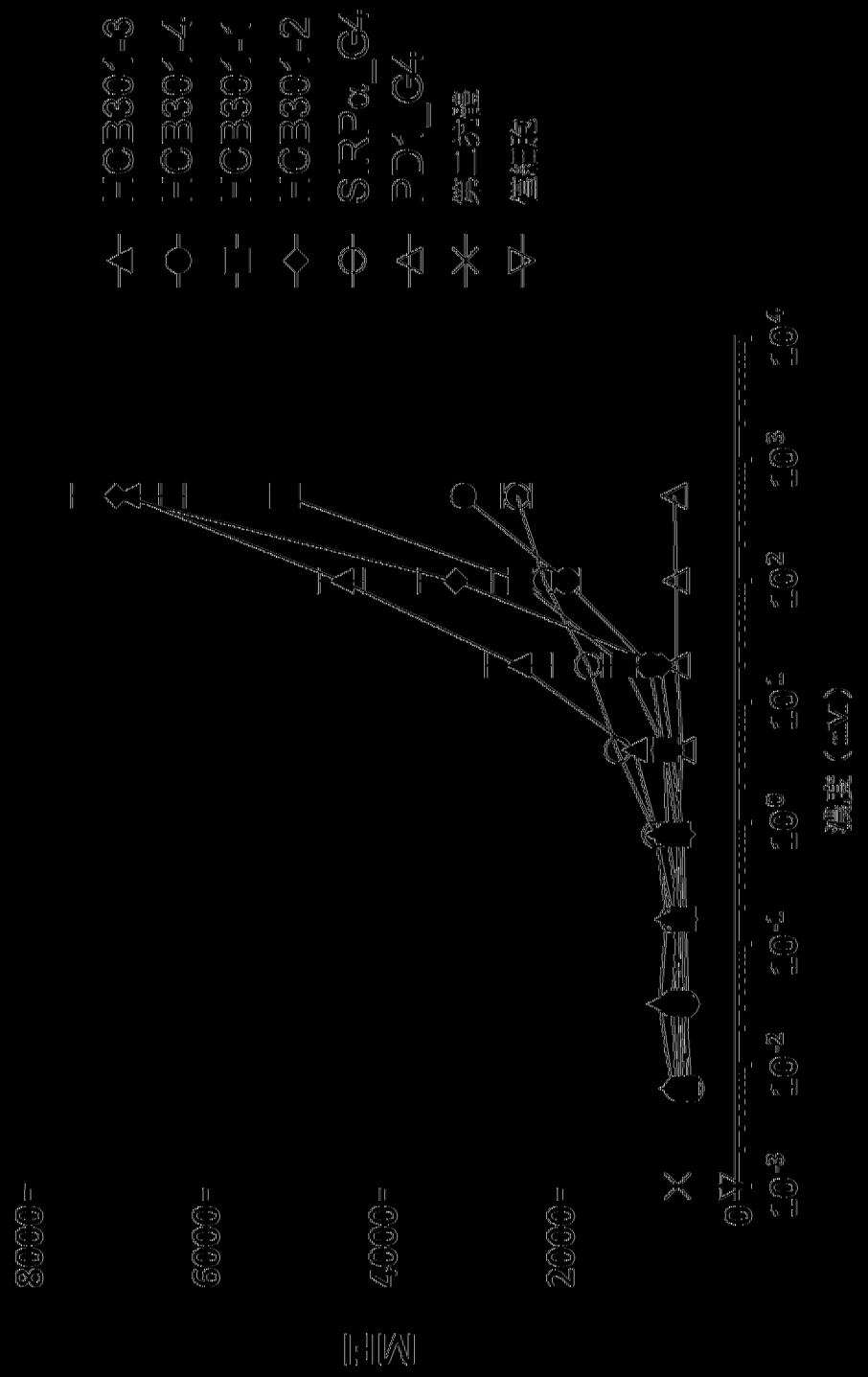
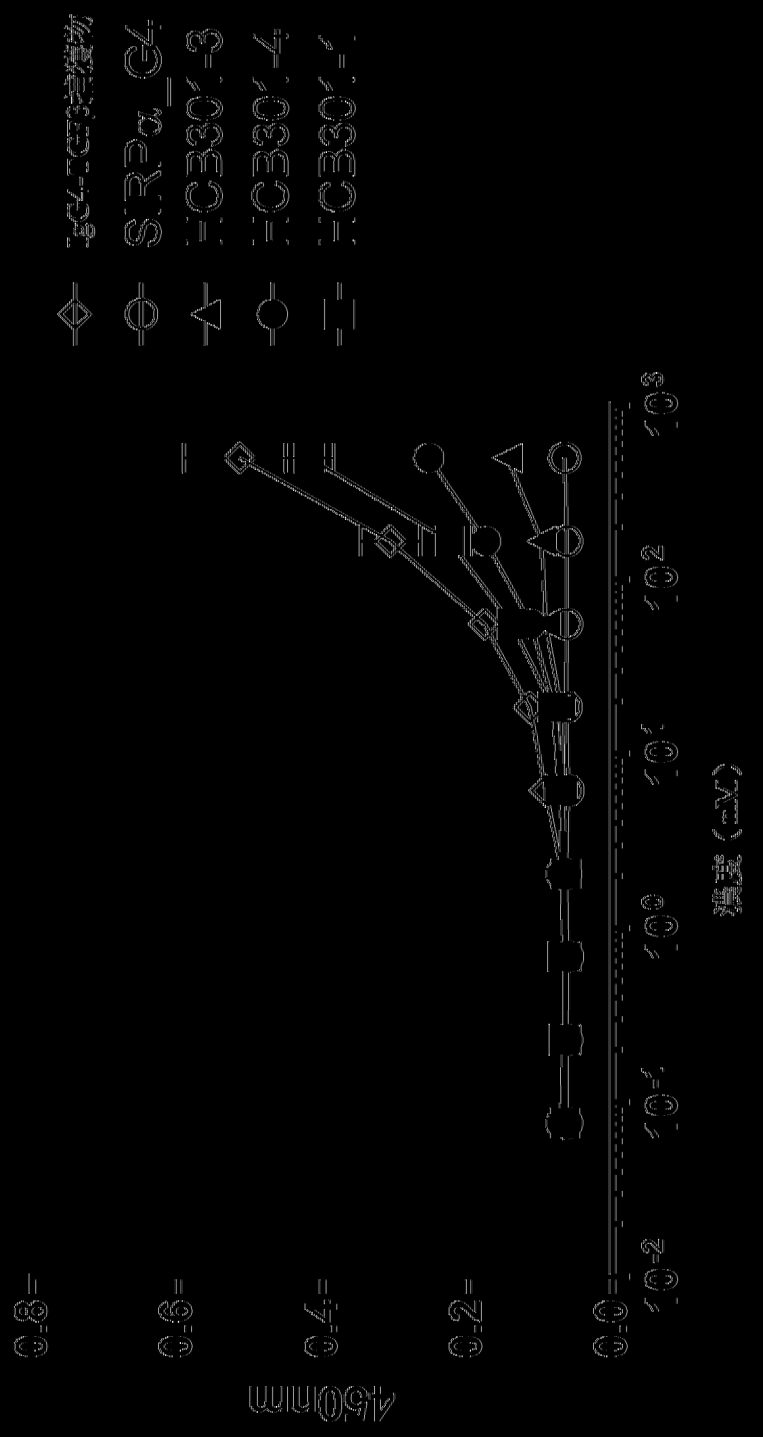


圖 63





齒形	齒形保持物	C330'-3	C330'-4	C330'-5
模數 (mm)	3.3	3.3	3.3	3.3

圖 13





# SIRP $\alpha$ \_G4

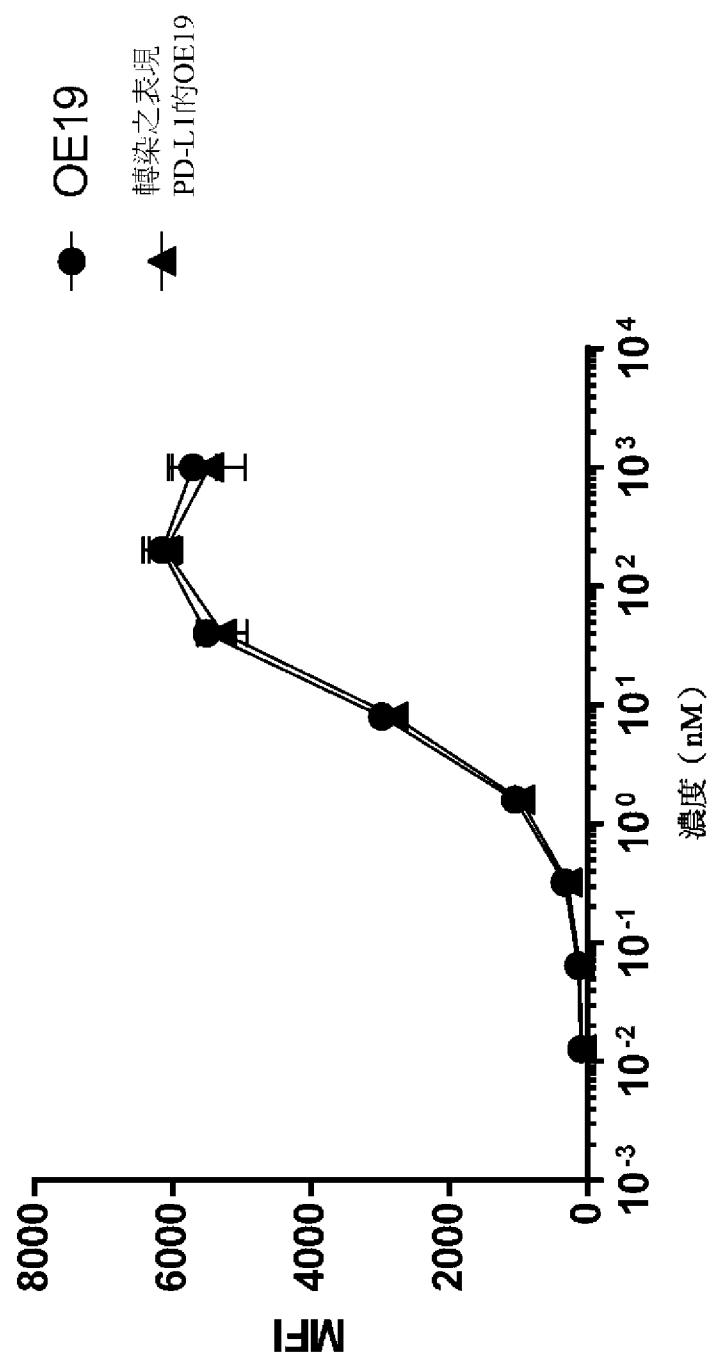


圖8B

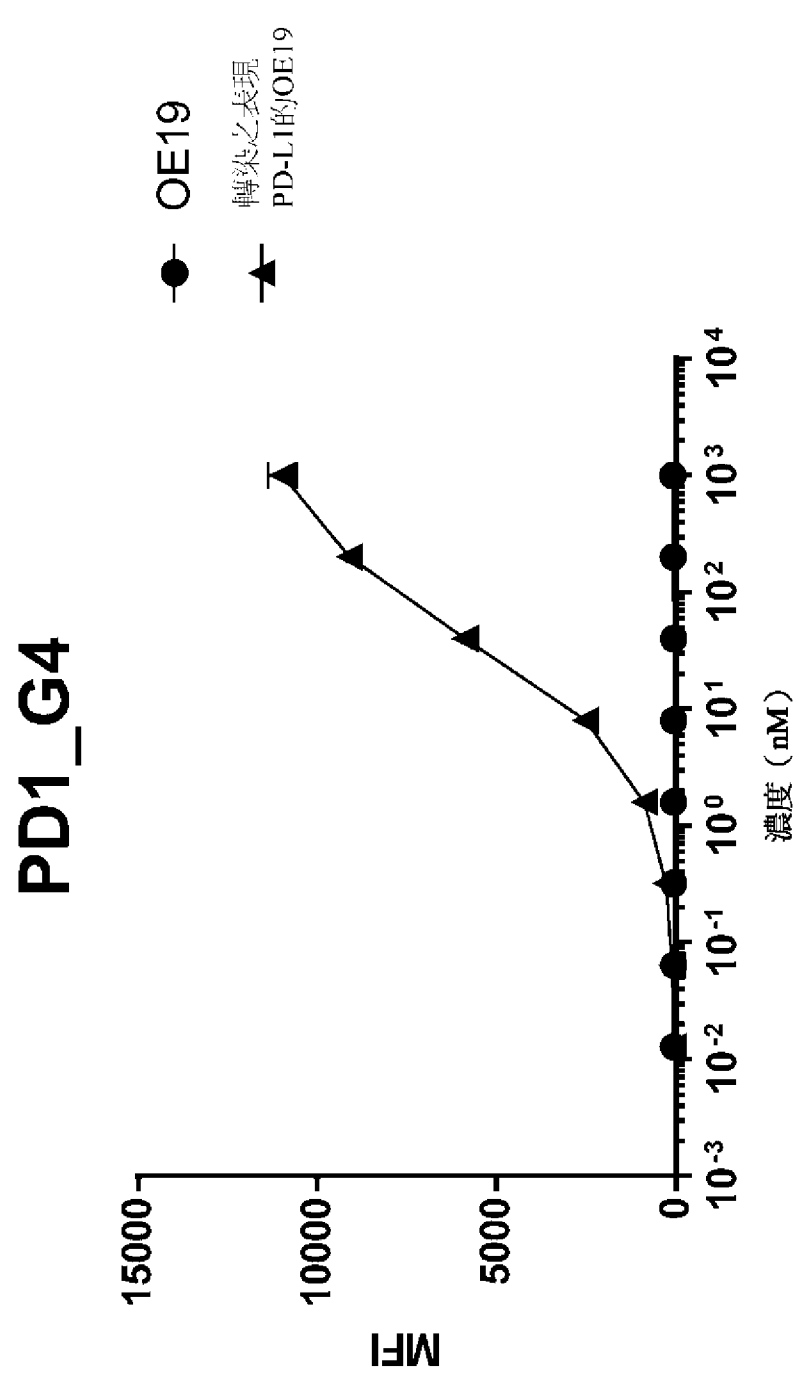


圖8C

# HCB301-3

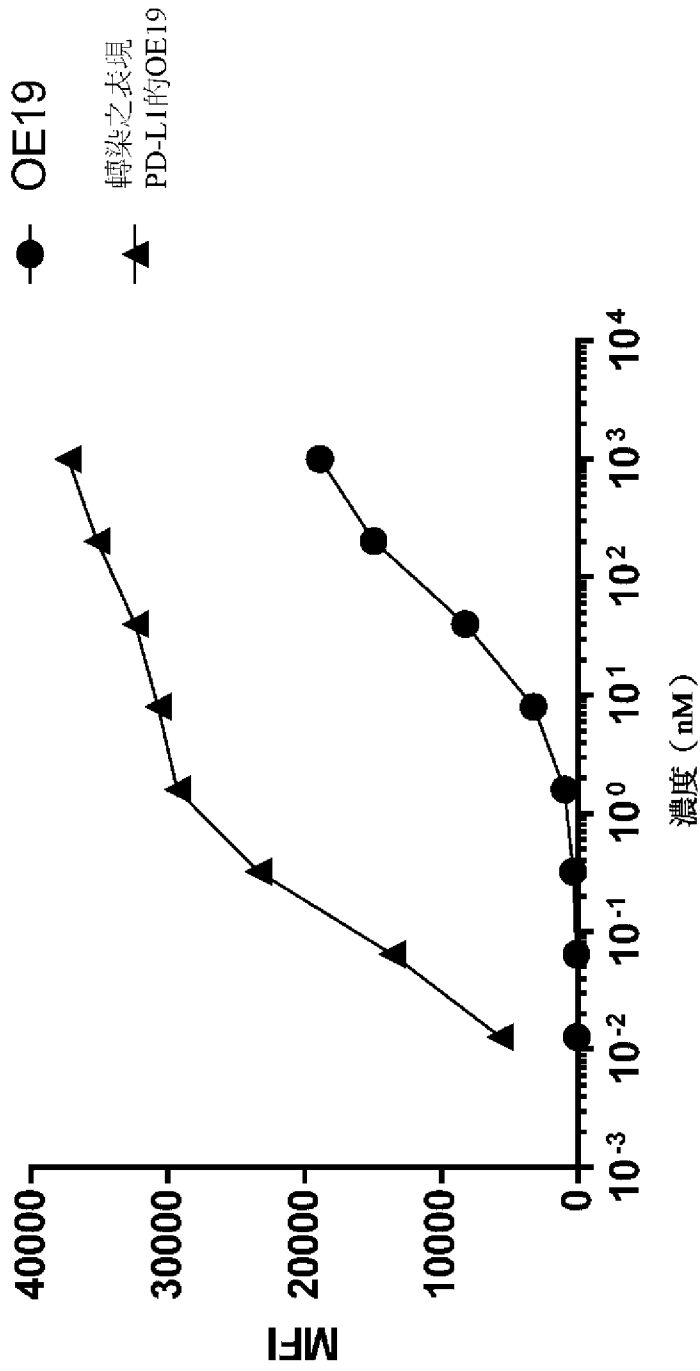


圖8D

# HCB301-4

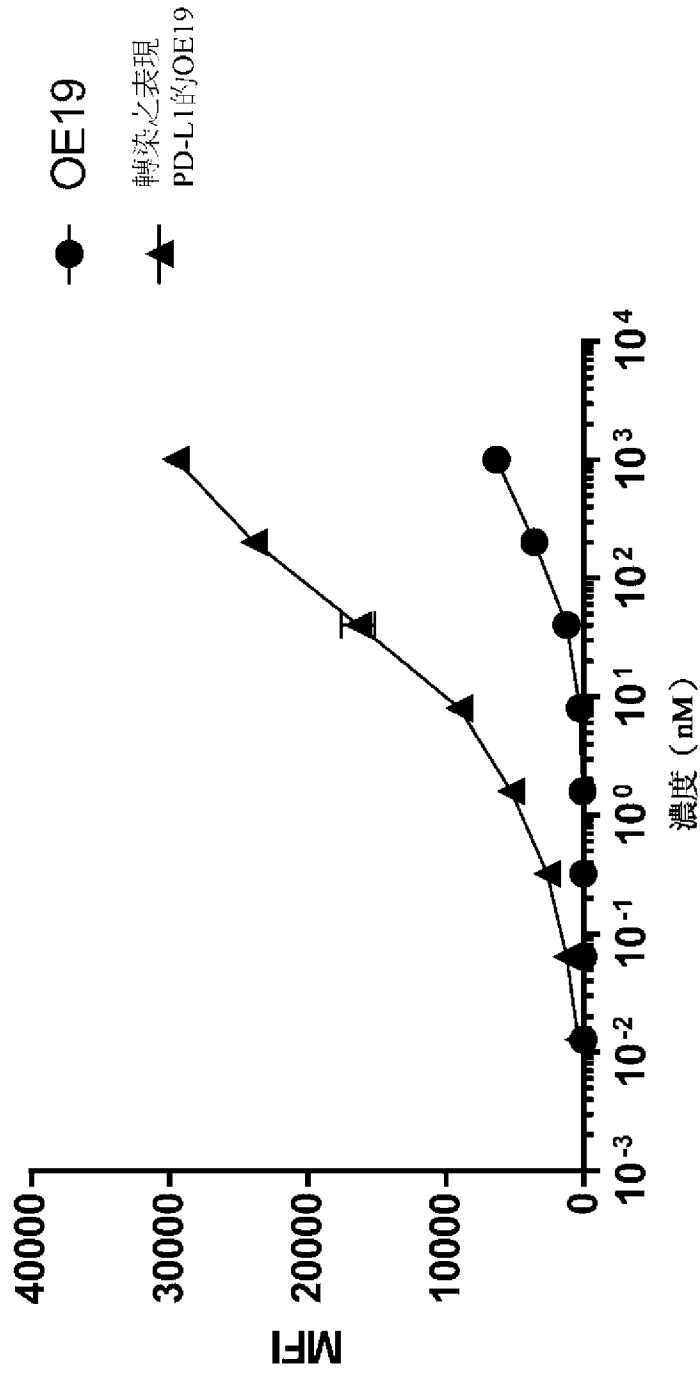


圖8E

# HCB301-1

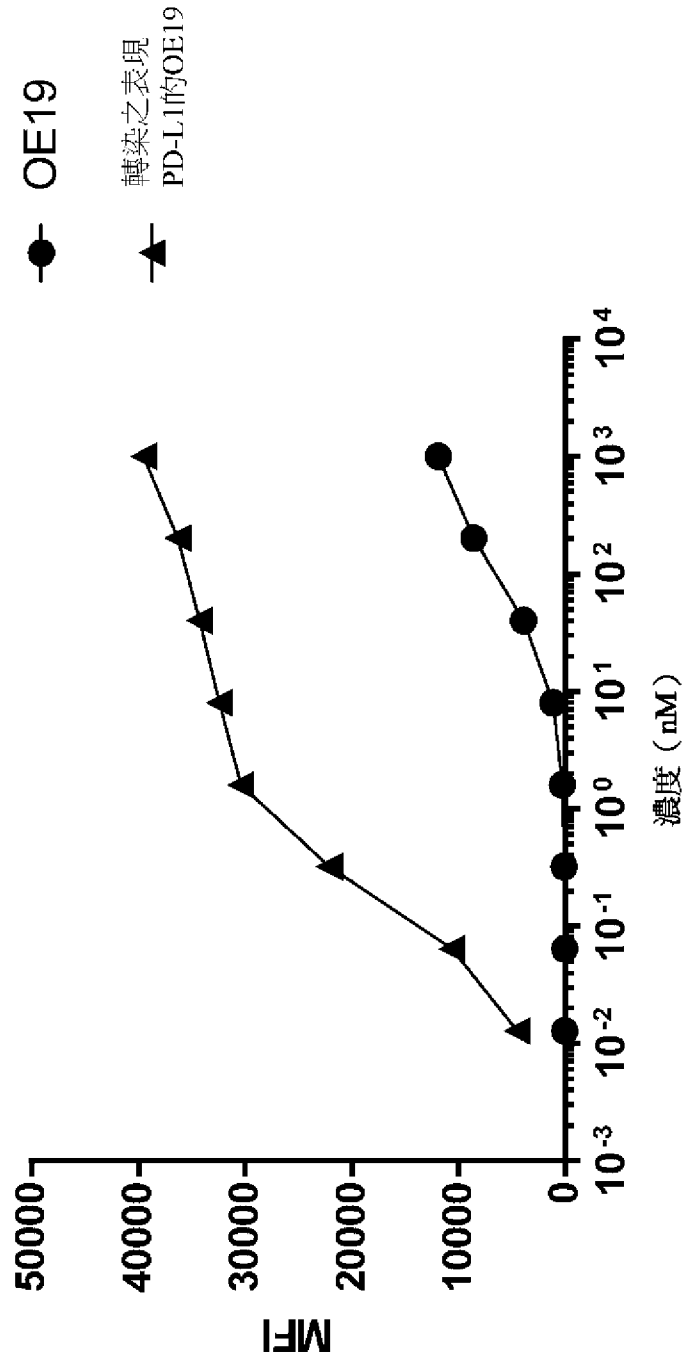


圖 8F

# HCB301-2

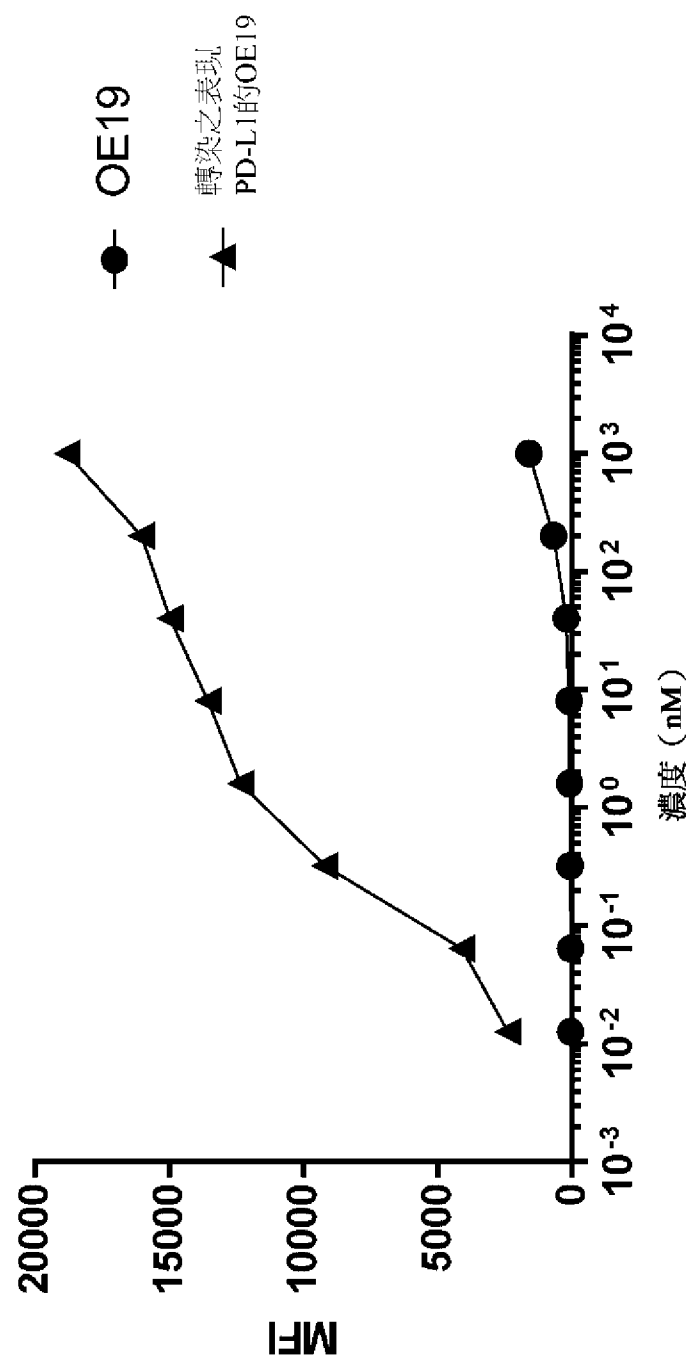
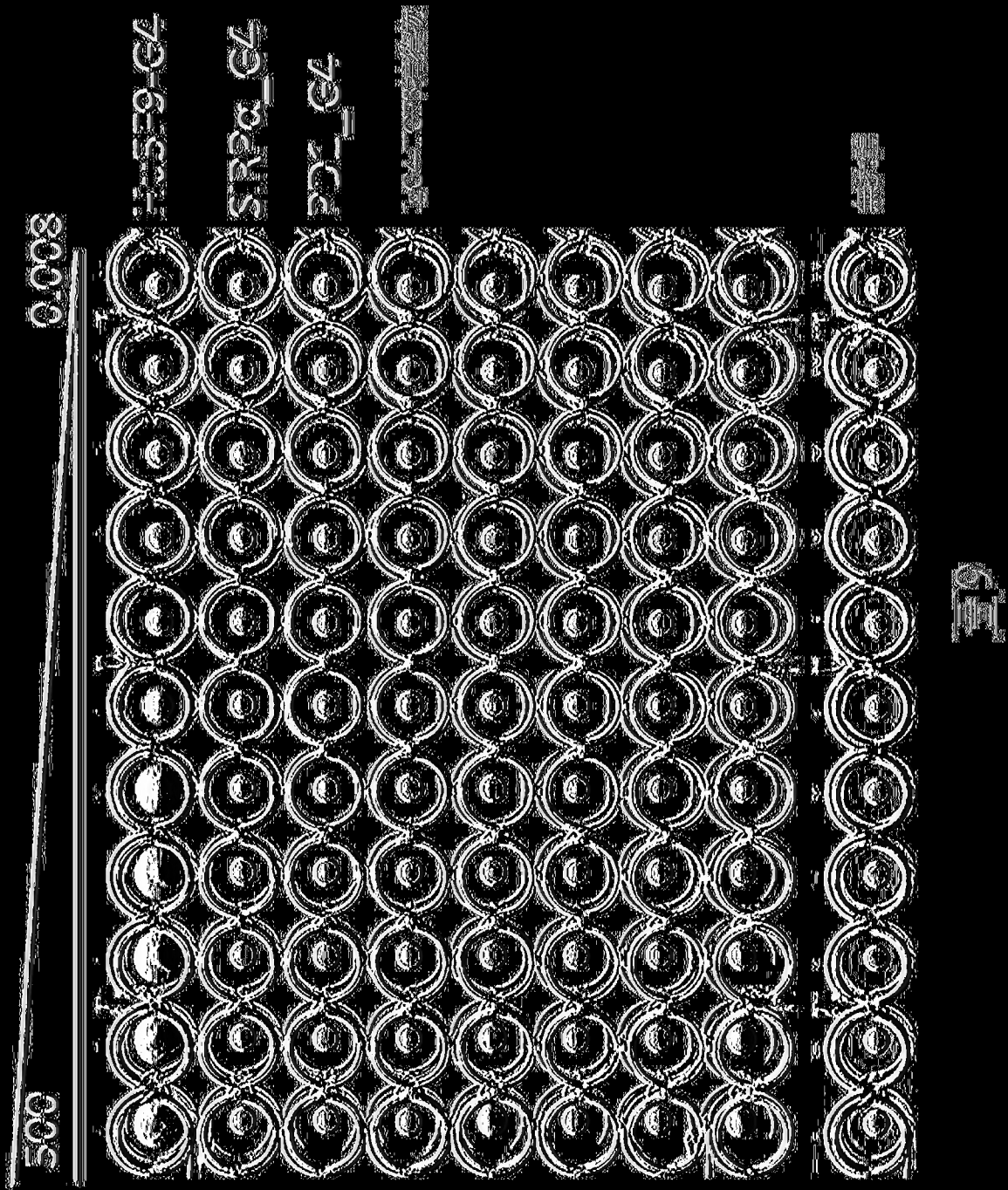
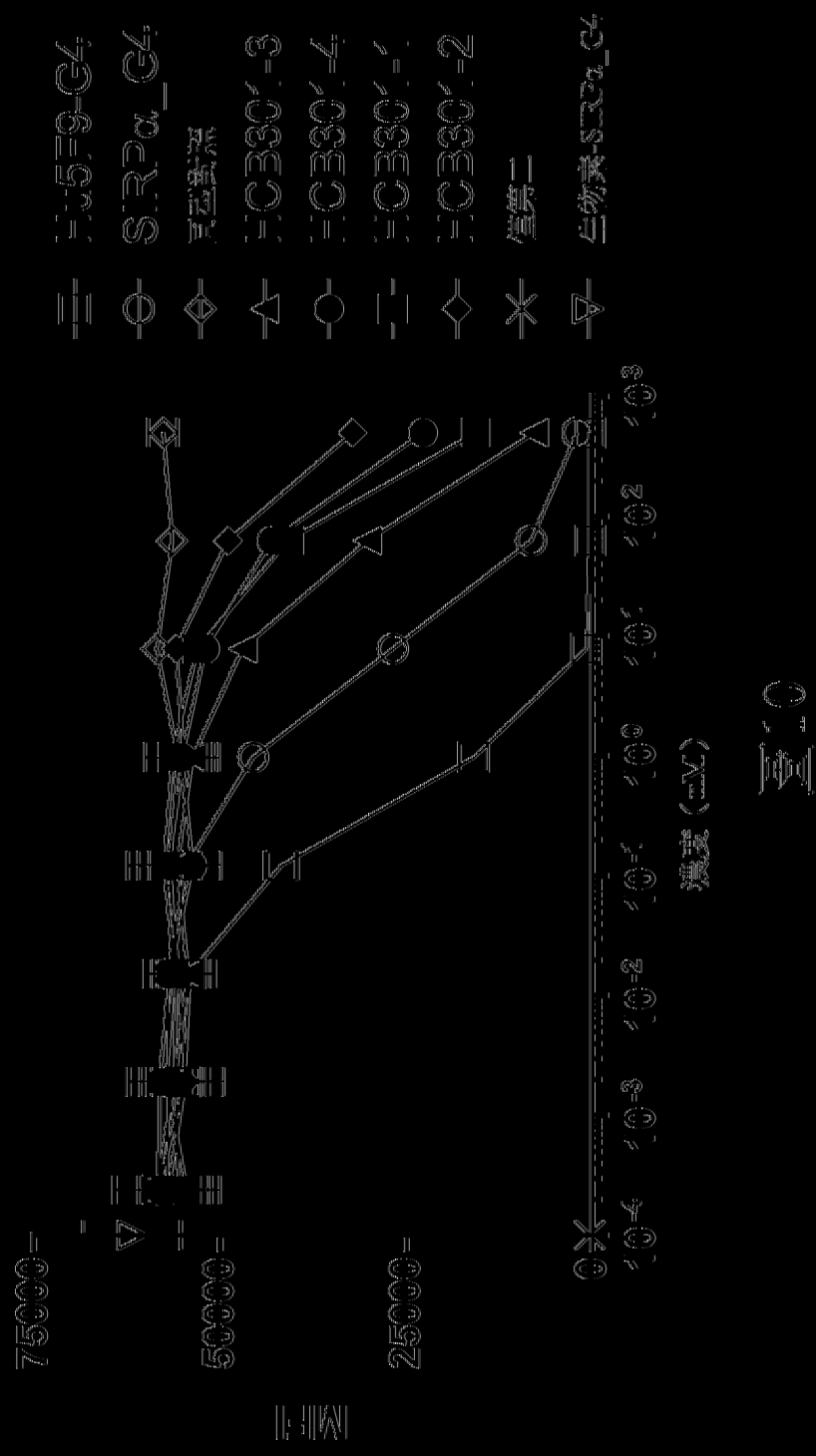


圖8G





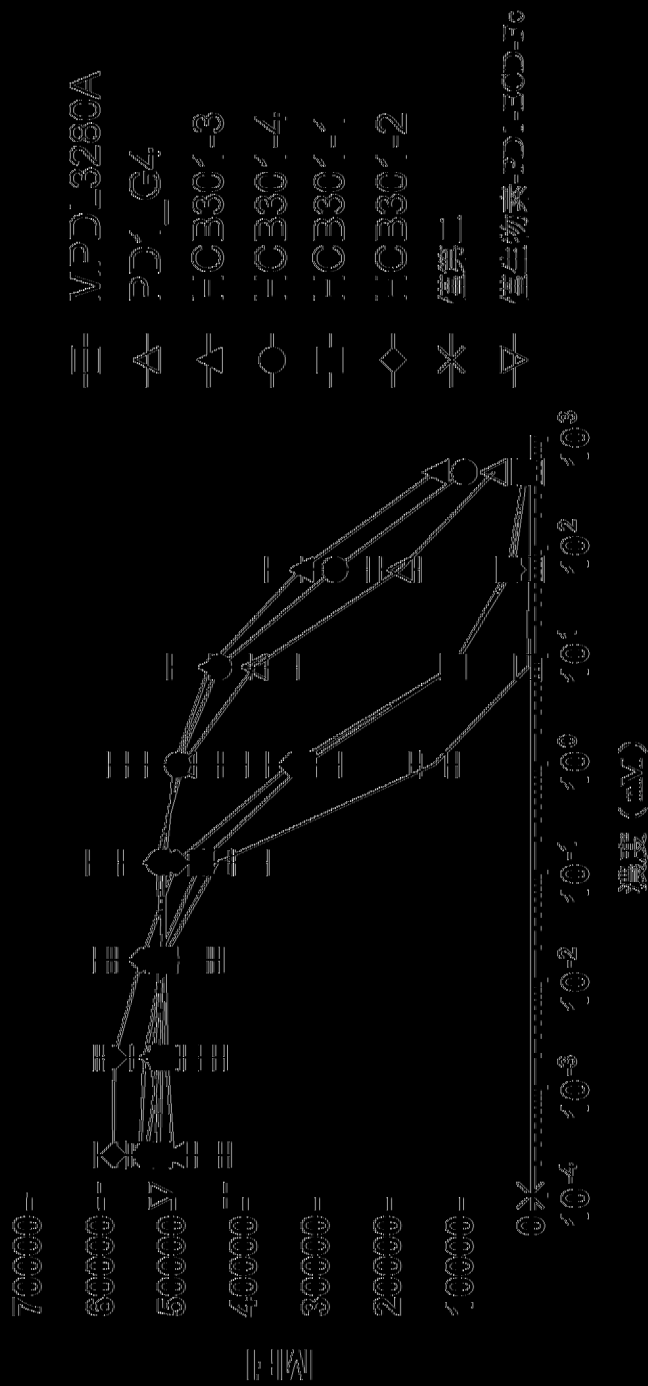
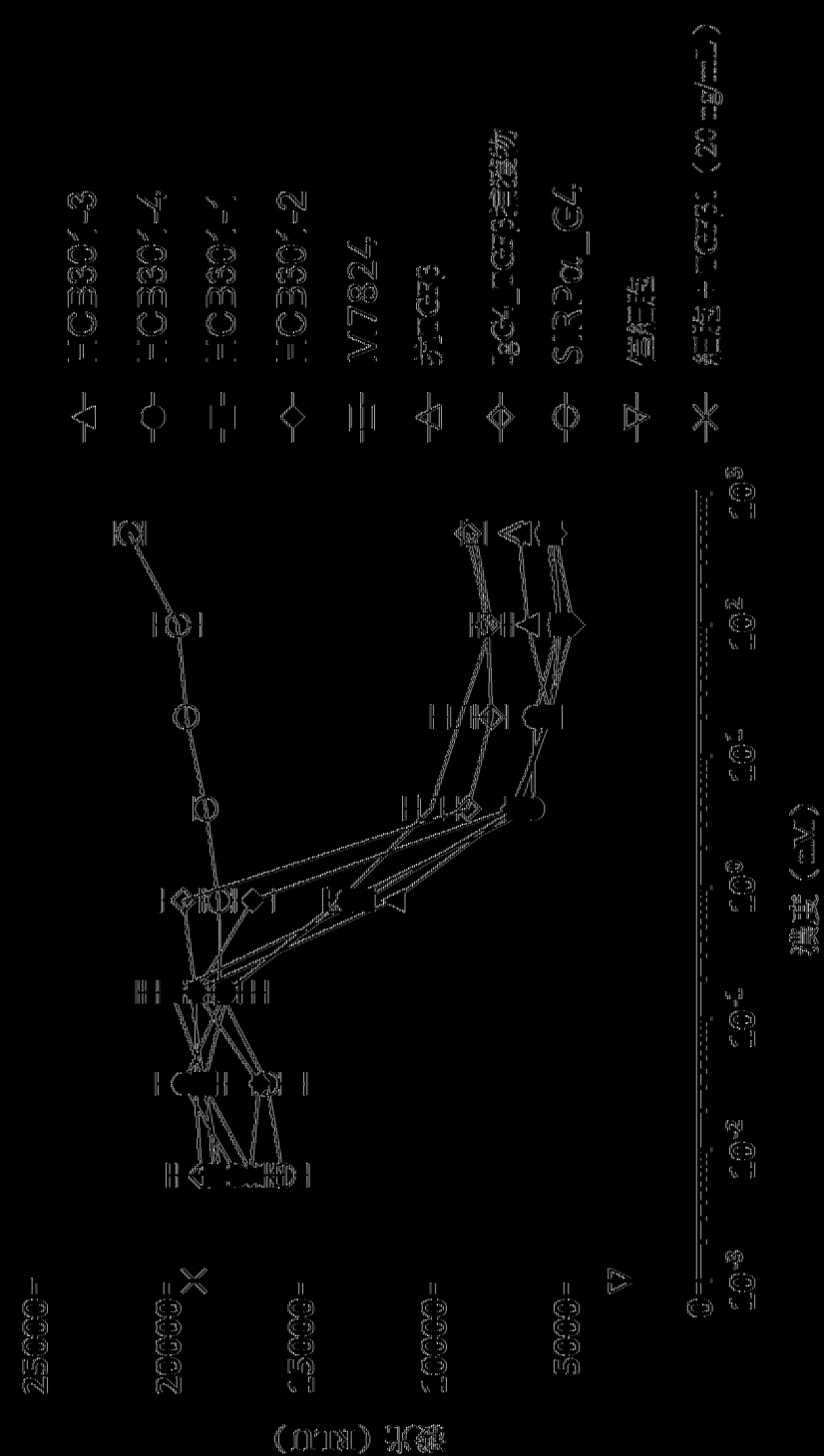


圖 3



### 圖 2A

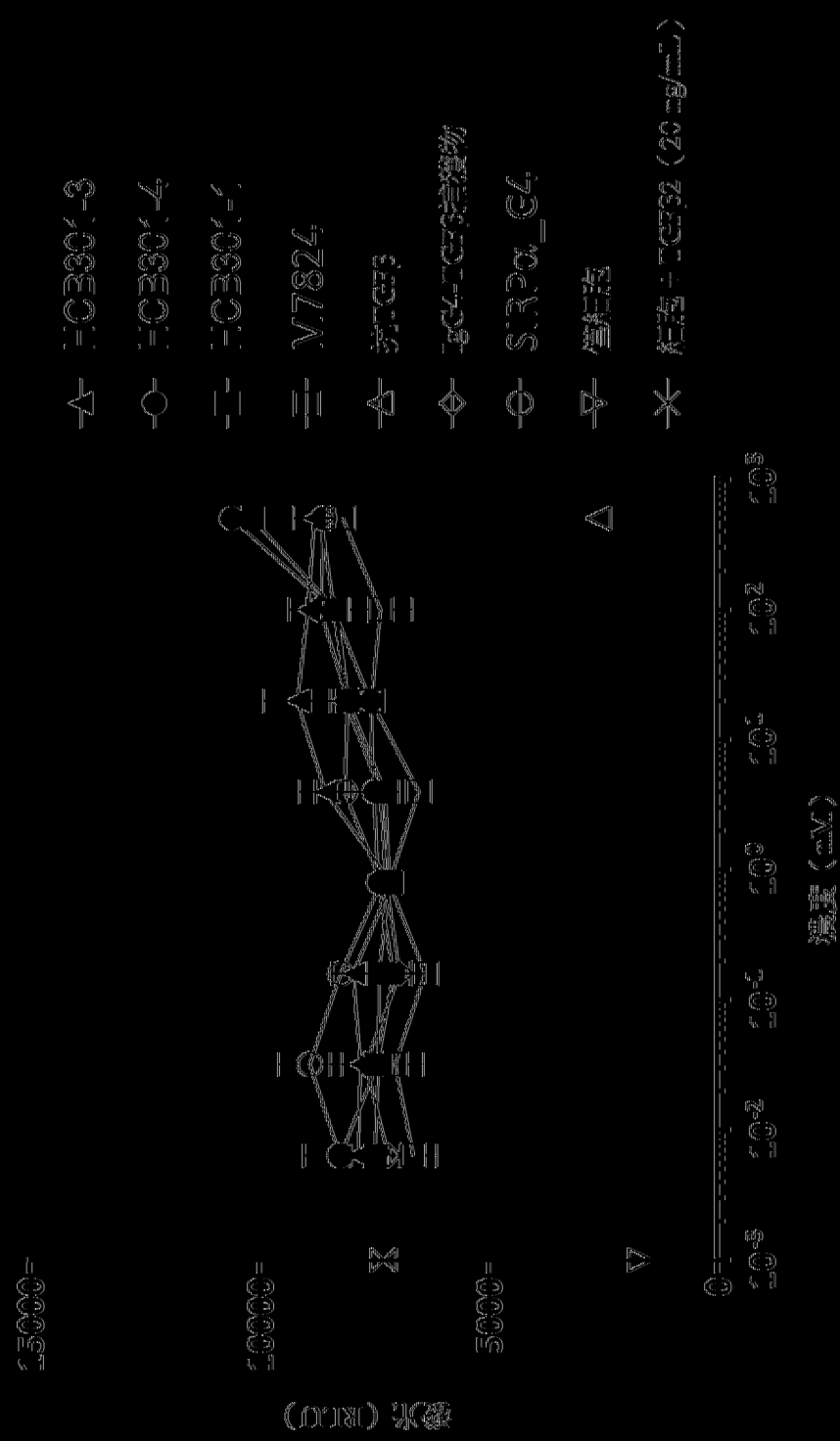


圖 23

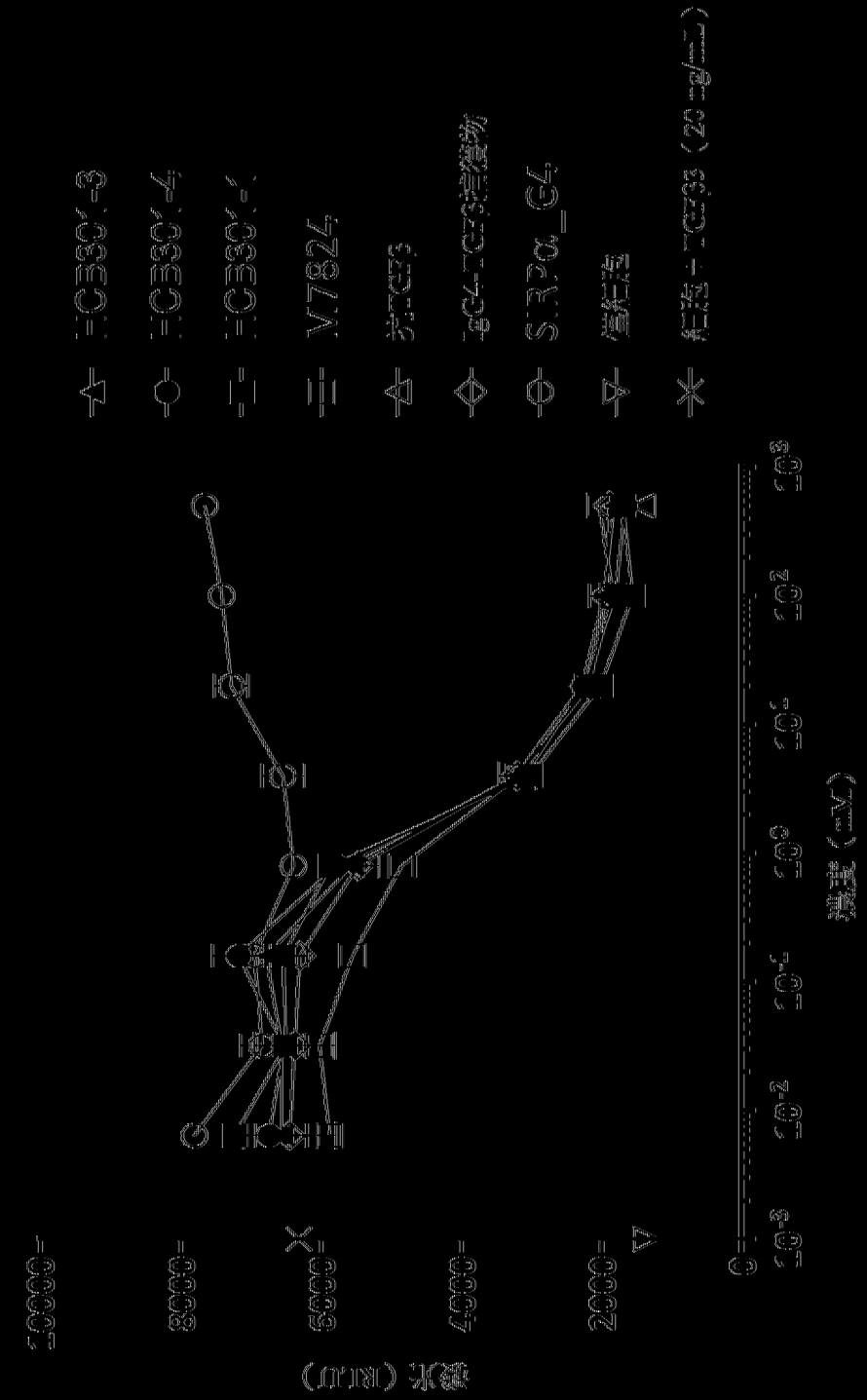


圖 20

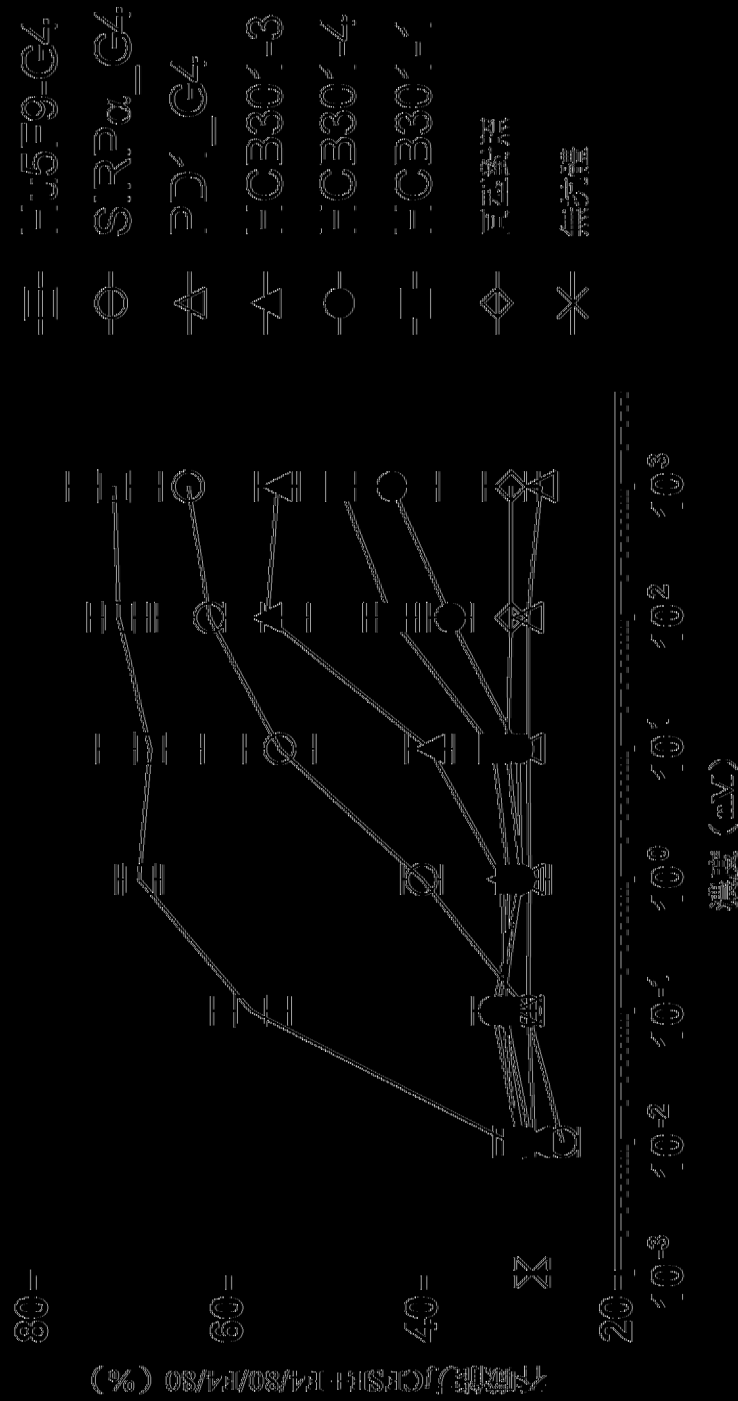



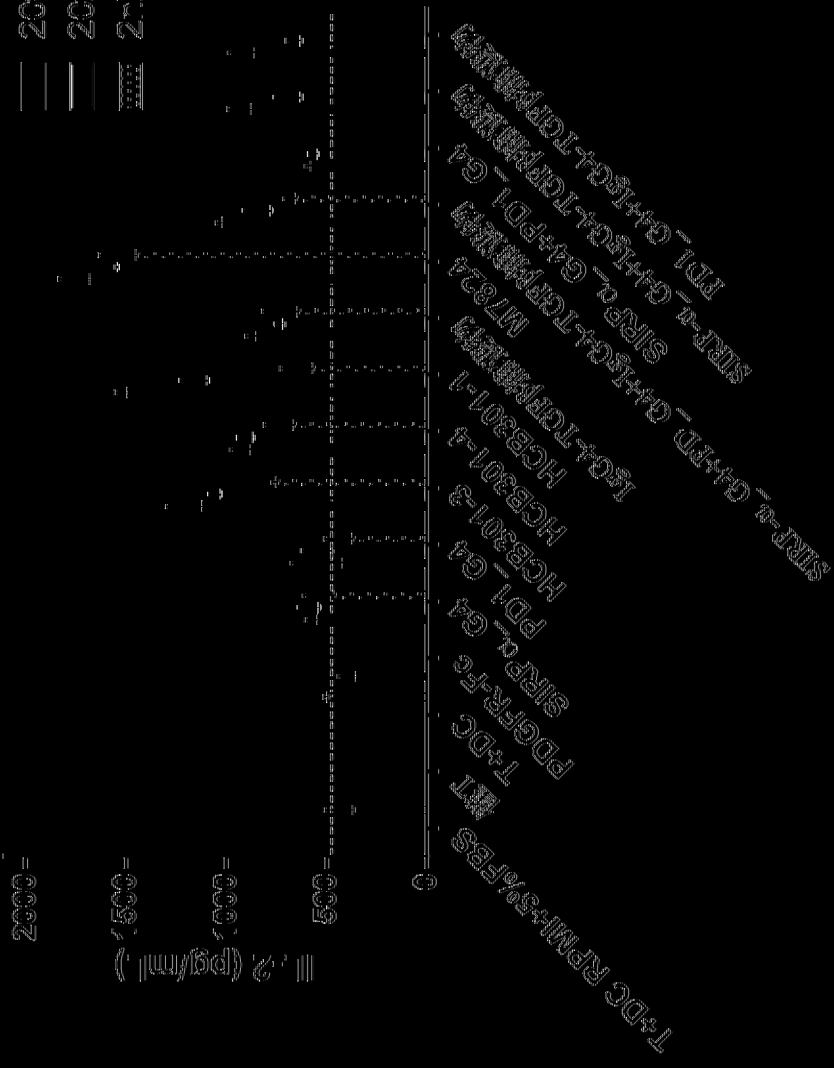


圖 3



流速設定：0.2分/秒

 200mV  
 20mV  
 2mV



2-DC含有G33.1之液作濃度量 (液言NO.2555015)

圖 43

圖 13: 電壓掃描

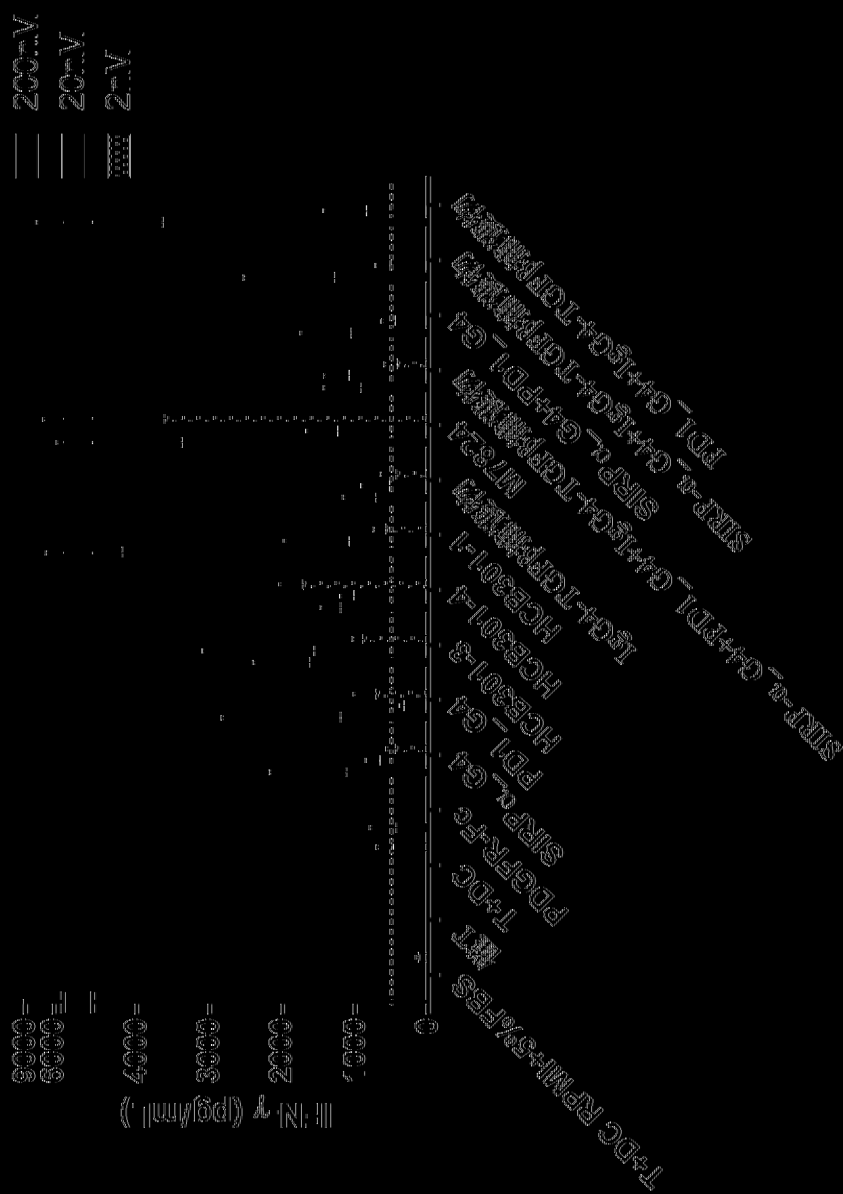


圖 13: 電壓掃描 (取自圖 11: 650-750)

0.7. 圖

	W0900C-1	W0900C-2	W0900C-3	W0900C-4	W0900C-5	W0900C-6	W0900C-7	W0900C-8	W0900C-9
PD-L1E	1.9	198.9	1.4	89.2%	n.d.	27.7	n.d.	n.d.	n.d.
CD47-CH0-8	++	+++	+	++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	++++
W0900C-1	95.96	30.36	n.d.	982.70	5.20	n.d.	n.d.	n.d.	0.0%
W0900C-2	135.9	48.79	n.d.	196.20	12.98	n.d.	n.d.	n.d.	0.03
W0900C-3	++	+++	n.d.	++	+++	-	n.d.	n.d.	++++
W0900C-4	48.50	55.02	n.d.	43.2%	94.20	n.d.	n.d.	n.d.	71.98
W0900C-5	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	++++
W0900C-6	0.84	0.78	2.18	0.97	n.d.	n.d.	2.94	0.9%	n.d.
W0900C-7	-	-	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-
W0900C-8	2.06	1.86	n.d.	2.00	-	n.d.	2.08	1.95	n.d.

W0900C-5A







入\$R2\_04之數書檢査序列 (SEQ ID NO: 11)  
 YQPPQAPWVWAVALQCGRRPQWFJDSPPDRPWNPFFSPALVWEGDAVAFCCSFSNFSSESFVLAWRVSPSNQFDKLAAPFEDRSQP  
 GQDCRFVTCIPXERCFEYSVWRARRVDSGTCCGALSPAKAQCKESRAELRVERRAEVPTAEPS6PRPAGQFQIIWGVVGGI  
 GSVLVVAVCGSRAARGTCARRCGQPKEDPSAVVFSVDYGEEDQWRREKPEPPVPOVPEQIEVALVFPSCVGTSSPARGS  
 ADGPRSAQPIRPEQCGSWP

入\$R2\_04之數書檢査序列AAEZ6692.. (SEQ ID NO: 12)  
 YEPAGPAGRLGPIICIIAASCAMSGVAGEEIQVLPQDKSVVAAGESALIECTVSEIIPVGPQWFRGAGPARZIIYNQKZGHEPFR  
 VTFVSEIKRENVDISLSNIPADAGTYCVKFRKGSPIEFKSGAGIISVRAKPSAPVWSGPAARAIPQETV8FTCESEHGFSPRO  
 IIEKWFVAVGVELSDFQNVDFVGESVSYSESTAKWTREREDVESQVCEVAEVTEGDPPIRGTAIISFTTRVPTIEVTCQPVRAEIQ  
 VVTCQVRKFEYPRQLQEWLEAVSRTEHASTVEIXXQGYWMSWLVNVSARQDVKLECCQVEEDCGQPAVSKSDEIKVSAEFPKQG  
 SNTAAENTGSNERNTYVGVVCTIIVALLVAAIYVTRRQKKAQGSISSTRLEPEKVAEIQVQSLDITADITYADLACPKGKRPAP  
 QAAEPANHEEYASIQISPPQASEDITTYADLDVHELRIPKQAPAPKPEPSISEEYASVQVPRK

入\$R2\_04之數書檢査序列NP\_003255.4 (SEQ ID NO: 13)  
 YKRGLEIRGFWPHEWVWRIASIIPPEVQKSNVDVIVDANGAVKFPQICKFCQVRFSTCDXQKSCYSAKCSISICEKPOEVCVAVWR  
 KVDENIEEIVCHEDPKLPYEDFIEEAAASPKCIKFKKXGPEFTYKCSGSDGKDNIFSEENVTSNPDHEEVFQVFGESLPPLEGV  
 ALSVTEFYCYRVARQKLSSTWEGVTRKLVSESECAIEEDRSDISSICAINVENVHELPLEDDTEVQKGRFAEIVYAKKLAQNT  
 SIQFEIVAVKLPVEEYASAKTEKCIISDIALKEINLQETAEERKTEICKQWTEIATFAKGNQEVTRREVI6MEDIKL6SSLAR  
 GFAHESSDHPCGRPKVPVERQKSSNLEVKADIECCQCFGLSRIDPTLSVDDLANSQOVGTALVVAPEVLESAVLEAVESYKQI  
 DVYSVALVWEVTSRQNAVGEVKQYEPPTFGSKVREPPQVESYKQNVLRQRGRPEI98FWLAEQEQVQCEIIECWDDEDPEARLTAQCV  
 AERFSELEHIDRISGRSCSEEKPEDCSLNTEK

\$R2\_04之數書檢査序列 (SEQ ID NO: 14)  
 EEEIQVTPQDKSVSVVAAGESALIECTVSEIIPVGPQWFRGAGPARZIIYNQKZGHEPFRVTVSESTKREAVDFSL6ISNTDPALAGTY  
 YGVKERKGSPTDEEKSCAGTEISVRAKPSSESKYCPQPCQAPAEIIGCPSVTEPPKPKQDILVTSRTPPEVTCVWVQVSVQEDPEVQFVWY  
 VCGVEVAATKAPREEQFNSIVRVVSVLVHQDMLNGKEYKCVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRIPQVYVLP26QEEVTKQVSLTC  
 EVKGFYPSDIAVEHEISN6QPEANVYKTEPPVLDSDG6FTFY6RLIVDKSNQZGAVT6CSVYHEALHNHYVTKSLSLSLCK

入\$R2\_04之數書檢査序列 (SEQ ID NO: 15)  
 DSDPDRPWNPFFSPALVWEGDAVAFCCSFSNFSSESFVLAWRVSPSNQFDKLAAPFEDRSQPQDCRFVTCIPXERCFEYSVWRARRVDSGTCCGALSPAKAQCKESRAELRVERRAEVPTAEPS6PRPAGQFQIIWGVVGGI  
 GQDCRFVTCIPXERCFEYSVWRARRVDSGTCCGALSPAKAQCKESRAELRVERRAEVPTAEPS6PRPAGQFQIIWGVVGGI  
 GSVLVVAVCGSRAARGTCARRCGQPKEDPSAVVFSVDYGEEDQWRREKPEPPVPOVPEQIEVALVFPSCVGTSSPARGS  
 ADGPRSAQPIRPEQCGSWP



