202321458

(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 202321458 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：111135598 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 09 月 20 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/86 (2006.01)* *C12N15/13 (2006.01)*
C07K16/18 (2006.01) *A61K39/395 (2006.01)*
C07K16/46 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/09/22 歐洲專利局 21306310.0
2022/01/18 歐洲專利局 22305050.1

(71)申請人：瑞典商生物創新國際公司 (瑞典) BIOINVENT INTERNATIONAL AB (SE)
瑞典
法商傳斯堅公司 (法國) TRANSGENE SA (FR)
法國

(72)發明人：弗倫迪烏斯 比約恩 FRENDEUS, BJORN (SE)；雷恩 瑪蒂爾達 REHN, MATHILDA (SE)；塞姆李奇 莫妮卡 SEMMRICH, MONIKA (DE)；馬坦森 琳達 MARTENSSON, LINDA (SE)；馬爾尚 尚 巴蒂斯特 MARCHAND, JEAN-BAPTISTE (FR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：14 共 232 頁

(54)名稱

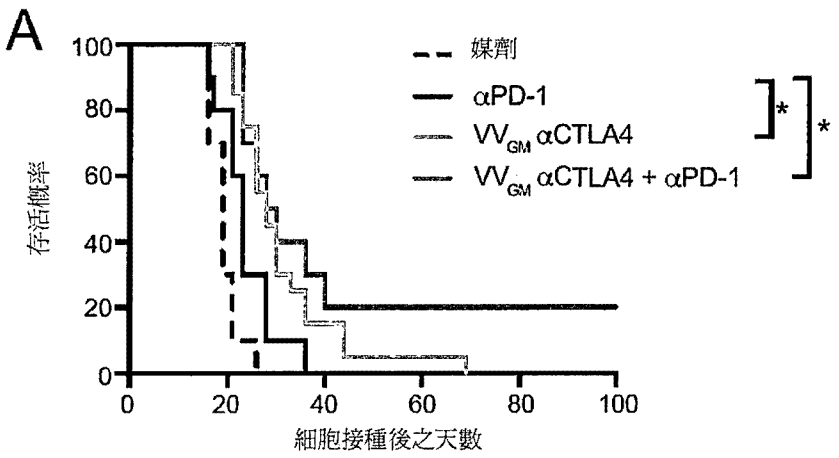
新穎抗體組合及其用途

(57)摘要

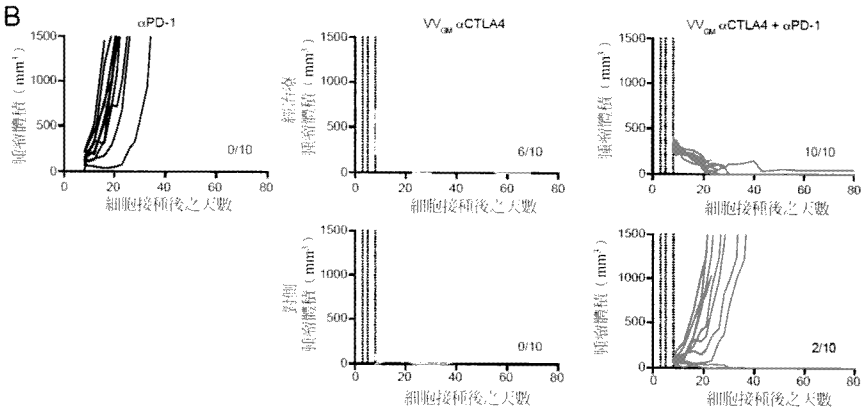
本發明大體上關於一種能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒及特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子之組合；及其在癌症治療中之用途。

The present invention generally relates to a combination of an oncolytic virus capable of expressing a first antibody molecule that specifically binds to CTLA-4; and a second antibody molecule that specifically binds to PD-1 and/or PD-L1 and uses thereof in the treatment of cancer.

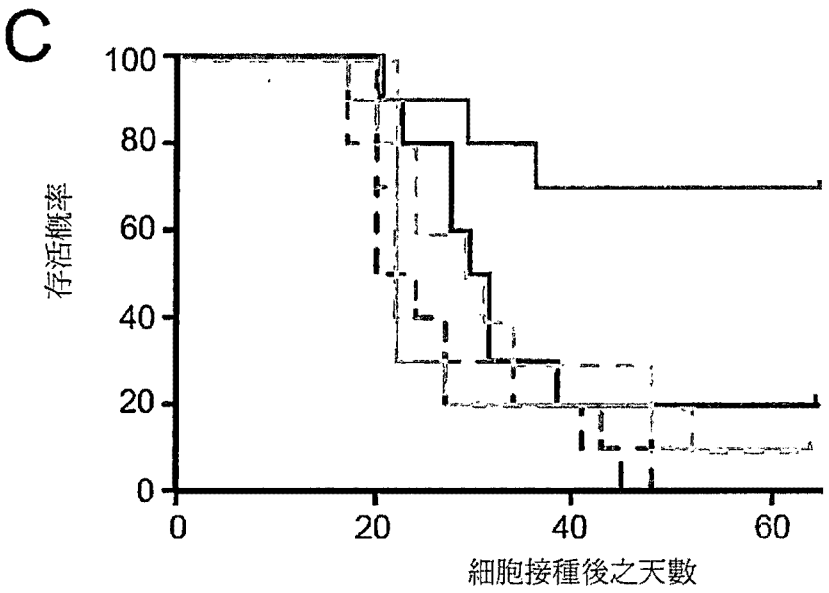
指定代表圖：


A
100
80
60
40
20
0
存活機率
0
20
40
60
80
100
細胞接種後之天數
媒劑
αPD-1
VVGM αCTLA4
VVGM αCTLA4 + αPD-1
*
*

【圖8】


B
αPD-1
VVGM αCTLA4
VVGM αCTLA4 + αPD-1
對照
腫瘤體積（mm³）
細胞接種後之天數
0/10
6/10
10/10
0/10
2/10

【圖8】（續）


C
100
80
60
40
20
0
存活概率
0
20
40
60
細胞接種後之天數
VVGM αCTLA4 + αPD-1
VVGM αCTLA4 + 同型
對照VV + αPD-1
αPD-1
媒劑
對照VV

【圖8】（續）

202321458

【發明摘要】

【中文發明名稱】 新穎抗體組合及其用途

【英文發明名稱】 NOVEL COMBINATIONS OF ANTIBODIES AND USES THEREOF

【中文】

本發明大體上關於一種能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒及特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子之組合；及其在癌症治療中之用途。

【英文】

The present invention generally relates to a combination of an oncolytic virus capable of expressing a first antibody molecule that specifically binds to CTLA-4; and a second antibody molecule that specifically binds to PD-1 and/or PD-L1 and uses thereof in the treatment of cancer.

【指定代表圖】 圖 8

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 新穎抗體組合及其用途

【英文發明名稱】 NOVEL COMBINATIONS OF ANTIBODIES AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種組合，其包含：（i）能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及（ii）特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；其中該組合用於治療患者中包含冷腫瘤或由其組成之癌症。本發明亦係關於該組合在製造用於治療患者之包含冷腫瘤或由其組成之癌症的藥物中之用途，及治療患者之包含冷腫瘤或由其組成之癌症的方法，該方法包含投予該組合。

【先前技術】

【0002】 用免疫檢查點阻斷抗體治療改變了晚期實體癌患者的生存率，該等晚期實體癌包括轉移性黑色素瘤、非小細胞肺癌及錯誤配對修補缺陷癌症（Hodi 等人，2010；Larkin 等人，2015；Topalian 等人，2012）。

【0003】 然而，由於許多患者對免疫檢查點阻斷（ICB）無反應或產生抗藥性，因此仍有很大的需求沒有得到滿足（Sharma 等人，2017）。缺乏療效的原因咸信包括缺乏或不足的腫瘤浸潤性免疫細胞（TIL），最值得注意地係 CD8+ T 細胞（Chen 及 Mellman，2013；Gajewski 等人，2013）。實體癌腫瘤微環境（TME）中缺乏趨化及炎症信號同樣被認為係對 CAR-T 細胞治療產生抗性的基

礎（Wagner 等人，2020）。

【0004】 因此，極其需要鑑別此類治療方法：誘導炎症免疫細胞募集至「免疫荒漠型」或「免疫排除型」腫瘤中，從而轉化為強大的全身性適應性抗腫瘤免疫及 CD8+T 細胞浸潤，使原發性及轉移性腫瘤消退。

【0005】 瘤內（i.t.）溶瘤病毒療法可誘導 T 細胞浸潤且改善抗 PD-1 免疫療法（Ribas 等人，2017）。與單一藥劑 ICB 相比，抗 CTLA-4 及抗 PD-1 抗體的組合療法提高了療效，可能經由全身 $CD4^+$及 $CD8^+$ T 細胞分化以及 T 效應及調節性 T 細胞的腫瘤定位調節之互補機制（Arce Vargas 等人，2018；Wei 等人，2019）。然而，全身性投予之抗 CTLA-4（包括審批通過之伊匹單抗（ipilimumab））之耐受性問題限制了臨床用途（Postow 等人，2015）。

【0006】 全身性抗 CTLA-4 抗體療法的功效及耐受性似乎係相關的。增加伊匹單抗劑量可增強功效及副作用（Bertrand 等人，2015）。與 CTLA-4 之中樞免疫檢查點功能一致，副作用可能很嚴重且具有全身性自體免疫性質（Tivol 等人，1995）。

【0007】 有趣的是，最近報導相對於 $CD8^+$及 $CD4^+$效應 T 細胞，過度表現 CTLA-4 的腫瘤內（「i.t.」）Treg 細胞的耗竭有助於伊匹單抗治療活性，而 Treg 耗竭增強的抗 CTLA-4 抗體變異體在攜帶腫瘤之 FcγR 人類化小鼠中顯示出改善的治療活性（Arce Vargas 等人，2018）。這些發現表明，與目前可用之抗 CTLA-4 療法相比，使用 Treg 耗竭抗 CTLA-4 抗體進行腫瘤局部療法可以提供強大的治療活性，同時減少副作用（Marabelle 等人，2013a；Marabelle 等人，2013b）-特別係與經過驗證且安全的免疫調節劑（例如 PD-1/PD-L1 軸的阻斷劑或溶瘤病毒）結合使用時。

【發明內容】

【0008】 針對該背景，本發明人在本文中描述且表徵摻有全長人類重組抗 CTLA-4 抗體的基於痘瘡病毒（VV）的溶瘤載體。本發明人亦描述一種編碼最近發現之全長人類重組抗 CTLA-4 抗體之溶瘤病毒。此病毒編碼之新穎人類 IgG1 CTLA-4 抗體（命名為「4-E03」）係針對單株抗體（「mAb」）及與優良 Treg 耗竭活性相關之目標使用功能優先篩選來鑑別的。在以人類腫瘤內相關 CTLA-4 表現為特徵的人類化小鼠模型中，與臨床驗證的伊匹單抗相比，4-E03 IgG1 表現出增強的 Treg 耗竭。相比之下，與伊匹單抗相比，4-E03 在阻斷 CTLA-4:B7 相互作用以及克服 CTLA-4 介導之抑制效應 T 細胞增殖方面顯示出相似的效力。在本發明中，腫瘤選擇性溶瘤痘瘡病毒載體經工程改造以用於編碼此新穎、強 Treg 耗竭、檢查點阻斷的抗 CTLA-4 抗體 4-E03 及 GM-CSF（VV_{GM}-ahCTLA4，BT-001）。另外生成編碼匹配 Treg 耗竭小鼠替代抗體的病毒，從而能夠在代表發炎或免疫排除型腫瘤微環境、對 ICB 敏感或具有抗性的同基因免疫勝任型小鼠腫瘤模型中進行概念驗證研究。

【0009】 此引起以下出人意料的發現：表現抗 CTLA-4 抗體之溶瘤病毒與抗 PD-1/PD-L1 抗體協同以排斥「冷腫瘤」（在本文中亦稱為「冷免疫腫瘤」）。此為出人意料的，因為已知冷腫瘤對使用當前可用之抗 CTLA-4 及/或抗 PD-1 的全身性、靜脈內、單一藥劑或組合 ICB 具有抗性，如本文所揭示之「冷腫瘤」小鼠模型中之動物一般。

【0010】 如實例及本文中所論述，「冷」腫瘤之 T 細胞浸潤不良。出人意料地，本發明人已發現，使用表現抗 CTLA-4 抗體及抗 PD-1/PD-L1 抗體之溶瘤

病毒進行之組合治療誘導 T 細胞大量流入「冷」腫瘤，該等腫瘤的 T 細胞密集度變得與「熱」腫瘤相似。

【0011】 本發明人驚人的發現提供用於治療癌症之其他有益治療方法，該等癌症包含「冷」腫瘤或由其組成。如本文所描述，本發明大體上關於一種組合，其包含：（i）能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及（ii）特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；其中該組合用於治療患者中包含冷腫瘤或由其組成之癌症。

【0012】 在第一態樣中，本發明提供一種組合，其包含：

- 能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及
- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；

該組合用於治療患者之癌症，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【0013】 在第二態樣中，本發明提供一種以下各者之用途：

- 能夠表現編碼特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子的核苷酸序列的溶瘤病毒；及
- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；

其係用於製造用於治療患者之癌症的藥劑，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【0014】 在第三態樣中，本發明提供一種用於治療患者之癌症之方法，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成，該方法包含向該患者投予：

- 能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及
- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子。

【0015】 在第四態樣中，本發明提供能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第

一抗體分子之溶瘤病毒及特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子之組合；該組合用於治療患者之癌症，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【0016】 如上文所論述及隨附實例中所證明，在本發明之上述態樣中，用能夠表現特異性結合於CTLA-4之第一抗體分子之溶瘤病毒及特異性結合於PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體治療可使得 T 細胞流入患者之癌症的冷腫瘤中。其引起患者癌症之冷腫瘤中 T 細胞的數目及/或密度增加，使得腫瘤變得與熱腫瘤相似地富含 T 細胞。在本發明之一實施例中，患者之冷腫瘤中的 T 細胞之數目及/或密度增加約 5 倍至 25 倍或更高，例如增加約 5 倍、或 6 倍、或 7 倍、或 8 倍、或 9 倍、或 10 倍、或 11 倍、或 12 倍、或 13 倍、或 14 倍、或 15 倍、或 16 倍、或 17 倍、或 18 倍、或 19 倍、或 20 倍、或 21 倍、或 22 倍、或 23 倍、或 24 倍或 25 倍或更高。

【0017】 因此，在另一態樣中，本發明提供一種組合，其包含：

- 能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及
- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；

其用於增加患者之癌症中之冷腫瘤中的 T 細胞之數目及/或密度，及/或介導 T 細胞流入患者之癌症中之冷腫瘤中。應瞭解，藉由如此進行，本發明治療患者之癌症。在本發明之一實施例中，患者之冷腫瘤中的 T 細胞之數目及/或密度增加約 5 倍至 25 倍或更高，例如增加約 5 倍、或 6 倍、或 7 倍、或 8 倍、或 9 倍、或 10 倍、或 11 倍、或 12 倍、或 13 倍、或 14 倍、或 15 倍、或 16 倍、或 17 倍、或 18 倍、或 19 倍、或 20 倍、或 21 倍、或 22 倍、或 23 倍、或 24 倍或 25 倍或更高。

【0018】 如本文所論述，本發明之溶瘤病毒能夠表現特異性結合於

CTLA-4 之第一抗體分子。細胞毒性 T 淋巴球相關抗原（CTLA-4 或 CTLA4），亦稱為 CD152，係 B7/CD28 家族成員，其可阻斷 T 細胞活化。CTLA-4 表現於活化 T 細胞上且將抑制性信號傳送至 T 細胞。其與 T 細胞共刺激蛋白 CD28 同源，且 CTLA-4 及 CD28 均與 CD80（亦稱為 B7-1）及 CD86（亦稱為 B7-2）結合。CTLA4 亦於調節 T 細胞（Treg）中發現且促進其抑制功能。CTLA-4 蛋白質含有細胞外 V 域、跨膜域及胞質尾區。

【0019】 已提出結合 CTLA-4 之抗體藉由雙重機制發揮其治療活性，同時作用於免疫效應 $CD4^+$及 $CD8^+$ T 細胞及免疫抑制 T 調節（Treg）細胞。在效應 T 細胞上，阻斷 CTLA-4 與其配體 B7.1 及 B7.2 相互作用的 CTLA-4 抗體可以增強免疫反應，且已被證明能夠刺激強效抗腫瘤免疫（Korman 等人，2006，癌症免疫治療中的檢查點阻斷，《免疫學進展（*Adv Immunol*）》90:297-339）。

【0020】 最近，Fc 效應功能及 Treg 耗竭被證明有助於抗 CTLA-4 抗體之治療活性且與之相關，該等抗體包括臨床相關抗體伊匹單抗及曲美單抗（Arce Vargas，Furness 等人，2018）。功效及毒性（後者可能係嚴重的且具有自體免疫性質）被認為與當前可用之全身性抗 CTLA-4 方案有關。因此，缺乏遞送高效但安全的基於抗 CTLA-4 之 ICB 的方法。本發明人最近論證，瘤內遞送編碼 Treg 耗竭抗 CTLA-4 抗體之溶瘤病毒（瘤內載體化之抗 CTLA-4）具有廣泛的抗腫瘤活性。在此，本發明人出乎意料地證明，在 PD-1/PD-L1 ICB 之情況下，瘤內載體化之抗 CTLA-4 對免疫浸潤不佳之「冷」腫瘤具有功效，該等腫瘤對全身性抗體介導之 ICB 具有抗性。此外，由於與此方法相關之腫瘤限制性抗 CTLA-4 暴露，與已批准的抗 CTLA-4 方案相比，瘤內載體化之抗 CTLA-4 被證明係安全且耐受性良好的。

【0021】 如本文所論述，本發明亦涉及特異性結合 PD-1 及/或特異性結合於 PD-L1 之第二抗體分子。在一些實施例中，第二抗體分子特異性結合於 PD-1；在一些實施例中，第二抗體分子特異性結合於 PD-L1；且在一些實施例中，第二抗體分子特異性結合於 PD-1 及 PD-L1。

【0022】 程式化細胞死亡蛋白 1（PD-1 或 PD1）（亦稱為 CD279）發現於 T 及 B 細胞之表面上且抑止 T 細胞活性。PD-1 結合兩個配體：PD-L1 及 PD-L2。程式化死亡-配體 1（PD-L1）（亦稱為 CD274）結合於其受體 PD-1 以產生減少 T 細胞增殖之抑制信號。

【0023】 抗體為熟習免疫學及分子生物學技術者所熟知。通常，抗體包含兩個重（H）鏈及兩個輕（L）鏈。在本文中，吾等有時將此完整抗體分子稱為全尺寸或全長抗體。抗體之重鏈包含一個可變域（VH）及三個恆定域（CH1、CH2 及 CH3），且抗體之分子輕鏈包含一個可變域（VL）及一個恆定域（CL）。可變域（有時統稱為 F_V 區）與抗體之目標或抗原結合。各可變域包含三個環，稱為互補決定區（CDR），其負責目標結合。恆定域不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能。視抗體或免疫球蛋白之重鏈之恆定區之胺基酸序列而定，可將抗體或免疫球蛋白分配至不同類別。存在五種主要類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且在人類中，此等類別中之若干種進一步分成子類（同型），例如 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4；IgA1 及 IgA2。抗體之另一部分為 Fc 域（另外稱為片段可結晶域），其包含抗體之重鏈中之每一者之恆定域中的兩者。Fc 域負責抗體與 Fc 受體之間的相互作用。

【0024】 Fc 受體係膜蛋白，其通常存在於免疫系統細胞之細胞表面（亦即，Fc 受體存在於目標細胞膜上--在其他情況下亦稱為質膜或細胞質膜）。Fc 受

體之作用為經由 Fc 域結合抗體，且將抗體內化至細胞中。在免疫系統中，此可產生抗體介導之吞噬作用及抗體依賴性細胞介導之細胞毒性。

【0025】 Fc 受體之亞群為對 IgG 抗體具有特異性之 Fcγ 受體（Fc-γ 受體，FcγR）。存在兩種類型之 Fcγ 受體：活化 Fcγ 受體（亦表示為活化 Fcγ 受體）及抑制性 Fcγ 受體。活化及抑制性受體分別經由基於免疫受體酪胺酸之活化模體（ITAM）或基於免疫受體酪胺酸之抑制性模體（ITIM）傳輸其信號。在人類中，FcγRIIb（CD32b）為抑制性 Fcγ 受體，而 FcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32a）、FcγRIIc（CD32c）、FcγRIIIa（CD16a）及 FcγRIV 為活化 Fcγ 受體。FcγRIIIb 為表現於嗜中性粒細胞上之 GPI 連接受體，該受體缺乏 ITAM 模體但通過其與交聯脂筏及與其他受體接合之能力亦視為活化性的。在小鼠中，活化受體為 FcγRI、FcγRIII 及 FcγRIV。

【0026】 眾所周知，抗體經由與 Fcγ 受體之相互作用來調控免疫細胞活性。特定言之，抗體免疫複合物如何調控免疫細胞活化係藉由其活化 Fcγ 受體及抑制性 Fcγ 受體之相對接合來判定。不同抗體同型以不同的親和力結合至活化 Fcγ 受體及抑制性 Fcγ 受體，產生不同的活化:抑制比率（A:I 比率）（Nimmerjahn 等人；《科學》2005 年 12 月 2 日;310（5753）:1510-2）。

【0027】 藉由結合至抑制性 Fcγ 受體，抗體可抑制、阻斷及/或下調效應細胞功能。

【0028】 藉由結合至活化 Fcγ 受體，抗體可活化效應細胞功能且藉此觸發諸如抗體依賴性細胞毒性（ADCC）、抗體依賴性細胞吞噬作用（ADCP）、細胞介素釋放及/或抗體依賴性內飲作用以及在嗜中性球之情況下之 NET 作用（NETosis）（亦即，嗜中性球胞外陷阱（Neutrophil extracellular trap；NET）之

活化及釋放)的機制。抗體結合至活化 Fcγ 受體亦可使某些活化標記(諸如 CD40、MHCII、CD38、CD80 及/或 CD86）增加。

【0029】 在一些實施例中，特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子係 Fcγ 受體接合抗體。「Fcγ 受體接合抗體」吾人意謂抗體分子可經由其 Fc 區與至少一種 Fcγ 受體結合。

【0030】 如本文所用，術語抗體分子涵蓋全長或全尺寸抗體以及全長抗體之功能片段及此類抗體分子之衍生物。

【0031】 全尺寸抗體之功能片段具有與對應全尺寸抗體相同之抗原結合特徵，且包括與對應全尺寸抗體相同的可變域（亦即，VH 及 VL 序列）及/或相同的 CDR 序列。功能片段具有與對應全尺寸抗體相同的抗原結合特徵意謂其結合於目標上與全尺寸抗體相同的抗原決定基。此類功能片段可對應於全尺寸抗體之 Fv 部分。或者，此類片段可為 Fab，亦表示為 Fab'，其為不含有 Fc 部分的單價抗原結合片段；或$(Fab')_2$，其為含有兩個藉由二硫鍵連接在一起的抗原結合 Fab 部分的二價抗原結合片段；或 Fab'，亦即$(Fab')_2$的單價變異體。此類片段亦可為單鏈可變片段（scFv）。

【0032】 在一些實施例中，本文所描述之第一抗體分子及/或第二抗體分子選自由以下組成之群組：全尺寸抗體、嵌合抗體、單鏈抗體及其抗原結合片段（例如 Fab、Fv、scFv、Fab'及$(Fab')_2$）。

【0033】 功能片段並不始終含有對應全尺寸抗體之所有六個 CDR。應瞭解，含有三個或更少 CDR 區（在一些情況下，甚至僅單個 CDR 或其部分）之分子能夠保持衍生一或多個 CDR 的抗體之抗原結合活性。舉例而言，在 Gao 等人，1994，《生物化學雜誌（J. Biol. Chem.）》，269：32389-93 中，描述了完整

VL 鏈（包括全部三個 CDR）對其受質具有高親和力。

【0034】 含有兩個 CDR 區之分子已例如由 Vaughan 及 Sollazzo 2001，《組合化學及高通量篩選（Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening）》，4：417-430 描述。在第 418 頁（右欄-3 吾等之設計策略）上，描述了僅包括穿插於框架區內之 H1 及 H2CDR 高變區之微型抗體。微型抗體描述為能夠與目標結合。Vaughan 及 Sollazzo 參考了 Pessi 等人，1993,《自然（Nature）》，362：367-9 及 Bianchi 等人，1994,《分子生物學雜誌（J. Mol. Biol.）》，236：649-59 且更詳細地描述 H1 及 H2 微型抗體及其特性。在 Qiu 等人，2007，《自然生物技術（Nature Biotechnology）》，25：921-9 中，證實由兩個連接之 CDR 組成之分子能夠結合抗原。Quiocho 1993，《自然》，362：293-4 提供「微型抗體」技術之概述。Ladner 2007，《自然生物技術》，25：875-7 評述含有兩個 CDR 之分子能夠保持抗原結合活性。

【0035】 含有單一 CDR 區之抗體分子描述於例如 Laune 等人，1997，JBC，272：30937-44 中，其中表明衍生自 CDR 之一系列已肽呈現抗原結合活性且應注意完整單一 CDR 之合成肽呈現強結合活性。在 Monnet 等人，1999，JBC，274：3789-96 中，展示一系列 12 聚體肽（12-mer peptide）及相關構架區具有抗原結合活性，且評述僅 CDR3 樣肽能夠結合抗原。在 Heap 等人，2005，《普通病毒學雜誌（J. Gen. Virol.）》，86：1791-1800 中，報導「微抗體」（含有單一 CDR 之分子）能夠結合抗原且展示來自抗 HIV 抗體之環狀肽具有抗原結合活性及功能。在 Nicaise 等人，2004，《蛋白質科學（Protein Science）》，13：1882-91 中，展示單一 CDR 可賦予對其溶菌酶抗原之抗原結合活性及親和力。

【0036】 因此，具有五個、四個、三個或更少 CDR 之抗體分子能夠保持

衍生 CDR 之全長抗體的抗原結合特性。

【0037】 抗體分子亦可為全長抗體之衍生物或此類抗體之片段。衍生物具有與對應全尺寸抗體相同的抗原結合特徵，意為其與全尺寸抗體結合於目標上之相同抗原決定基。

【0038】 因此，如本文中所使用，術語「抗體分子」吾人包括所有類型之抗體分子及其功能片段及其衍生物，包括：單株抗體、多株抗體、合成抗體、重組產生之抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、可變片段（Fv）、包括二價單鏈可變片段（di-scFv）及二硫鍵連接之可變片段的單鏈可變片段（scFV 片段）、Fab 片段、$F(ab')_2$ 片段、Fab'片段、抗體重鏈、抗體輕鏈、抗體重鏈之均二聚體、抗體輕鏈之均二聚體、抗體重鏈之雜二聚體、抗體輕鏈之雜二聚體、此類均二聚體及雜二聚體之抗原結合功能片段。

【0039】 此外，如本文所用，術語「抗體分子」包括所有類別之抗體分子及功能片段，包括：IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD 及 IgE。

【0040】 在一些實施例中，抗體為人類 IgG1。熟習此項技術者意識到小鼠 IgG2a 及人類 IgG1 與活化 Fc γ 受體接合，且共有經由利用例如 ADCP 及 ADCC 活化攜帶活化 Fc γ 受體之免疫細胞（例如巨噬細胞及 NK 細胞）來活化目標細胞缺失的能力。因此，儘管小鼠 IgG2a 為小鼠中缺失之較佳同型，但人類 IgG1 為人類中缺失之較佳同型。相反，已知 TNFR 超家族促效劑受體例如 4-1BB、OX40、TNFRII、CD40 的最佳共刺激取決於抑制性 FcγRIIB 的抗體參與。在小鼠中，已知優先與抑制性 Fcγ 受體（FcγRIIB）結合且僅微弱地與活化性 Fc γ 受體結合的 IgG1 同型對 TNFR 超家族靶向 mAb 的共刺激活性係最佳的。雖然

沒有在人類中描述過小鼠 IgG1 同型之直接等效物，但可以對抗體進行工程改造，以顯示出與活化性 Fc γ 受體相比同樣增強的抑制性結合。此類經工程改造之 TNFR 超家族靶向抗體在經工程改造以表現人類活化及抑制 Fc γ 受體之轉殖基因小鼠中亦具有改善的活體內共刺激活性（Dahan 等人，2016，促效性人類抗 CD40 單株抗體的治療活性需要選擇性 FcγR 參與（Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcγR Engagement）。《癌細胞（*Cancer Cell*）》.29（6）:820-31）。

【0041】 如上文所概述，本發明包括抗體分子之不同類型及形式，且將為免疫學領域中熟習此項技術者已知。眾所周知，用於治療目的之抗體通常用修改抗體分子之特性的額外組分修飾。

【0042】 因此，包括本發明之抗體分子或根據本發明使用之抗體分子（例如單株抗體分子及/或多株抗體分子及/或雙特異性抗體分子）包含可偵測部分及/或細胞毒性部分。

【0043】 「可偵測部分」包括來自包含以下之群組的一或多者：酶；放射性原子；螢光部分；化學發光部分；生物發光部分。可偵測部分允許抗體分子得以在活體外及/或活體內及/或離體進行觀察。

【0044】 「細胞毒性部分」包括放射性部分，及/或酶，例如其中酶為凋亡蛋白酶，及/或毒素，例如其中毒素為細菌毒素或毒液；其中細胞毒性部分能夠誘導細胞裂解。

【0045】 進一步包括抗體分子可呈分離形式及/或純化形式，及/或可聚乙二醇化。

【0046】 如上文所論述，抗體之 CDR 結合於抗體目標。將胺基酸分配至

本文所描述之各 CDR 係根據 KabatEA 等人 1991,「《免疫學感興趣的蛋白質之序列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）》」第五版,NIH 公開案第 91-3242 號,第 xv-xvii 頁中之定義。

【0047】 如熟習此項技術者應瞭解，亦存在將胺基酸分配至各 CDR 之其他方法。舉例而言，國際免疫遺傳學資訊系統（International ImMunoGeneTics information system）（IMGT(R)）（http://www.imgt.org/及學術出版社（Academic Press）出版之 Lefranc 及 Lefranc「《免疫球蛋白資料手冊（The Immunoglobulin FactsBook）》」,2001）。

【0048】 在另一實施例中，本發明之或根據本發明使用的 CTLA-4 特異性抗體分子為能夠與本文所描述之特異性抗體（諸如包含 SEQ ID.NO: 15、16、17、10、18 及 19 或 SEQ ID.NO: 22、23、24、10、25 及 26 之抗體分子）競爭的抗體分子。

【0049】 「能夠競爭」意謂競爭抗體能夠至少部分地抑制或以其他方式干擾如本文所定義之抗體分子與特定目標之結合。

【0050】 舉例而言，此類競爭抗體分子可能夠抑制本文所描述之抗體分子之結合至少約 10%；例如至少約 20%、或至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%、至少約 95%、約 100%，及/或抑制本文所描述之抗體以阻止或減少與特定目標之結合之能力至少約 10%；例如至少約 20%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%、至少約 95%或至少約 100%。

【0051】 競爭性結合可藉由本領域中熟習此項技術者熟知之方法，諸如酶聯免疫吸附分析（ELISA）測定。

【0052】 ELISA分析可用於評估抗原決定基修飾或阻斷抗體。適用於鑑別競爭抗體之額外方法揭示於《抗體：實驗室手冊（*Antibodies: ALaboratory Manual*）》，Harlow及Lane中，其以引用之方式併入本文中（例如參見第567至569頁、第574至576頁、第583及590至612頁，1988，CSHL，NY，ISBN 0-87969-314-2）。

【0053】 眾所周知，抗體特異性結合所定義之目標分子或抗原，且此意謂抗體優先且選擇性地結合其目標而非並非目標之分子。

【0054】 根據本發明之第一及第二抗體（CTLA-4、PD1、PD-L1）或根據本發明使用之第一及第二抗體的目標表現於細胞之表面上，亦即其為細胞表面抗原，其將包括抗體之抗原決定基（在此上下文中另外稱為細胞表面抗原決定基）。細胞表面抗原及抗原決定基為熟習免疫學或細胞生物學者容易理解之術語。

【0055】 對於「細胞表面抗原」，吾人包括本文所描述之抗體分子的細胞表面抗原或其至少表位暴露在細胞膜的細胞外側。

【0056】 評定蛋白質結合之方法為熟習生物化學及免疫學者所已知。熟習此項技術者應瞭解，彼等方法可用於評估抗體與目標之結合及/或抗體之Fc域與Fc受體之結合；以及彼等相互作用之相對強度、或特異性、或抑制、或預防、或降低。可用於評定蛋白質結合之方法之實例為例如免疫分析、BIAcore、西方墨點、放射免疫分析（RIA）及酶聯免疫吸附分析（ELISA）（關於抗體特異性之論述，參見《基本免疫學第二版（Fundamental Immunology Second Edition）》，紐約之雷文出版社（Raven Press, New York），第332-336頁（1989））。

【0057】 因此，在本文中，「特異性結合於CTLA-4之抗體分子」及「抗

CTLA-4 抗體分子」係指特異性結合 CTLA-4 但不結合於非目標或與非目標的結合比目標更弱（諸如具有較低親和力）的抗體分子。

【0058】 類似地，本文中「特異性結合於 PD-1 之抗體分子」及「抗 PD-1 抗體分子」均係指特異性結合於目標 PD-1 但不結合於非目標，或與非目標的結合比目標更弱（諸如具有較低親和力）的抗體分子。

【0059】 本文中「特異性結合於 PD-L1 之抗體分子」及「抗 PD-L1 抗體分子」均係指特異性結合於目標 PD-L1 但不結合於非目標，或與非目標的結合比目標更弱（諸如具有較低親和力）的抗體分子。

【0060】 在一些實施例中，特異性結合 CTLA-4 之抗體分子（或抗 CTLA-4 抗體分子）係指特異性結合於 CTLA-4 之細胞外域的抗體分子。在一些實施例中，特異性結合 PD-1 之抗體分子（或抗 PD-1 抗體分子）係指特異性結合於 PD-1 之細胞外域的抗體分子。在一些實施例中，特異性結合 PD-L1 之抗體分子（或抗 PD-L1 抗體分子）係指特異性結合於 PD-L1 之細胞外域的抗體分子。

【0061】 亦包括以下含義：相比於與非目標特異性結合，抗體與目標 CTLA-4 或 PD-1 或 PD-L1 之特異性結合強至少兩倍、或強至少五倍、或強至少 10 倍、或強至少 20 倍、或強至少 50 倍、或強至少 100 倍、或強至少 200 倍、或強至少 500 倍、或強至少約 1000 倍。

【0062】 另外，包括以下含義：若抗體按以下解離常數（K_D）結合於目標，則該抗體特異性結合於目標 CTLA-4 或 PD-1 或 PD-L1：至少約 10^{-1} M、或至少約 10^{-2} M、或至少約 10^{-3} M、或至少約 10^{-4} M、或至少約 10^{-5} M、或至少約 10^{-6} M、或至少約 10^{-7} M、或至少約 10^{-8} M、或至少約 10^{-9} M、或至少約 10^{-10} M、或至少約 10^{-11} M、或至少約 10^{-12} M、或至少約 10^{-13} M、或至少約 10^{-14} M、或至少

約 10^{-15} M。

【0063】 如上文所論述，本發明之溶瘤病毒表現特異性結合 CTLA-4 之抗體。

【0064】 在一些實施例中，特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子係 Fcγ 受體接合抗體。

【0065】 在一些實施例中，第一抗體分子選自由伊匹單抗及曲美單抗組成之群組。

【0066】 在一些實施例中，特異性結合 CTLA-4 之抗體分子（或抗 CTLA-4 抗體分子）不與 CD28 交叉反應。在一些實施例中，特異性結合 CTLA-4 之抗體分子（或抗 CTLA-4 抗體分子）阻斷 CTLA-4 與 CD80 及/或 CD86 之結合，由此抑制 CTLA-4 信號傳導。

【0067】 在一些實施例中，特異性結合於本文所描述之 CTLA-4 的抗體分子（或抗 CTLA-4 抗體分子）與伊匹單抗相比對 CTLA-4 陽性細胞的耗竭作用改良。

【0068】 該等抗體分子對 CTLA-4 陽性細胞具有耗竭作用意謂在向個體（諸如人類）投予後，此類抗體特異性結合於表現於 CTLA-4 陽性細胞表面上的 CTLA-4，且此結合導致該等細胞之耗竭。

【0069】 在一些實施例中，CTLA-4 陽性細胞為 CD4 陽性（$CD4^+$）細胞，亦即表現 CD4 之細胞。

【0070】 在一些實施例中，CTLA-4 陽性細胞為 CD4 陽性及 FOXP3 陽性，亦即表現 CD4 及 FOXP3 兩者。此等細胞為 Treg。CD8 陽性 T 細胞亦表現 CTLA-4，但 Treg 表現量顯著高於 CD8 陽性 T 細胞之 CTLA-4。相比於表現較低之 $CD8^+$

細胞，此使得 Treg 更易於耗竭。

【0071】 在一些情況下，CTLA-4 優先表現於腫瘤微環境（腫瘤浸潤性細胞，TILS）中之免疫細胞上。

【0072】 因此，在腫瘤微環境中，Treg 將為具有最高 CTLA-4 表現之細胞，產生特異性結合於具有 Treg 耗竭作用之 CTLA-4 的抗體分子（或抗 CTLA-4 抗體分子）。

【0073】 因此，在一些實施例中，特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子為 Treg 耗竭抗體。

【0074】 如上文所提及，本文所描述之抗 CTLA-4 抗體分子可為 Treg 耗竭抗體分子，其意謂在向個體（諸如人類）投予後，此類抗體分子特異性結合於在 Treg 表面上表現之 CTLA-4，且此結合導致 Treg 耗竭。

【0075】 為決定抗體分子是否為如本文所提及具有 Treg 耗竭作用之抗體分子（例如，此與伊匹單抗相比可為改良的耗竭作用），在 PBMC-NOG/SCID 模型中可使用活體外抗體依賴性細胞毒性（ADCC）分析或活體內測試。

【0076】 使用經穩定轉染以表現 CD16-158V 等位基因以及 GFP 之 NK-92 細胞株進行之活體外 ADCC 測試，其中 ADCC 測試包含以下連續七個步驟：

1）將作為目標細胞之 CTLA-4 陽性細胞、CD4 陽性細胞或 Treg 自健康供體之周邊血液分離。此分離可使用 $CD4^+$ T 細胞分離套組進行，諸如來自 Miltenyi Biotec 之商業套組。

2）隨後用 CD3/CD28 刺激目標細胞例如 48 小時，例如使用 CD3/CD28 Dynabeads®及 rhIL-2，諸如 50 ng/ml rhIL-2。刺激可在 37℃下進行。

3）接著目標細胞與待測試之抗體分子一起預培育，例如在 4℃下以 10 μg/ml

預培育 30 分鐘，且隨後與 NK 細胞混合。

4）目標細胞隨後在含有 HEPES 緩衝液、丙酮酸鈉及 FBS 低 IgG 之 RPMI 1640+GlutaMAX 培養基中培育適當時間，諸如 4 小時。RPMI 1640 + GlutaMAX 培養基可含有 10 mM HEPES 緩衝劑、1 mM 丙酮酸鈉及 10%FBS 低 IgG，且效應細胞:目標細胞比率可為 2:1。

5）溶解係藉由流動式細胞測量術測定。

6）重複步驟 1 至 5，或與使用伊匹單抗（作為對照）而非步驟 3 中之測試抗體分子並行進行。

7）比較所測試抗體分子之溶解結果與伊匹單抗之溶解結果。與伊匹單抗相比，經測試抗體分子之改良之溶解展示所測試抗體分子視使用何種目標細胞而定，分別對 CTLA-4 陽性細胞、CD4 陽性細胞或 Treg 具有改良之耗竭作用。

【0077】 在一些實施例中，以上步驟 7）中改良之耗竭效果為顯著改良之耗竭效果。

【0078】 活體內測試係基於 PBMC 小鼠與 NOG/SCID 小鼠之組合使用，其在本文中稱為 PBMC-NOG/SCID 模型。PBMC 小鼠及 NOG/SCID 小鼠均為熟知模型。PBMC-NOG/SCID 模型中之活體內測試包含以下連續九個步驟：

1）分離人類 PBMC（周邊血液單核細胞），洗滌且再懸浮於無菌 PBS 中。在一些實施例中，將 PBMC 以 75×10^6 個細胞/mL 再懸浮於 PBS 中。

2）NOG 小鼠經 i.v.（經靜脈內）注射適量，諸如 200 μl 來自步驟 1）之細胞懸浮液。若注射 200 μl，則此對應於 15×10^6 個細胞/小鼠。

3）適合的時間，諸如在注射之後 2 週，自 NOG 小鼠之脾臟經分離且呈現為單細胞懸浮液。視情況，自單細胞懸浮液獲取較小樣品以藉由 FACS 測定

CTLA-4 在人類 T 細胞上之表現，以便確認 CTLA-4 表現。

4）將步驟 3）中之細胞懸浮液再懸浮於無菌 PBS 中。在一些實施例中，細胞懸浮液以 50×10^6 個細胞/mL 再懸浮於無菌 PBS 中。若步驟 3 中包括視情況選用之 CTLA-4 表現測定，則隨後使其餘細胞懸浮液再懸浮於步驟 4 中。

5）SCID 小鼠經 i.p（經腹膜內）注射適量，諸如 200 μl 來自步驟 4 之懸浮液。若注射 200 μl，則此對應於 10×10^6 個細胞/小鼠。

6）在步驟 5）中注射之後的適合時間，諸如 1 小時，SCID 小鼠用適量，諸如 10 mg/kg 待測試之抗體分子、伊匹單抗或同型對照單株抗體進行處理。

7）在步驟 6）之處理之後的適合時間，諸如 24 小時收集經處理 SCID 小鼠的腹膜內流體。

8）人類 T 細胞亞群藉由 FACS 使用以下標記進行鑑別及定量：CD45、CD4、CD8、CD25 及/或 CD127。

9）比較來自經測試抗體分子處理之小鼠之 T 細胞亞群的鑑別及定量的結果與來自經伊匹單抗處理之小鼠之 T 細胞亞群之鑑別及定量的結果，及來自經同型對照單株抗體處理之小鼠之 T 細胞亞群的鑑別及定量的結果。與來自用伊匹單抗處理之小鼠的腹膜內流體中之 CTLA-4 陽性細胞的數目相比，來自用待測試之抗體分子處理之小鼠的腹膜內流體中之 CTLA-4 陽性細胞的數目較低，此表明與伊匹單抗相比，抗體分子具有對 CTLA-4 陽性細胞改良的耗竭作用。與來自用伊匹單抗處理之小鼠的腹膜內流體中之 CD4 陽性細胞的數目相比，來自用待測試之抗體分子處理之小鼠的腹膜內流體中之 CD4 陽性細胞的數目較低，此表明與伊匹單抗相比，抗體分子具有對 CD4 陽性細胞改良的耗竭作用。與來自用伊匹單抗處理之小鼠的腹膜內流體中之 Treg 的數目相比，來自用待測試之抗

體分子處理之小鼠的腹膜內流體中之 Treg 的數目較低，此表明與伊匹單抗相比，抗體分子具有對 Treg 改良的耗竭作用。

【0079】 在此活體內測試中，在最關注的一些實施例中，觀察步驟 7 中之 Treg 耗竭。

【0080】 如熟習此項技術者已知，亦可在抗體依賴性細胞吞噬作用（ADCP）分析中評估 Treg 耗竭。

【0081】 在一些實施例中，與 Yervoy（伊匹單抗）相比，抗體分子對與 B7.1 及 B7.2 配體之 CTLA-4 相互作用具有類似的阻斷作用。此可藉由 ELISA 或在更功能性分析中評估，其中抗 CTLA-4 抗體響應於用葡萄球菌腸毒素 B（SEB）刺激 PBMC 而增強 T 細胞產生 IL-2。

【0082】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為人類抗體分子。在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為人類化抗體分子。在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為人類來源之抗體分子，意謂其來源於隨後已經修飾之人類抗體分子。在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為人類 IgG1 抗體。

【0083】 在一些實施例中，特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子選自由人類 IgG 抗體、人類化 IgG 抗體及人類來源之 IgG 抗體組成之群組。

【0084】 在一些實施例中，特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子選自由以下組成之群組：全尺寸抗體、嵌合抗體、單鏈抗體及其抗原結合片段（例如 Fab、Fv、scFv、Fab'及$(Fab')_2$）。

【0085】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體為呈人類 IgG1 抗體形式之抗體，其展示與一或若干種活化性 Fc 受體之改良結合及/或經工程改造以用於改良與一或若干種活化性 Fc 受體之結合；因此，在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體

為經 Fc 工程改造之人類 IgG1 抗體。

【0086】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體為鼠類或人類化鼠類 IgG2a 抗體。

【0087】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體為與人類 CTLA-4 交叉反應之鼠類抗體。

【0088】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體為單株抗體或單株來源之抗體分子。在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體為多株抗體。

【0089】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子係一種抗體分子，其包含以下表 1 中呈現之三個替代物 VH-CDR1 序列中之一者、三個替代物 VH-CDR2 序列中之一者、兩個替代物 VH-CDR3 序列中之一者、兩個 VL-CDR1 序列中之一者、兩個 VL-CDR2 序列中之一者及/或兩個替代物 VL-CDR3 序列中之一者。

【0090】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子選自由包含 1 至 6 個 CDR 的抗體分子組成之群組，該 1 至 6 個 CDR 選自由 SEQ ID.No: 3、6、8、10、12 及 14 組成之群組。

【0091】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子選自由包含 CDR 的抗體分子組成之群組，該等 CDR 具有 SEQ ID. No: 3、6、8、10、12 及 14。

【0092】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子選自由以下組成之群組：包含 1 至 6 個 CDR、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1 及 VL-CDR3 的抗體分子，

其中 VH-CDR1（若存在）選自由 SEQ ID.No: 15、22、29 及 35 組成之群組；

其中 VH-CDR2（若存在）選自由 SEQ ID.No: 16、23、30 及 36 組成之群組；

其中 VH-CDR3（若存在）選自由 SEQ ID.No: 17、24、31 及 37 組成之群組；

其中 VL-CDR1（若存在）選自由 SEQ ID.No: 10 及 38 組成之群組；

其中 VL-CDR2（若存在）選自由 SEQ ID.No: 18、25、32 及 39 組成之群組；

其中 VL-CDR3（若存在）選自由 SEQ ID.No: 19、26 及 40 組成之群組。

【0093】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子選自由包含 6 個 CDR 的抗體分子組成之群組，該 6 個 CDR 選自由以下組成之群組：

SEQ ID.NO: 15、16、17、10、18 及 19；

SEQ ID.NO: 22、23、24、10、25 及 26；

SEQ ID.NO: 29、30、31、10、32 及 26；及

SEQ ID.NO: 35、36、37、38、39 及 40。

【0094】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子係一種抗體分子，其包含 6 個具有 SEQ ID.NO: 15、16、17、10、18 及 19 的 CDR。

【0095】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子係一種抗體分子，其包含 6 個具有 SEQ ID.NO: 22、23、24、10、25 及 26 的 CDR。

【0096】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為選自由包含 VH 之抗體分子組成之群組的抗體分子，該 VH 選自由 SEQ ID.NO: 20、27、33 及 41 組成之群組。

【0097】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為選自由包含 VL 之抗體分子組成之群組的抗體分子，該 VL 選自由 SEQ ID.NO: 21、28、34 及 42 組成之群組。

【0098】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為選自由包含 VH 及 VL 之抗體分子組成之群組的抗體分子，該 VH 及 VL 選自由 SEQ ID.NO: 20-21、27-28、33-34 及 41-42 組成之群組。

【0099】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子包含具有序列 SEQ ID.NO: 20 之 VH 及具有序列 SEQ ID.No: 21 之 VL。

【0100】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子包含具有序列 SEQ ID.NO: 27 之 VH 及具有序列 SEQ ID.No: 28 之 VL。

【0101】 在一些實施例中，第一抗體分子包含可變重鏈，該可變重鏈選自由 SEQ.ID.NO: 20 及 27 組成之群組。在一些其他或替代實施例中，第一抗體分子包含可變輕鏈，該可變輕鏈選自由 SEQ ID NO: 21 及 28 組成之群組。

【0102】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子包含具有序列 SEQ ID NO: 43 之重鏈恆定區（CH）。在一些其他或替代實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子包含具有序列 SEQ ID NO: 44 之輕鏈恆定區（CL）。在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子包含 SEQ ID NO: 43 及 44 之恆定區。

【0103】 表 1：本文所揭示之抗體之一般 CDR 序列

抗體相關部分	序列	未鑑別之胺基酸殘基之解釋	SEQ. ID. NO
VH-CDR1 替代物 1	$FX_1X_2YX_3MX_4WX_5R$ QAPG	X_1=S 或 K；X_2=D、S 或 A；X_3=Y、S 或 A；X_4=S 或 N；且 X_5=V 或 I	1
VH-CDR1 替代物 2	$FSX_1YX_2MX_3WVRQ$ APG	X_1=D 或 S；X_2=Y、S 或 A；且 X_3=S 或 N	2
VH-CDR1 替代物 3	$FSX_1YX_2MX_3WVRQ$ APG	X_1=D 或 S；X_2=Y 或 S；且 X_3=S 或 N	3
VH-CDR2，替代物 1	$SX_1ISX_2X_3X_4X_5X_6X_7$ X_8X_9ADSVKGR	X_1=G 或 A；X_2=W、G 或 N；X_3=S 或 T；X_4=S 或 G；X_5=R 或 G；X_6=D、S 或 Y；X_7=K、T 或 I；X_8=G、Y、H 或 D；X_9=Y 或 F	4
VH-CDR2，替代物 2	$SX_1ISX_2X_3X_4X_5X_6X_7$ X_8YADSVKGR	X_1=G 或 A；X_2=W、G 或 N；X_3=S 或 T；X_4=S 或 G；X_5=R 或 G；X_6=D、S 或 Y；X_7=K、T 或 I；X_8=G、Y、H 或 D	5
VH-CDR2，替代物 3	$SX_1ISX_2SX_3X_4X_5X_6X_7$ YADSVKGR	X_1=G 或 A；X_2=W 或 G；X_3=S 或 G；X_4=R 或 G；X_5=D 或 S；X_6=K 或 T；X_7=G 或 Y、H 或 D	6
VH-CDR3 替代物 1	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ $X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$	X_1=T 或 A；X_2=T 或 R；X_3=D、Y 或 L；X_4=L、R、S 或 G；X_5=A、V、S 或 Y；X_6=R、E、G 或 S；X_7=Y、M、L 或 G；X_8=N、H、Y 或無；X_9=Q、D 或無；X_{10}=W、A、D 或無；X_{11}=L、F、R 或無；X_{12}=A、D、G 或無；X_{13}=D、I、M 或無；X_{14}=D 或無；且 X_{15}=V 或無	7
VH-CDR3 替代物 2	$X_1X_2DX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ $X_{11}X_{12}X_{13}$	X_1=T 或 A；X_2=T 或 R；X_3=L 或 R；X_4=A 或 V；X_5=R 或 E；X_6=Y 或 M；	8

		X_7=N 或無；X_8=Q 或無； X_9=W 或無；X_{10}=L 或無； X_{11}=A 或無；X_{12}=D 或無	
VL-CDR1 替代物 1	$CX_1GSSSNIGX_2$ $X_3YX_4X_5X_6$	X_1=T 或 S；X_2=A 或 S； X_3=G 或 N；X_4=D 或 V； X_5=V 或 Y；X_6=H 或無	9
VL-CDR1 替代物 2	CTGSSSNIGAGYDVH		10
VL-CDR2 替代物 1	$X_1NX_2X_3RPS$	X_1=G、R 或 D；X_2=D、N 或 S；且 X_3=N、Q 或 K	11
VL-CDR2 替代物 2	$X_1NX_2X_3RPS$	X_1=G 或 R；X_2=D 或 N；且 X_3=N 或 Q	12
VL-CDR3 替代物 1	$CX_1X_2X_3DX_4SLX_5G\ X_6VX_7$	X_1=A 或 Q；X_2=V、A 或 S； X_3=W 或 Y；X_4=D 或 S； X_5=N 或 S；X_6=V、W 或 P； 且 X_7=V 或無	13
VL-CDR3 替代物 2	$CAX_1WDDSLNG\ X_2V$	X_1=V 或 A；且 X_2=V 或 W	14

【0104】 表 2：特異性抗 CTLA-4 抗體分子；CDR 序列以粗體標記於完整 VH 及 VL 序列中

抗體純系	區	序列	**SEQ. ID. NO:**
4-E03	VH-CDR1	FSDYYMSWVR QAPG	15
	VH-CDR2	SGISWSSRDK GYADSVKGR	16
	VH-CDR3	TTDLARY	17
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	GNDNRPS	18
	VL-CDR3	CAVWDDSLNG VV	19
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS DYYMSWVRQA PG**KGLEWV**SG ISWSSRDKGY ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**TTDL ARY**WGQGTLV TVSS	20
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI **YGNDNRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C AVWDDSLNGV** V**FGGGTKLTV** LG	21
	人類免疫球蛋白 G1（IgG1）輕鏈（LC）	MGWSCIILFLVATATGVHSQSVLTQPPSASG TPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNDNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGVV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	53
	人類 IgG1 重鏈（HC）	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAP GKGLEWVSGISWSSRDKGYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTDL ARYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT	54

		HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	
5-B07	VH-CDR1	FSSYSMNWVRQ APG	22
	VH-CDR2	SAISGSGGST YYADSVKGR	23
	VH-CDR3	ARDRVEMNQW LAD	24
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	RNNQRPS	25
	VL-CDR3	CAAWDDSLNG WV	26
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS SYSMNWVRQA PG**KGLEW**VSA ISGSGGSTYY ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ARDR VEMNQWLADW** GQGTLVTVSS	27
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI Y**RNNQRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C AAWDDSLNGW V**FGGGTKLTV LG	28
	鼠類免疫球蛋白（IgG2a）輕鏈（LC）	MGWSCIILFLVATATGVHSQSVLTQPPSASG TPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVF GGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETN KATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQ GMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWE RHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	62
	鼠類免疫球蛋白（IgG2a）重鏈（HC）	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDR VEMNQWLADWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVT LTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT	63

		VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCM VTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	
2-C06	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQ APG	29
	VH-CDR2	SGISGSGGYI HYADSVKGR	30
	VH-CDR3	ATYSSGLHDA FDI	31
	VL-CDR1	CTGSSSNIGA GYDVH	10
	VL-CDR2	DNNKRPS	32
	VL-CDR3	CAAWDDSLNG WV	26
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FS SYAMSWVRQA PG**KGLEWV**SG ISGSGGYIHY ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ATYS SGLHDAFDI**W GQGTLVTVSS	33
	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CTGSSSNIG AGYDVH**WYQQ LPGTAPKLLI **YDNNKRPS**GV PDRFSGSKSG TSASLAISGL RSEDEADYY**C AAWDDSLNGW** **V**FGGGTKLTV LG	34
2-F09	VH-CDR1	FKAYSMSWIR QAPG	35
	VH-CDR2	SGISNTGGST DFADSVKGR	36
	VH-CDR3	ARLGYSGYDD RGMDV	37
	VL-CDR1	CSGSSSNIGS NYVY	38
	VL-CDR2	GNSNRPS	39
	VL-CDR3	CQSYDSSLSG PVV	40
	VH	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT**FK AYSMSWIRQA PG**KGLEWV**SG ISNTGGSTDF ADSVKGR**FTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAMYYC**ARLG YSGYDDRGMD** VWGQGTLVTV SS	41

	VL	QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI S**CSGSSSNIG** **SNYVY**WYQQL PGTAPKLLIY **GNSNRPS**GVP DRFSGSKSGT SASLAISGLR SEDEADYY**CQ** **SYDSSLSGPV** VFGGGTKLTV LG	42

【0105】 在一些實施例中，本文所描述之抗 CTLA-4 抗體分子亦可包含呈現於下表 3 中之一個或兩個恆定區。

【0106】 表 3：本文所揭示之抗體之恆定區的序列

區	序列	SEQ. ID. NO:
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	43
CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	44

【0107】 在一些實施例中，抗 CTLA-4 抗體分子為由表提供於下 4 中之核苷酸序列中之一者編碼的分子。

【0108】 表 4：編碼抗 CTLA-4 抗體分子之特異性核苷酸序列

純系	編碼	序列	SEQ. ID. NO:
4-E03 γ1 重鏈	4-E03 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGC TTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGA CTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCC GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGCATTA GTTGGAGTAGTCGTGACAAAGGCTATGCGGA CTCTGTGAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCG TGTATTACTGTACCACAGATCTCGCTAGGTAC TGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCT CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA	45

		TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA	
4-E03 λ 輕鏈	4-E03 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGT CTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCA GGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCC AGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGT AATGATAACCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACC GATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGC CTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAG GATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGA TGACAGCCTGAATGGTGTGGTATTCGGCGGA GGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTCAGCCCA AGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC ACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCC GGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGAC CACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTT CATGA	46
5-B07 γ1 重鏈	5-B07 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGC TTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGC TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAG TGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGT GTATTACTGTGCGAGAGATCGGGTAGAGATG	47

		AACCAGTGGCTGGCCGACTGGGGCCAGGGT ACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	
5-B07 λ 輕鏈	5-B07 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGT CTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCA GGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCC AGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGG AATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACC	48

		GATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGC CTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAG GATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGA TGACAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCGGCGGA GGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTCAGCCCA AGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC ACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCC GGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGAC CACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTT CATGA	
2-C06 γ1 重鏈	2-C06 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGC TTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGC TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAG TGGCAGCGGTGGGTACATACACTATGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGT GTATTACTGTGCGACCTATAGCAGTGGCCTGC ATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGTACA CTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA	49

		AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	
2-C06 λ 輕鏈	2-C06 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGT CTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCA GGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCC AGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGAC AATAATAAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACC GATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGC CTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAG GATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGA TGACAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCGGCGGA GGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTCAGCCCA AGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC ACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCC GGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGAC CACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC	50

		GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTT CATGA	
2-F09 γ1 重鏈	2-F09 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGC TTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAAAGC CTATAGCATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATCA GTAACACGGGAGGTAGCACAGACTTCGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCC ATGTATTACTGTGCGAGATTGGGATATAGTGG CTACGACGACCGTGGTATGGACGTCTGGGGC CAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCCT CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG	51

		CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA ATGA	
2-F09 λ 輕鏈	2-F09 VL	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGT CTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC TTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT AATTATGTGTACTGGTATCAGCAGCTCCCAGG AACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAAC AGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGAT TCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGAT GAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAG CAGCCTGAGTGGTCCTGTGGTATTCGGCGGA GGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTCAGCCCA AGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC ACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCC GGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGAC CACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTT CATGA	52

【0109】 在一些實施例中，以下情況為有利的：抗體分子結合於人類 CTLA-4（hCTLA-4）及食蟹獼猴 CTLA-4（cmCTLA-4 或 cyno CTLA-4）。與表現於食蟹獼猴（亦稱為食用蟹之獼猴（crab-eating macaque）或食蟹猴（Macaca fascicularis））中之細胞上之 CTLA-4 的交叉反應性可為有利的，因為此能夠在不必須使用替代抗體的情況下測試猴中之抗體分子，其特定聚焦於耐受性。

【0110】 在一些實施例中，以下情況為有利的：抗體分子結合於人類 CTLA-4（hCTLA-4）及鼠類 CTLA-4（mCTLA-4）。此可為有利的，因為此使得能夠測試小鼠中之抗體分子，其中特定聚焦於效應及藥效學，而不必使用替代抗體。

【0111】 在一些實施例中，抗體分子結合於所有三種 hCTLA-4、cmCTLA-4 及 mCTLA-4。

【0112】 在一些實施例中，必需使用替代抗體來測試小鼠中之相關活體內模型中之抗體分子之功能活性。為了確保抗體分子在人類中的作用與替代抗體在小鼠活體內的結果之間的可比性，必須選擇具有與人類抗體分子相同活體外特徵的功能等效的替代抗體。

【0113】 在一些實施例中，特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子不結合人類 CD28。

【0114】 如本文所論述，第二抗體可特異性結合於 PD-1。在一些實施例中，特異性結合於 PD-1 之抗體分子係選自以下抗 PD-1 抗體之非限制性實例中之一或多者：

- 帕博利珠單抗（Pembrolizumab）（目前批准使用）；
- 納武單抗（Nivolumab）（目前批准使用）；
- 西米普利單抗（Cemiplimab）（目前批准使用）；
- 卡瑞利珠單抗（Camrelizumab）（目前批准使用）；
- 斯巴達珠單抗（Spartalizumab）（目前處於臨床研發中）；
- 多斯利單抗（Dostarlimab）（目前處於臨床研發中）；
- 緹勒珠單抗（Tislelizumab）（目前處於臨床研發中）；

- JTX-4014（目前處於臨床研發中）；
- 斯迪利單抗（Sintilimab）（IBI308）（目前處於臨床研發中）；
- 特瑞普利單抗（Toripalimab）（JS001）（目前處於臨床研發中）；
- AMP-224（目前處於臨床研發中）；
- AMP-514（MEDI0680）（目前處於臨床研發中）。

【0115】 在一較佳實施例中，特異性結合於 PD-1 之抗體為帕博利珠單抗、納武單抗、西米普利單抗或卡瑞利珠單抗。在一些實施例中，特異性結合於 PD-1 之抗體為此等抗體中之兩者或更多者的組合。在一較佳實施例中，特異性結合於 PD-1 之抗體為帕博利珠單抗。

【0116】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體分子為人類抗體分子。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體分子為人類化抗體分子。

【0117】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體分子為人類來源之抗體分子，意謂其來源於隨後已經修飾之人類抗體分子。

【0118】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體分子為人類 IgG1 抗體。

【0119】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為呈人類 IgG1 抗體形式之抗體，其展示與一或若干種活化性 Fc 受體之改良結合及/或經工程改造以用於改良與一或若干種活化性 Fc 受體之結合；因此，在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為經 Fc 工程改造之人類 IgG1 抗體。

【0120】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為鼠類或人類化鼠類 IgG2a 抗體。

【0121】 在一些實施例中，特異性結合於 PD-1 之第二抗體分子選自由以下組成之群組：人類抗體分子、人類化抗體分子及人類來源之抗體分子。

【0122】 在一些實施例中，特異性結合於 PD-1 之第二抗體分子選自由以

下組成之群組：全尺寸抗體、嵌合抗體、單鏈抗體及其抗原結合片段（例如 Fab、Fv、scFv、Fab'及$(Fab')_2$）。

【0123】 在一些實施例中，特異性結合於 PD-1 之第二抗體分子選自由以下組成之群組：人類 IgG 抗體、人類化 IgG 抗體及人類來源之 IgG 抗體。

【0124】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為與人類 PD-1 交叉反應之鼠類抗體。

【0125】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為單株抗體或單株來源之抗體分子。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為多株抗體。

【0126】 在一些實施例中，第二抗體分子可特異性結合於 PD-L1。在一些實施例中，特異性結合於 PD-L1 之抗體分子係選自以下抗 PD-L1 抗體之非限制性實例中之一或多者：

- 阿特珠單抗（Atezolizumab）（目前批准使用）；
- 德瓦魯單抗（Durvalumab）（目前批准使用）；
- 阿維魯單抗（Avelumab）（目前批准使用）；
- CS1001（目前處於臨床研發中）；
- KN035（恩沃利單抗（Envafolimab））-具有皮下調配物之 PD-L1 抗體，目前在美國、中國及日本進行臨床評估；
- CK-301（目前處於 Checkpoint Therapeutics 之臨床研發中）

【0127】 在一較佳實施例中，特異性結合於 PD-L1 之抗體為阿特珠單抗、德瓦魯單抗或阿維魯單抗。在一些實施例中，特異性結合於 PD-L1 之抗體為此等抗體中之兩者或更多者的組合。

【0128】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體分子為人類抗體分子。

【0129】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體分子為人類化抗體分子。

【0130】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體分子為人類來源之抗體分子，意謂其來源於隨後已經修飾之人類抗體分子。

【0131】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體分子為人類 IgG1 抗體。

【0132】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為呈人類 IgG1 抗體形式之抗體，其展示與一或若干種活化性 Fc 受體之改良結合及/或經工程改造以用於改良與一或若干種活化性 Fc 受體之結合；因此，在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為經 Fc 工程改造之人類 IgG1 抗體。

【0133】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為鼠類或人類化鼠類 IgG2a 抗體。

【0134】 在一些實施例中，特異性結合於 PD-L1 之第二抗體分子選自由以下組成之群組：人類抗體分子、人類化抗體分子及人類來源之抗體分子。

【0135】 在一些實施例中，特異性結合於 PD-L1 之第二抗體分子選自由以下組成之群組：全尺寸抗體、嵌合抗體、單鏈抗體及其抗原結合片段（例如 Fab、Fv、scFv、Fab'及$(Fab')_2$）。

【0136】 在一些實施例中，特異性結合於 PD-L1 之第二抗體分子選自由以下組成之群組：人類 IgG 抗體、人類化 IgG 抗體及人類來源之 IgG 抗體。

【0137】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為與人類 PD-L1 交叉反應之鼠類抗體。

【0138】 在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為單株抗體或單株來源之抗體分子。在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為多株抗體。

【0139】 如本文所描述，本發明涉及一種能夠表現特異性結合於 CTLA-4

之第一抗體分子之溶瘤病毒。

【0140】 如本文所用，術語「溶瘤」係指在分裂細胞（例如增生性細胞，諸如癌細胞）中選擇性複製之病毒的能力，其目的在於活體外或活體內減緩生長及/或裂解該分裂細胞，同時在非分裂（例如正常或健康）細胞中不顯示複製或顯示最小複製。

【0141】 「複製」（或任何複製形式，諸如「複製（replicate）」及「複製（replicating）」等）意謂可在核酸層面或較佳在感染性病毒顆粒層面發生之病毒的複製。此類溶瘤病毒可獲自目前鑑別之任何病毒成員。其可為天然溶瘤或可藉由修飾一或多種病毒基因而工程改造之天然病毒，以便提高腫瘤選擇性及/或分裂細胞中之優先複製，諸如涉及 DNA 複製、核酸代謝、宿主趨向性、表面附著、毒性、裂解及擴散之彼等（參見例如 Wong 等人, 2010, 《病毒（Viruses）》2: 78-106）。亦可設想將一或多種病毒基因置於事件或組織特異性調節元件（例如啟動子）控制下。

【0142】 例示性溶瘤病毒包括（但不限於）：呼腸孤病毒（reovirus）；塞內卡谷病毒（Seneca Valley virus，SVV）；水泡性口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）；新城雞瘟病毒（Newcastle disease virus，NDV）；單純疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）；麻疹病毒（morbillivirus）；腺病毒（adenovirus）；痘病毒（poxvirus）；反轉錄病毒（retrovirus）；麻疹病毒（measles virus）；多泡病毒（foamy virus）；α 病毒；慢病毒（lentivirus）；流感病毒（influenza virus）；辛德畢斯病毒（Sinbis virus）；黏液瘤病毒（myxoma virus）；棒狀病毒（rhabdovirus）；微小核糖核酸病毒（picornavirus）；柯薩奇病毒（coxsackievirus）；細小病毒（parvovirus）或其類似者。此類病毒為醫學及病毒學領域中熟習此項

技術者所已知。

【0143】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒係獲自疱疹病毒。疱疹病毒科係一種大型 DNA 病毒家族，其全部具有共同的結構，且由編碼 100-200 個基因之相對較大雙股、線性 DNA 基因體組成，該等基因被包裹在包封於脂質雙層膜中的二十面體衣殼內。儘管溶瘤疱疹病毒可衍生自不同類型之 HSV，尤其較佳為 HSV1 及 HSV2。疱疹病毒可經遺傳修飾以限制腫瘤中之病毒複製或降低其在非分裂細胞中之細胞毒性。例如，任何涉及核酸代謝的病毒基因均可能失活，例如胸苷激酶（Martuza 等人, 1991,《科學》252:854-6）、核糖核苷酸還原酶（RR）（Mineta 等人, 1994,《癌症研究（Cancer Res.）》54:3363-66），或尿嘧啶-N-糖基化酶（Pyles 等人, 1994,《病毒學雜誌（J.Virol.）》68:4963-72）。另一態樣涉及具有編碼毒性因子（諸如 ICP34.5 基因）之基因功能缺陷的病毒突變體（Chambers 等人, 1995,《美國國家科學院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）》92: 1411-5）。溶瘤疱疹病毒之代表性實例包括 NV1020（例如 Geevarghese 等人, 2010,《人類基因療法（Hum. Gene Ther.）》21(9): 1119-28）及 T-VEC（Harrington 等人, 2015,《抗癌治療專家評論（Expert Rev. Anticancer Ther.）》 15(12):1389-1403）。

【0144】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒係獲自腺病毒。方法在此項技術中可用於工程改造溶瘤腺病毒。一種有利策略包括用腫瘤選擇性啟動子置換病毒啟動子或修飾 E1 腺病毒基因產物以使其/與腫瘤細胞中改變之 p53 或視網膜母細胞瘤（Rb）蛋白之結合功能失活。在天然情形下，腺病毒 E1B55kDa 基因與另一腺病毒產物協作以使 p53 失活（p53 在癌細胞中頻繁失調），因此預防細胞凋亡。溶瘤腺病毒之代表性實例包括 ONYX-015（例如 Khuri 等人, 2000,《自然

醫學雜誌（Nat. Med）》6(8): 879-85）及 H101 亦命名為 Oncorine（Xia 等人, 2004,《癌症（Ai Zheng）》 23(12): 1666-70）。

【0145】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒為溶瘤痘病毒。如本文所用，術語「痘病毒」係指屬於痘病毒病毒科之病毒，尤其較佳為屬於脊椎動物痘病毒亞科且更佳屬於正痘病毒屬。在本發明之上下文中，痘瘡病毒、牛痘病毒、金絲雀痘病毒、鼠痘病毒、黏液瘤病毒為特別適當的。此類痘病毒之基因體序列可在此項技術及特定資料庫（例如 GenBank，寄存編號分別為 NC_006998、NC_003663 或 AF482758.2、NC_005309、NC_004105、NC_001132）中獲得。

【0146】 在特定及較佳實施例中，此類溶瘤痘病毒為溶瘤痘瘡病毒。痘瘡病毒為以 200 kb 雙股 DNA 基因體為特徵之痘病毒家族之成員，該基因體編碼許多病毒酶及使得病毒能夠獨立於宿主細胞機構複製之因子。大部分痘瘡病毒顆粒為胞內的（用於細胞內成熟病毒顆粒之 IMV）具有單一脂質包膜且保持在感染細胞之胞溶質中直至溶解。另一感染性形式為雙包膜顆粒（用於胞外包膜病毒顆粒之 EEV），其自經感染細胞萌芽而不使其裂解。儘管它可以衍生自任何痘瘡病毒株，但特別較佳為 Elstree、Wyeth、Copenhagen、Lister 及 Western Reserve 病毒株。除非另外指明，否則本文所用之基因命名法係哥本哈根痘瘡病毒株之命名法。然而，哥本哈根與其他痘瘡病毒株之間的對應關係一般於文獻中可獲得。

【0147】 較佳地，此類溶瘤痘瘡病毒係藉由改變一或多種病毒基因來修飾。該等修飾較佳導致不存在病毒蛋白合成或合成缺陷型病毒蛋白，其不能確保在正常條件下由未經修飾之基因產生之蛋白質的活性。例示性修飾揭示於文獻中且其目的為改變 DNA 代謝、宿主毒力、IFN 路徑（參見例如，Guse 等人, 2011,《生物治療專家意見（Expert Opinion Biol. Ther.）》 11(5): 595-608）及類似特性

所涉及之病毒基因的修飾。改變病毒基因座之修飾涵蓋病毒基因或其調控元件內一或多個核苷酸（相鄰或不相鄰）之缺失、突變及/或取代。修飾可以藉由熟習此項技術者已知之多種方式，使用習知重組技術進行。

【0148】 更佳地，此類溶瘤痘瘡病毒係藉由改變編碼胸苷激酶之基因（基因座 J2R）來修飾。胸苷激酶（TK）酶涉及去氧核糖核苷酸之合成。TK 係正常細胞中病毒複製所需的，因為該等細胞一般具有低濃度核苷酸，但其在含有高核苷酸濃度之分裂細胞中並非必需的。

【0149】 或者或以組合形式，此類溶瘤痘瘡病毒係藉由改變至少一個基因或編碼核糖核苷酸還原酶（RR）之兩個基因而修飾。在天然情形下，此酶催化核糖核苷酸還原成去氧核糖核苷酸，其代表 DNA 生物合成中之關鍵步驟。病毒酶在次單元結構中類似於哺乳動物酶，其由兩個異源次單元組成，分別由 I4L 及 F4L 基因座編碼之經設計的 R1 及 R2。在本發明之上下文中，I4L 基因（編碼 R1 大次單元）或 F4L 基因（編碼 R2 小次單元）或兩者可失活（例如，如 WO2009/065546 及 Foloppe 等人, 2008,《基因治療（Gene Ther.）》, 15: 1361-71 中所描述）。J2R、I4L 及 F4L 基因之序列及其在各種痘病毒之基因體中之位置可於公共資料庫中獲得。

【0150】 因此，在一些實施例中，溶瘤病毒缺乏胸苷激酶（TK）及/或核糖核苷酸還原酶（RR）活性。在一些實施例中，溶瘤病毒為缺乏胸苷激酶（TK）及/或核糖核苷酸還原酶（RR）活性之痘瘡病毒。

【0151】 在一些實施例中，溶瘤病毒包含編碼如本文所定義之第一抗體分子之核苷酸序列。

【0152】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含編碼與上表 2 中所闡述之序

列具有至少 80%一致性之胺基酸序列的核苷酸序列。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 2 中所闡述之序列具有至少 85%一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 2 中所闡述之序列具有至少 90%一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 2 中所闡述之序列具有至少 95%一致性之胺基酸序列。

【0153】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含編碼以下之核苷酸序列：SEQ.ID.NO: 20 及 ID.NO: 21。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含編碼以下之核苷酸序列：SEQ.ID.NO: 27 及 ID.NO: 28。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含編碼以下之核苷酸序列：SEQ.ID.NO: 33 及 ID.NO: 34。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含編碼以下之核苷酸序列：SEQ.ID.NO: 41 及 ID.NO: 42。

【0154】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 4 中所闡述之序列具有至少 80%一致性之核苷酸序列。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 4 中所闡述之序列具有至少 85%一致性之核苷酸序列。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 4 中所闡述之序列具有至少 90%一致性之核苷酸序列。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含與上表 4 中所闡述之序列具有至少 95%一致性之核苷酸序列。

【0155】 在一些實施例中，核苷酸序列包含選自由 SEQ ID NO: 45 至 52 組成之群組的序列或由其組成。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含 SEQ.ID.NO: 45 及 46。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含 SEQ.ID.NO: 47 及 48。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含 SEQ.ID.NO: 49 及 50。在一些實施例中，此類溶瘤病毒包含 SEQ.ID.NO: 51 及 52。

【0156】 一些溶瘤病毒具有容納足夠大的 DNA 插入的能力以適應全長人

類抗體序列的整合。減毒痘瘡病毒及單純疱疹病毒為治療性溶瘤病毒之實例，其基因體足夠大以允許整合全長 IgG 抗體序列（Chan 及 McFadden 2014, Bommareddy, Shettigar 等人, 2018）。全長 IgG 抗體已成功整合至溶瘤痘瘡病毒中，導致在病毒易感宿主細胞（例如癌細胞）感染後全長 IgG 抗體的表現及胞外釋放（產生）（Kleinpeter 等人，2016）。腺病毒亦可經工程改造為編碼全長 IgG 抗體，彼等抗體在細胞感染時功能性地產生及分泌（Marino 等人，2017）。

【0157】 在一較佳實施例中，此類溶瘤病毒為一種痘病毒（例如痘瘡病毒），其缺乏 TK 活性（由 J2R 基因座改變引起）或缺乏 TK 及 RR 活性（由 J2R 基因座及編碼 RR 之 I4L 及/或 F4L 基因座中之至少一者改變引起）且包含（a）編碼 SEQ.ID.NO: 20 及 ID.NO: 21 之核苷酸序列或（b）編碼 SEQ.ID.NO: 27 及 ID.NO: 28 之核苷酸序列或（c）編碼 SEQ.ID.NO: 33 及 ID.NO: 34 之核苷酸序列或（d）編碼 SEQ.ID.NO: 41 及 ID.NO: 42 之核苷酸序列。

【0158】 在一些實施例中，可藉由在相關基因座（亦即 J2R、I4L 及/或 F4L 基因座）內引入編碼第一抗體分子的核苷酸序列來破壞 TK 及 RR 活性。在一些較佳實施例中，病毒包含插入在病毒 J2R 基因座處之編碼第一抗體分子之重鏈的核苷酸序列，及/或包含插入在病毒 I4L 基因座處之編碼第一抗體分子之輕鏈的核苷酸序列。

【0159】 適當時，插入本文所描述之溶瘤病毒中的核苷酸序列包括一或多個額外的調控元件以促進表現、運輸及生物活性可能為有利的。舉例而言，可包括信號肽以促進生產細胞（例如經感染細胞）外部之分泌。信號肽通常插入編碼多肽之 N 末端緊接在 Met 起始子之後。信號肽之選擇範圍較寬且係熟習此項技術者可獲得的。舉例而言，來源於另一免疫球蛋白（例如重鏈 IgG）之信號肽可

用於本發明之情形中以允許在生產細胞外部分泌本文所描述之抗 CTLA4 抗體。出於說明之目的，一種可指 SEQ ID NO: 53 及 SEQ ID NO: 54，其包含本文所描述之配備有源自 IgG 之肽信號的 4--E03 抗體之輕鏈及重鏈。

【0160】 尤其較佳之溶瘤病毒係一種痘瘡病毒（例如哥本哈根病毒株），其缺乏 TK 及 RR 活性（例如由 J2R 基因座及 I4L 基因座兩者之改變產生）且包含編碼 SEQ.ID.NO: 20 及 SEQ ID.NO: 21 或 SEQ.ID.NO: 53 及 SEQ ID.NO: 54 之核苷酸序列。

【0161】 在一些實施例中，此類溶瘤病毒可進一步包含額外治療上相關之核苷酸序列，諸如編碼免疫調節多肽之核苷酸序列（亦即直接或間接刺激免疫反應所涉及之多肽）。適合之免疫調節多肽之代表性實例包括（但不限於）細胞介素及趨化介素，其特異性偏好顆粒球巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）且尤其為人類、非人類靈長類動物或鼠類 GM-CSF。

【0162】 因此，在一些實施例中，能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子的溶瘤病毒（例如痘瘡病毒）進一步包含編碼 GM-CSF，較佳人類 GM-CSF（例如具有 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56）或鼠類 GM-CSF（例如具有 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58）之核苷酸序列。

【0163】 額外核苷酸序列可容易地藉由標準分子生物學技術（例如 PCR 擴增、cDNA 選殖、化學合成）使用此項技術中可獲得之序列資料及本文所提供之資訊獲得。尤其較佳之溶瘤病毒係一種痘瘡病毒（例如哥本哈根病毒株），其缺乏 TK 及 RR 活性（例如由 J2R 基因座及 I4L 基因座兩者之改變產生）且包含編碼 SEQ.ID.NO: 20 及 ID.NO: 21 或 SEQ.ID.NO: 53 及 SEQ ID.NO: 54 之核苷酸序列及編碼 GM-CSF，尤其偏好人類 GM-CSF（例如具有 SEQ ID NO: 55 或 SEQ

ID NO: 56）或鼠類 GM-CSF（例如具有 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58）之核苷酸序列。

【0164】 下表提供本文所提及之 GM-CSF 之序列：

	序列	SEQ. ID. NO
無信號肽之人類 GM-CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEM NETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKL KGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENL KDFLLVIPFDCWEPVQE	55
具有信號肽之人類 GM-CSF	MWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQ EARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQ TRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTP ETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	56
無信號肽之鼠類 GM-CSF	APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEE VEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKG ALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKT FLTDIPFECKKPVQK	57
具有信號肽之鼠類 GM-CSF	MWLQNLLFLGIVVYSLSAPTRSPITVTRPWKHVEAIK EALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRL KIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYYQTYCPPTPETD CETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK	58

【0165】 另外，可藉由修飾一或多個密碼子最佳化插入此類溶瘤病毒中之核苷酸序列以在特定宿主細胞或個體中提供高水準表現。關於密碼子使用之最佳化，亦可設想各種修飾以防止稀少的非最佳密碼子聚集在集中區域及/或抑制或修飾預期會對表現量產生不利影響之「負」序列元件。該等負序列元件包括（但不限於）具有極高（>80%）或極低（<30%）GC 含量之區域；富含 AT 或富含 GC 之序列伸長段；不穩定的直接或反向重複序列；RA 二級結構；及/或內部隱蔽調控元件，諸如內部 TATA 盒、chi 位點、核糖體進入位點及/或剪接供體/受體位點。

【0166】 在一些實施例中，核苷酸序列處於適合調控元件控制下以便使其在宿主細胞或個體中恰當表現。如本文所用，術語「調控元件」係指允許、促進或調節編碼核苷酸序列在給定宿主細胞或個體中之表現的任何元件，包括其在表現細胞中或表現細胞外之複製、重複、轉錄、剪接、轉譯、穩定性及/或轉運。熟習此項技術者應瞭解，調控元件之選擇可視諸如以下因素而定：核苷酸序列本身、其所插入之病毒、宿主細胞或個體、所需表現量等。啟動子具有特殊重要性。在本發明之上下文中，其可為組成性引導核苷酸序列之表現，該核苷酸序列在許多類型宿主細胞中控制或對某些宿主細胞特異或響應於特定事件或外源因素（例如藉由溫度、營養添加劑、激素等）或根據病毒週期之階段（例如晚期或早期）而調節。適於病毒介導之表現的啟動子為此項技術中已知的。

【0167】 溶瘤痘病毒表現之代表性實例包括（但不限於）痘苗 p7.5K、pH5.R、p11K7.5、TK、p28、p11、pB2R、pA35R、K1L 及 pSE/L 啟動子（Erbs 等人，2008，《癌症基因療法（Cancer Gene Ther.）》15(1): 18-28；Orubu 等人。2012,《公共科學圖書館·綜合（PloS One）》7: e40167）、早期/晚期嵌合啟動子及合成啟動子（Chakrabarti 等人, 1997,《生物技術（Biotechniques）》23: 1094-7；Hammond 等人, 1997,《病毒學方法雜誌（J.Virol Methods）》66: 135-8；及 Kumar 及 Boyle，1990，《病毒學（Virology）》179: 151-8）。在較佳實施例中，本文所描述之抗體之輕鏈及重鏈的核苷酸序列分別置放於具有相同轉錄強度之啟動子的控制下，且較佳地在相同啟動子（例如 p7.5K，諸如 SEQ ID NO: 59 中所描述之啟動子或 pH 5.R，諸如 SEQ ID NO: 60 中所描述之啟動子）的控制下，以獲得針對兩個鏈之類似表現量，且因此抗體作為異源四聚體蛋白的最佳組裝（亦即，避免過量的非結合鏈）。額外核苷酸序列（例如編碼 GM-CSF）可置於

不同啟動子（例如 pSE/L，諸如 SEQ ID NO: 61 中所描述之啟動子）下。

【0168】 下表提供上文提及之啟動子之序列：

	序列	**SEQ ID NO:**
啟動子 p7.5K	CCACCCACTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATA ATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAAT ATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCAT AAAGAACAGT	59
啟動子 pH5.R	TTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAATAAATACAAAGG TTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAA TCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG	60
啟動子 pSE/L	AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTGGAATATAAA TA	61

【0169】 藉由習知手段，使用適當限制酶或較佳藉由同源重組來插入此類溶瘤病毒之基因體中的核苷酸序列（可能配備有適當調控元件）。核苷酸序列可獨立地插入在病毒基因體之任何位置。可考慮各種插入位點，例如在非必需病毒基因中、在基因間區域中或在此類溶瘤病毒之基因體之非編碼部分中。J2R 基因座及/或 I4L 基因座特別適合於為痘病毒（例如溶瘤痘瘡病毒）之溶瘤病毒。在核苷酸序列插入至病毒基因體中後，插入位點處之病毒基因座可能至少部分缺失。在一個實施例中，此缺失或部分缺失可引起由完全或部分缺失之基因座編碼之病毒基因產物的表現抑制，從而產生該病毒功能缺陷型病毒。尤其較佳之溶瘤病毒係 TK 及/或 RR 缺陷型痘瘡病毒，其包含插入 J2R 基因座處之編碼重鏈的卡匣及插入 I4L 基因座處之編碼輕鏈的卡匣。編碼額外 GM-CSF 編碼核苷酸序列之卡匣可插入病毒基因體之另一位置或 J2R 或 I4L 基因座中，偏好在 I4L 基因座處插入。

【0170】 本發明亦提供用於在適合的宿主細胞（生產細胞）中產生此類本

文所描述之溶瘤病毒，且尤其溶瘤痘病毒之方法。在一些實施例中，此類方法包含病毒基因體與轉移質體之間的同源重組之一或多個步驟，該轉移質體包含待插入之核苷酸序列（可能具有調控元件），該（等）核苷酸序列在 5'及 3'中側接有分別存在於插入位點上游及下游的病毒序列。該轉移質體可藉由常規技術（例如藉由轉染）產生且引入至宿主細胞中。病毒基因體可藉由感染引入至宿主細胞中。各側接病毒序列之尺寸可自核苷酸序列之各側上之至少 100 bp 且至多 1500 bp（較佳為 200 至 550 bp 且更佳為 250 至 500 bp）變化。允許產生此類溶瘤病毒之同源重組較佳在經培養細胞株（例如 HeLa、Vero）中或在獲自受精蛋之雞胚胎纖維母細胞（CEF）細胞中進行。

【0171】 在一些實施例中，可藉由使用選擇及/或可偵測基因促進鑑別併有編碼抗 CTLA4 之核苷酸序列及可能額外核苷酸序列（例如 GM-CSF）之溶瘤病毒。

【0172】 在較佳實施例中，轉移質體進一步包含對 GPT 基因（編碼鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶）具有特定偏好之選擇標記，允許在選擇性培養基（例如在黴酚酸、黃嘌呤及次黃嘌呤存在下）或編碼可偵測基因產物（諸如 GFP、e-GFP 或 mCherry）的可偵測基因中生長。另外，亦可考慮在該選擇或可偵測基因中使用能夠提供雙股斷裂之核酸內切酶。該核酸內切酶可呈蛋白質形式或由表現載體表現。

【0173】 一旦產生，即可使用習知技術將此類溶瘤病毒擴增至適合之宿主細胞中，包括在適合之條件下培養經轉染或經感染之宿主細胞以便允許產生及回收感染性顆粒。

【0174】 本發明亦係關於一種用於產生本文所描述之溶瘤病毒之方法。較

佳地，該方法包含以下步驟：a）製備生產細胞株，b）用溶瘤病毒轉染或感染所製備之生產細胞株，c）在適合條件下培養經轉染或經感染之生產細胞株以便允許產生病毒，d）自該生產細胞株之培養物回收所產生之病毒及視情況選用之 e）純化該回收之病毒。

【0175】 在一些實施例中，生產細胞選自由以下組成之群組：哺乳動物（例如人類或非人類）細胞，諸如 HeLa 細胞（例如 ATCC-CRM-CCL-2™ 或 ATCC-CCL-2.2™）、HER96、PER-C6（Fallaux 等人, 1998，《人類基因療法（Human Gene Ther.）》9: 1909-17）、倉鼠細胞株，諸如 BHK-21（ATCC CCL-10）等及禽類細胞，諸如 WO2005/042728、WO2006/108846、WO2008/129058、WO2010/130756、WO2012/001075 中所描述之細胞株，以及由自受精卵獲得的雞胚製備的原代雞胚纖維母細胞（CEF）。生產細胞較佳在適當培養基中培養，必要時，該培養基可補充有或不補充有血清及/或適合生長因子（例如，較佳不含動物或人類衍生產物之化學成分確定的培養基）。適當的培養基可由熟習此項技術者視所選生產細胞而容易地進行選擇。該等培養基為市售的。在感染之前，較佳在包含於+30℃與+38℃之間（更佳在約+37℃下）的溫度下培養生產細胞 1 至 8 天之間。若需要，則可進行 1 天至 8 天之數個繼代以便增加細胞總數。

【0176】 在步驟 b）中，生產細胞在適當條件下使用適當感染倍率（MOI）經溶瘤病毒感染以允許生產細胞之生產性感染。出於說明之目的，適當 MOI 在 10^{-3} 至 20 範圍內，且 MOI 之特定偏好包含 0.01 至 5 且更佳 0.03 至 1。在培養基中進行感染步驟，該培養基可與用於培養生產細胞之培養基相同或不同。

【0177】 在步驟 c）中，經感染之生產細胞在熟習此項技術者熟知之適當條件下經培養直至後代病毒顆粒產生為止。經感染生產細胞之培養亦較佳在培

養基中進行，該培養基可與用於生產細胞之培養及/或用於感染步驟的培養基/培養基相同或不同，在+32℃與+37℃之間的溫度下進行 1 至 5 天。

【0178】 在步驟 d）中，自培養物上清液及/或生產細胞中收集步驟 c）中產生之病毒顆粒。自生產細胞中回收可能需要一個步驟，允許破壞生產細胞膜以釋放病毒。生產細胞膜之破壞可藉由熟習此項技術者熟知之各種技術誘導，包括（但不限於）冷凍/解凍、低滲裂解、超聲處理、微流體化、高剪切（亦稱為高速）均質化或高壓均質化。

【0179】 所回收之溶瘤病毒可在以如本文所描述之劑量分佈及使用之前至少部分純化。大量純化步驟及方法可用於此項技術中，包括例如澄清、酶處理（例如核酸內切酶、蛋白酶等）、層析及過濾步驟。適當方法描述於此項技術中（參見例如 WO2007/147528；WO2008/138533、WO2009/100521、WO2010/130753、WO2013/022764）。

【0180】 在一個實施例中，本發明亦提供感染有能夠表現本文所描述之第一抗體分子之溶瘤病毒的細胞。

【0181】 能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒及特異性結合於 PD-1 及/或 PD-1 之第二抗體分子的組合係用於治療患者之癌症，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【0182】 包括個體可為哺乳動物或非哺乳動物。較佳地，哺乳動物個體為人類，或為哺乳動物，諸如馬，或牛，或綿羊，或豬，或駱駝，或狗，或貓。最佳地，哺乳動物個體為人類。

【0183】 患者可展現表明其患有癌症之徵象或症狀。「展現」包括個體呈現癌症症狀及/或癌症診斷標記，及/或可量測、及/或評估及/或定量癌症症狀及/

或癌症診斷標記。

【0184】 對於熟習醫學者而言將容易地顯而易見，癌症症狀及癌症診斷標記將為哪些及如何量測及/或評估及/或定量癌症症狀之嚴重程度是否降低或上升，或癌症診斷標記是否減少或增加；以及癌症症狀及/或癌症診斷標記可如何用於形成癌症之預後。

【0185】 癌症治療通常以治療療程形式投予，換言之治療劑經一段時間投予。治療療程之時間長度將視多種因素而定，該等因素可包括所投予之治療劑之類型、所治療之癌症之類型、所治療之癌症之嚴重程度及個體之年齡及健康狀況以及其他原因。

【0186】 「在治療期間」包括個體當前正接受治療療程，及/或接受治療劑，及/或接受治療劑療程。

【0187】 如上文所論述，能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒與特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子的組合尤其用於治療患者之癌症，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【0188】 因此，在一些實施例中，冷腫瘤由第一及第二抗體分子治療。

【0189】 熟習此項技術者應瞭解，確定冷腫瘤是否已經「治療」涉及用於任何其他類型之腫瘤的相同種類之確定。舉例而言，技術人員將尋找可使用 CT 掃描來量測的諸如腫瘤縮小（在注射腫瘤及未注射腫瘤中）及/或無進展存活期及/或總存活期之徵象。在其他情況下，此可為更主觀的效果，諸如降低個體之所報導之症狀的嚴重程度。響應於治療抗體之投予之個體的治療效果之量測結果為本領域中眾所周知的。

【0190】 「冷腫瘤」係指發炎性免疫細胞浸潤不良之腫瘤，最值得注意地

為 T 細胞且尤其為 $CD8^+$ T 細胞。冷腫瘤在臨床上高度相關，因為腫瘤免疫浸潤且尤其 CD8+ T 細胞浸潤已廣泛地表明與具有不同組織學特徵及解剖位置之癌症中之較長無病存活期（DFS）及/或總存活期（OS）相關。這已在原發性及轉移性環境中得到證實（Bruni 等人，2020），包括黑色素瘤、大多數鱗狀細胞癌（SCC）、大細胞肺癌及若干類腺癌（Galon 等人，2006；Fridman 等人，2012；Fridman 等人，2017；Hu 等人，2018）且關聯斌且預測對 ICB 的反應（Galon 及 Bruni，2019）。

【0191】 例如，最近表明在人類實體癌患者中，$CD8^+$ T 細胞密度與黑色素瘤（Tumeh 等人，2014）、腎細胞癌（McDermott、Huseni 等人，2018）及 NSCLC（Thommen、Koelzer 等人，2018）中抗 CTLA-4 及 PD-1/PD-L1 抗體對 ICB 的反應/進展相關。同樣，應充分瞭解，臨床前小鼠腫瘤模型在免疫浸潤方面在數量上及在質量上都存在差異，而 B16/C57BL6 模型在免疫細胞浸潤方面尤其稀缺，包括 $CD8^+$ T 細胞（Mosely 等人，2017）。此外，與人類「冷腫瘤」相似，B16/C57BL6 模型對具有抗 CTLA-4 及/或抗 PD-1/L1 的全身性 ICB 具有特別抗性，使其適用於確定有助於鑑別出克服對全身性 ICB 具有抗性之「冷腫瘤」的療法。

【0192】 已設計出可量化 PD-L1 的腫瘤細胞、免疫細胞或複合細胞水準的臨床相關檢測方法，且在臨床中用於幫助鑑別用抗 PD-1/L1 ICB 試劑（例如帕博利珠單抗）治療的患者（參見處方資訊 KEYTRUDA®第 2.1 章節，其描述如何選擇進行治療的患者-可在 **https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s096lbl.pdf** 中獲得）。

【0193】 基於多色免疫螢光之最新資料鑑別出侵襲性邊緣 $CD8^+$ T 細胞密度作為最佳完全預測性參數，且腫瘤 $CD8^+$ T 細胞密度係作為針對黑色素瘤中之 PD-1 阻斷療法之反應/進展的第二最佳之預測因子（Tumeh 等人, 2014）。此外，主成分分析表明，CD8 浸潤、PD-1 及 PD-L1 與治療結果顯著相關。此等資料支持 $CD8^+$ T 細胞密度可為鑑別具有冷腫瘤之患者的適用方式。最近，開發了一種名為「免疫評分（Immunoscore）」的基於免疫之檢測方法，用於原位量化在癌症患者之腫瘤中之 $CD3^+$ $CD8^+$ T 細胞浸潤（Bruni 等人，2020；Galon 等人，2006；Lanzi 等人，2020）。

【0194】 免疫評分係一種基於免疫組織化學及數位病理學之評分系統，用於評估腫瘤中之 $CD3^+$ 及 $CD8^+$ T 細胞的密度及其侵襲性邊緣。簡言之，在自動染色儀中用抗 CD3 及抗 CD8 抗體來染色福馬林固定石蠟包埋之腫瘤塊的兩個相鄰載玻片。接著掃描載玻片且使用數位影像量化具有數位病理學軟體之相關細胞之密度。該等密度最終轉譯成免疫評分，範圍介於低免疫評分（I0）至高免疫評分（I4）。

【0195】 已藉由 Galon 及 Bruni 提出一種使免疫評分與「熱及冷腫瘤」之概念比對的方法（Galon 等人, 2019；Angell 等人, 2020）。使用此方法，基於 T 細胞浸潤將腫瘤分為四個類別：熱免疫腫瘤；改變之免疫抑制免疫腫瘤；改變之排除免疫腫瘤；及冷腫瘤。

【0196】 此等四種類型腫瘤之特徵詳細描述於 Galon 等人, 2019 之 Box 1 中，其根據以下特徵描述腫瘤類型：

1. 熱免疫腫瘤（在本文中亦稱為熱腫瘤）

- 高度 T 細胞及細胞毒性 T 細胞浸潤（高免疫評分）

- 檢查點活化（程式化細胞死亡蛋白 1（PD-1）、細胞毒性 T 淋巴球相關抗原 4（CTLA-4）、T 細胞免疫球蛋白黏蛋白受體 3（TIM-3）及淋巴球活化基因 3（LAG-3））或以其他方式損害 T 細胞功能（例如，細胞外鉀驅動的 T 細胞抑制）

2. 改變之免疫抑制免疫腫瘤

- T 細胞及細胞毒性 T 細胞浸潤較差（儘管不存在）（中等免疫評分）

- 存在可溶性抑制介質（轉化生長因子-β（TGFβ）、介白素 10（IL-10）及血管內皮生長因子（VEGF））

- 存在免疫抑制細胞（骨髓衍生之抑制細胞及調節 T 細胞）

- 存在 T 細胞檢查點（PD-1、CTLA-4、TIM-3 及 LAG-3）

3. 改變之排除免疫腫瘤

- 腫瘤床內部無 T 細胞浸潤；腫瘤邊界處之 T 細胞累積（侵襲性邊緣）（中等免疫評分）

- 致癌路徑之活化

- 腫瘤微環境之表觀遺傳調控及再程式化

- 異常腫瘤血管系統及/或基質

- 低氧症

4. 冷免疫腫瘤（在本文中亦稱為冷腫瘤）

- 腫瘤內及腫瘤邊緣處不存在 T 細胞（低免疫評分）

- T 細胞激活失敗（腫瘤突變負荷低、抗原呈遞差及對 T 細胞殺傷的內在不敏感性）。

【0197】 因此，在一些實施例中，若患者具有符合如上文所定義之經改變

之免疫抑制免疫腫瘤、經改變之排除免疫腫瘤或冷免疫腫瘤之定義的腫瘤，則該患者視為患有冷腫瘤。

【0198】 應瞭解，以上類型之腫瘤中之每一者將對 T 細胞檢查點抑制具有不同反應水準，其中冷免疫腫瘤具有最低反應水準（不存在反應），繼之以經改變之排除腫瘤及經改變之免疫抑制免疫腫瘤（其具有次佳反應水準）。

【0199】 本文所用之「冷腫瘤」之定義(亦即免疫細胞(例如 CD3+及 CD8+ T 細胞）浸潤較差之腫瘤）涵蓋經典的冷免疫腫瘤、經改變之排除腫瘤及經改變之免疫抑制腫瘤，因為所有此等類別均由不佳（免疫改變）T 細胞浸潤或不存在（免疫排除及冷）T 細胞浸潤來定義。此相當於免疫評分為 I、II 或 III 但不為 IV 的癌症患者（後者為 T 細胞發炎的腫瘤）。因此，本發明適用於免疫評分為 I、II 及 III 的患者，但不適用於 IV。

【0200】 因此，在一些實施例中，若腫瘤具有 I 或 II 或 III 之免疫評分，則將患者視為患有冷腫瘤。

【0201】 熟習此項技術者應瞭解，除免疫評分或 T 細胞密度外之其他分析法及技術可幫助鑑別尤其具有抗性之「冷型」癌症。

【0202】 在一些實施例中，冷腫瘤具有無能（或無反應）淋巴球。藉此吾等意謂淋巴球未能對抗原作出反應。測定無反應淋巴球之方法為此項技術中所熟知。

【0203】 在一些其他實施例中，冷腫瘤具有低水準之 CD3 陽性細胞。舉例而言，冷腫瘤可具有小於 10% CD3 陽性細胞(呈腫瘤中總細胞之百分比形式)，亦即小於 5%、小於 4%、小於 3%、小於 2%、小於 1%、小於 0.5%、小於 0.1% 或無 CD3 陽性細胞。量測 CD3 陽性細胞百分比之方法為此項技術中已知的。

【0204】 如上文所論述，如本文所描述之冷腫瘤為通常不由免疫系統良好靶向之腫瘤。在一些替代或額外實施例中，此類冷腫瘤亦可分為以下類型：

- 免疫荒漠型腫瘤，亦即由於缺乏腫瘤浸潤性 T 細胞，腫瘤中存在免疫反應之完全缺乏。

- 免疫排除型腫瘤，亦即反應性 T 細胞生成但不能滲透腫瘤以建立針對其之反應，T 細胞可存在於腫瘤周邊。

- 具有不良免疫浸潤之腫瘤，亦即降低免疫細胞（T 細胞）滲透至腫瘤微環境中之水準。

【0205】 如本文所用，「冷腫瘤」亦包括所有免疫荒漠型腫瘤、免疫排除型腫瘤及免疫浸潤較差之腫瘤。或者或除上文所描述之冷腫瘤（作為經改變之免疫抑制腫瘤、經改變之排除腫瘤或冷免疫腫瘤）之定義以外，可使用此等定義。在一些實施例中，經改變之免疫抑制免疫腫瘤對應於免疫浸潤較差之腫瘤。在一些實施例中，經改變之排除免疫腫瘤對應於免疫排除型腫瘤。在一些實施例中，冷免疫腫瘤對應於免疫荒漠型腫瘤。

【0206】 「包含冷腫瘤或由其組成」係指可能由冷腫瘤及非冷腫瘤組成的癌症。舉例而言，若原始癌症（其可為冷腫瘤）已轉移且形成非冷腫瘤之繼發性腫瘤，則可能會發生此情況。本文中之患者可患有多種腫瘤，其中僅一者需要滿足冷腫瘤之需求以使本發明受益。在其他實施例中，患者可具有視為冷腫瘤的單一腫瘤。

【0207】 可屬於此等「冷腫瘤」亞型之癌症包括但不限於以下：黑色素瘤、胰臟癌、前列腺癌、大腸直腸癌、肝細胞癌、肺癌、膀胱癌、腎癌、胃癌、子宮頸癌、默克爾細胞癌（Merkel cell carcinoma）、卵巢癌、頭頸癌、間皮瘤或乳癌。

【0208】 上述癌症中之每一者為熟知的，且症狀及癌症診斷標記經充分描述，用於治療彼等癌症之治療劑亦經充分描述。因此，症狀、癌症診斷標記及用於治療上文所提及之癌症類型之治療劑將為熟習醫學者所已知。

【0209】 大量癌症之診斷、預後及進展的臨床定義依賴於稱為分期之某些分類方法。彼等分期系統用於整理多種不同的癌症診斷標記及癌症症狀以提供癌症之診斷及/或預後及/或進展之概述。熟習腫瘤學者應知曉如何使用分期系統評估癌症之診斷及/或預後及/或進展，且應使用哪些癌症診斷標記及癌症症狀進行評估。

【0210】 「癌症分期」包括 Rai 分期，其包括階段 0、階段 I、階段 II、階段 III 及階段 IV，及/或 Binet 分期，其包括階段 A、階段 B 及階段 C，及/或 Ann Arbour 分期，其包括階段 I、階段 II、階段 III 及階段 IV。

【0211】 已知癌症可導致細胞形態異常。此等異常通常可再現地出現於某些癌症中，此意謂檢查此等形態之變化（另外稱為組織學檢查）可用於癌症之診斷或預後。用於觀察樣品以檢查細胞之形態及製備用於觀察之樣品的技術為本領域中熟知的；舉例而言，光學顯微鏡法或共焦顯微鏡法。

【0212】 「組織學檢查」包括存在較小成熟淋巴球，及/或存在具有窄細胞質邊界之較小成熟淋巴球、存在具有缺乏可辨別核仁之緻密細胞核的較小成熟淋巴球，及/或存在具有窄細胞質邊界且具有缺乏可辨別核仁之緻密細胞核的較小成熟淋巴球，及/或存在非典型細胞及/或裂解細胞及/或前淋巴球。

【0213】 眾所周知，癌症為細胞 DNA 中之突變之結果，其可引起細胞避開細胞死亡或不受控制地增殖。因此，檢查此等突變（亦稱為細胞遺傳學檢查）可為用於評定癌症之診斷及/或預後之適用工具。此之實例為染色體位置 13q14.1

之缺失，其為慢性淋巴球性白血病之特徵。用於檢查細胞中之突變之技術為本領域中熟知的；例如螢光原位雜交（FISH）。

【0214】 「細胞遺傳學檢查」包括檢查細胞且特定言之染色體中之 DNA。細胞遺傳學檢查可用於鑑別 DNA 之變化，該等變化可與難治性癌症及/或復發性癌症之存在相關。此類變化可包括：染色體 13 之長臂中之缺失、及/或染色體位置 13q14.1 之缺失、及/或染色體 12 之三染色體、及/或染色體 12 之長臂中之缺失、及/或染色體 11 之長臂中之缺失、及/或 11q 之缺失、及/或染色體 6 之長臂中之缺失、及/或 6q 之缺失、及/或染色體 17 之短臂中之缺失、及/或 17p 之缺失、及/或 t（11:14）易位、及/或（q13:q32）易位、及/或抗原基因受體重排、及/或 BCL2 重排、及/或 BCL6 重排、及/或 t（14:18）易位、及/或 t（11:14）易位、及/或（q13:q32）易位、及/或（3:v）易位、及/或（8:14）易位、及/或（8:v）易位、及/或 t（11:14）及（q13:q32）易位。

【0215】 已知患有癌症之個體展現某些身體症狀，其通常係由於癌症對身體之負擔。彼等症狀通常在相同癌症中反覆出現，且因此可為疾病之診斷及/或預後及/或進展之特徵。熟習醫學者應理解，哪些身體症狀與哪些癌症相關及評定彼等身體系統可與疾病之診斷及/或預後及/或進展如何相關。「身體症狀」包括肝腫大及/或脾腫大。

【0216】 患有「冷」腫瘤之患者不太可能對傳統的免疫檢查點阻斷療法有反應（例如，投予抗 CTLA-4 抗體或抗 PD-1 抗體）。因此，在一些實施例中，患有冷腫瘤之患者對免疫檢查點阻斷療法具有抗性。

【0217】 鑒於此等觀測結果，對 ICB 之抗性構成顯著未滿足之醫療需求且可幫助克服抗性之藥物具有巨大的治療前景。因此，本發明之優點為能夠表現

特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體以及對 PD-1 及/或 PD-L1 具有特異性之抗體的溶瘤病毒產生能夠克服該抗性之協同效應，且靶向先前不可使用免疫檢查點抑制劑治療的冷腫瘤。

【0218】 本發明亦涵蓋醫藥組合物，其包含能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒與特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子的組合，以及醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑及/或佐劑。此類醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及佐劑為此項技術中已知的。

【0219】 本文所描述之抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒、細胞及/或醫藥組合物可適於非經腸投予，包括可含有抗氧化劑，及/或緩衝劑，及/或抑菌劑，及/或使得調配物與預期接受者血液等張之溶質之水性及/或非水性無菌注射溶液；及/或可包括懸浮劑及/或增稠劑之水性及/或非水性無菌懸浮液。本文所描述之抗體分子、核苷酸序列、質體、細胞及/或醫藥組合物可存在於單位劑量或多劑量容器，例如密封安瓿及小瓶中，且可儲存在冷凍乾燥（亦即凍乾）之條件下，僅需要在即將使用之前添加無菌液體載劑，例如注射用水。

【0220】 即用型注射溶液及懸浮液可由先前所描述之種類之無菌散劑及/或顆粒劑及/或錠劑製備。

【0221】 對於非經腸投予人類患者而言，抗 PD-1 抗體分子及/或抗 PD-L1 抗體分子之每日劑量水準通常將為患者之 1 mg/kg 體重至 20 mg/kg，或在一些情況下甚至至多 100 mg/kg，以單次或分次劑量投予。在一些較佳實施例中，劑量為 10 mg/kg。較低劑量可用於特殊情形中，例如與長期投予組合。在任何情況下，醫師將判定將最適合於任何個別患者之實際劑量，且其將隨特定患者之年齡、體重及反應而變化。上述劑量為一般情況之示例。當然，可存在值得較高或

較低劑量範圍之個別實例，且此類實例在本發明之範疇內。

【0222】 通常，包含抗體分子之本文所描述之醫藥組合物（或藥劑）將含有濃度在約 2 mg/ml 與 150 mg/ml 之間或約 2 mg/ml 與 200 mg/ml 之間的抗 PD-1 及/或抗 PD-L1 抗體分子。在一些實施例中，醫藥組合物將含有濃度為 10 mg/ml 或 25 mg/ml 之抗 PD-1 及/或抗 PD-L1 抗體分子。

【0223】 在一些實施例中，當抗 PD-1 抗體為帕博利珠單抗時，抗體以約 25 mg/ml 之劑量使用。在一些其他實施例中，帕博利珠單抗以每 3 週 200 mg（iv）之劑量或每 6 週以 400 mg（iv）之劑量使用。

【0224】 在一些實施例中，當抗 PD-1 抗體為納武單抗時，抗體以約 10 mg/ml 之劑量使用。在一些實施例中，納武單抗以每 2 週 240 mg（iv）之劑量或每 4 週以 480 mg（iv）之劑量使用。在一些實施例中，納武單抗可與抗 CTLA-4 抗體伊匹單抗組合使用，在此情況下，納武單抗以每 3 週 1 mg/kg 之劑量使用，最多使用 4 劑量，或每 2 或 3 週以 3 mg/kg 之劑量進行使用。

【0225】 在一些實施例中，當抗 PD-L1 抗體為阿特珠單抗時，抗體以約 60 mg/ml 之劑量使用。在一些其他實施例中，阿特珠單抗以每 2 週 840 mg（iv）之劑量或每 3 週以 1200 mg（iv）之劑量或每 4 週以 1680 mg（iv）之劑量使用。

【0226】 熟習此項技術者應瞭解，本文所描述之抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體中之任一者可以處方資訊中所描述之任何劑量或給藥方案使用。

【0227】 通常，醫藥組合物（或藥物）將含有濃度在大致 10^3 至 10^{12} vp（病毒顆粒）、iu（感染單位）或 pfu（溶菌斑形成單位）之間的述本文所描之溶瘤病毒，其視病毒及定量技術而定。存在於樣品中之 pfu 的量可藉由計數在感染容許細胞（例如 CEF 或 Vero 細胞）之後溶菌斑的數目以獲得溶菌斑形成單位（pfu）

效價來確定，vp 的量藉由量測 260 nm 吸光度來確定，及 iu 的量藉由定量免疫螢光，例如使用抗病毒抗體來確定。作為一般指導，適合於包含溶瘤痘病毒範圍為大致 10^3 至大致 10^{10} pfu，有利地大致 10^3 pfu 至約 10^9 pfu，較佳大致 10^4 pfu 至約 10^7 pfu；且更佳大致 10^6 pfu 至約 10^7 pfu 之醫藥組合物的個別劑量。

【0228】 在一些實施例中，當個體係小鼠時，溶瘤病毒之最佳劑量係大致 10^6 至 10^7 pfu。在一些實施例中，當個體係人類時，溶瘤病毒之最佳劑量係大致 10^6 至 10^9 pfu。

【0229】 一般而言，在人類中，經口或非經腸投予本文所描述之抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒、細胞及/或醫藥組合物為較佳途徑，亦為最方便的。對於獸醫學用途，本文所描述之抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒、細胞及/或醫藥組合物以適合地可接受之調配物形式根據正常獸醫學實踐投予，且獸醫學外科醫生將判定將最適合於特定動物的給藥方案及投予途徑。因此，本發明提供一種醫藥調配物，其包含有效治療各種病狀之量的本發明之抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒及/或細胞（如上文及下文進一步所描述）。

【0230】 較佳地，本文所描述之抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒、細胞及/或醫藥組合物適合於藉由選自包含以下之群的途徑遞送：靜脈內；瘤內；肌肉內；皮下。投予可呈單次注射或多次重複注射形式（例如在相同或不同投予部位以相同或不同劑量、以相同或不同途徑)。出於說明之目的，包含大致 10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、10^6、5×10^6、10^7、5×10^7、10^8、5×10^8、10^9、5×10^9 或 10^{10} pfu 之溶瘤痘病毒的個別劑量（例如本文中所描述之 TK 及 RR 缺陷型痘瘡病毒）尤其適合於瘤內投予。

【0231】 本發明亦包括本文所描述之包含本發明之多肽結合部分之醫藥

學上可接受之酸或鹼加成鹽的抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒、細胞及/或醫藥組合物。用於製備適用於本發明之前述鹼化合物之醫藥學上可接受之酸加成鹽的酸為形成無毒酸加成鹽，亦即含有藥理學上可接受之陰離子之鹽的酸，該等鹽尤其諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、乙酸鹽、乳酸鹽、檸檬酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、酒石酸氫鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、葡糖二酸鹽、苯甲酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽[亦即 1,1'-亞甲基-雙-（2-羥基-3 萘甲酸鹽）]。醫藥學上可接受之鹼加成鹽亦可用於產生根據本發明之藥劑的醫藥學上可接受之鹽形式。本質上為酸性的可用作製備本發明藥劑之醫藥學上可接受之鹼鹽的試劑之化學基質為與此類化合物形成無毒鹼鹽之化學基質。此類無毒鹼鹽尤其包括但不限於衍生自此類藥理學上可接受之陽離子（諸如鹼金屬陽離子（例如鉀及鈉）及鹼土金屬陽離子（例如鈣及鎂））的鹼鹽、銨或水溶性胺加成鹽（諸如 N-甲基葡糖胺-（葡甲胺））及低碳烷醇銨，及醫藥學上可接受之有機胺之其他鹼鹽。本文所描述之抗體分子、核苷酸序列、質體、病毒及/或細胞可經凍乾儲存且在使用之前在適合載劑中復原。可採用任何適合之凍乾方法（例如噴霧乾燥、餅塊乾燥）及/或復原技術。本領域中熟習此項技術者應瞭解，凍乾及復原可引起不同程度之抗體活性損失（例如對於習知免疫球蛋白，IgM 抗體傾向於具有比 IgG 抗體更大的活性損失）且可能必須上調使用量來補償。在一個實施例中，凍乾（冷凍乾燥）多肽結合部分在復水時損失不超過約 20%、或不超過約 25%、或不超過約 30%、或不超過約 35%、或不超過約 40%、或不超過約 45%、或不超過約 50%其活性（在凍乾之前）。

【0232】 在一些實施例中，病毒組合物在生理或微鹼性 pH（例如約 pH 7

至約 pH 9，特定偏好包含介於 7 與 8.5 之間，且更特定言之接近 8）下適當地緩衝。在病毒組合物中亦包括單價鹽以便確保適當滲透壓可為有益的。該單價鹽可尤其選自 NaCl 及 KCl，較佳地該單價鹽為 NaCl，較佳濃度為 10 至 500 mM（例如 50 mM）。適合的病毒組合物包含蔗糖 50 g/L、NaCl 50 mM、Tris-HCl 10 mM 及麩胺酸鈉 10 mM，pH8。組合物亦可經調配以包括用於在低儲存溫度下保護溶瘤病毒之低溫保護劑。適合低溫保護劑包括但不限於蔗糖（sucrose）（或蔗糖（saccharose））、海藻糖、麥芽糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇及甘油，較佳濃度為 0.5 至 20%（重量 g/體積 L，稱為 w/v）以及高分子量聚合物，諸如聚葡萄糖或聚乙烯吡咯啶酮（PVP）。

【0233】 應瞭解，包含能夠表現第一抗體分子之溶瘤病毒的組合物及包含如本文所描述之第二抗體分子的組合物可同時（亦即同步）作為單一組合物投予。

【0234】 或者，此等組合物可在類似時間或在不同時間點（例如，間隔一天或一週）分開投予。舉例而言，溶瘤病毒可在第二抗體分子之前投予。在其他實例中，第二抗體分子可在溶瘤病毒之前投予。此類依次投予可藉由溶瘤病毒與第二抗體分子之時間分離來達成。替代地，或與第一選項組合，依序投予亦可藉由及溶瘤病毒第二抗體分子之空間分離來達成，藉由投予能夠以一定方式（諸如瘤內）表現抗 CTLA-4 抗體之溶瘤病毒，使得其在第二抗體分子之前到達癌症，隨後以一定方式（諸如全身性地）投予，使得其在溶瘤病毒之後到達癌症。

【0235】 本發明之溶瘤病毒及第二抗體分子可根據如上文所描述之各組分之已建立之治療方案投予。此意謂各組分之投予可同時進行，或在相對於彼此不同的時間進行。

【0236】 在一些實施例中，可重複投予能夠表現如本文所描述之第一抗體分子之溶瘤病毒及第二抗體分子。舉例而言，投予可重複兩次、三次、四次、五次或如對於存在治療效果所必需之次數。

【0237】 現將參考以下圖式及實例描述體現本發明之某些態樣的較佳非限制性實例：

【圖式簡單說明】

【0238】 **圖 1： 新穎 Treg 耗竭之 αCTLA-4 mAb 之生物化學及功能表徵。**攜帶 CT26 腫瘤之 BALB/c 小鼠之（**A**）抗體介導之存活率及（**B**）TIL 調節。患有已確立腫瘤之動物接受四次（10 mg/kg）具有指定 Treg 相關特異性之抗體或對照 mIgG2a 抗體的注射（n=5-15）。（**C**）CTLA-4 特異性 mAb 誘導活體外活化之 $CD4^+$ T 細胞的 ADCC。藉由 FACS 鑑別裂解之目標 T 細胞。圖顯示藉由斯圖登氏 t 檢驗的平均值±SD（n=4-8）**p<0.01。（**D**）抗 CTLA-4（IgG1）mAb 在 huPBMC 小鼠活體內介導 Treg 耗竭。與伊匹單抗相比，純系 4-E03 顯示人類 Treg 細胞（上圖）而非 $CD8^+$ T 細胞（下圖）之耗竭增強。各圓點表示一隻小鼠。圖表顯示來自 2 個實驗的平均資料。*p<0.05，藉由單向方差分析。（**E**）藉由 ELISA 檢測，4-E03 hIgG1 及伊匹單抗與人類、小鼠及食蟹獼猴 CTLA-4 及 CD28 結合。（**F**）4-E03 IgG1 與活體外活化之表現 CTLA-4 的人類 T 細胞的結合被 rhCTLA-4-Fc 蛋白（黑線）預阻斷。（**G**）藉由 ELISA 檢測，4-E03 及 2-C06 阻斷 CD80 及 CD86 結合於 CTLA-4。（**H**）活體外功能性配體阻斷。圖表展示在用 αCTLA-4 處理活體外活化之人類 PBMC 後上清液中之 IL-2。顯示代表性供體（n=6）。（**I**）藉由流動式細胞測量術檢測，小鼠 αCTLA-4 mAb 與 mCTLA-4 經

轉染細胞之劑量依賴性結合。（**J**）藉由 ELISA 檢測，抗 CTLA-4 mAb 阻斷 B7 配體（CD80 及 CD86）與重組 CTLA-4 的結合。（**K**）Treg 耗竭活性及 $CD8^+$ T 細胞/Treg 比率（n=4-8），及（**L**）由攜帶 CT26 腫瘤之 BALB/c 小鼠中之 α 小鼠 CTLA-4 抗體誘導之存活率。

【0239】 **圖 2： 表現 Treg 耗竭 αCTLA-4 及 GM-CSF 之溶瘤痘瘡病毒的產生及表徵。**（**A**）用於編碼 CTLA4 抗體及 GM-CSF（在 I4L 基因座處）之重鏈（在 J2R 基因座處）及輕鏈之痘瘡病毒載體之示意圖。（**B**）LoVo 細胞中之複製動力學及（**C**）VV_{GM}-αhCTLA4（BT-001）之 MIA PaCa-2 細胞的溶瘤活性。添加 TG6002（重組 J2R 及 I4L 缺失之痘瘡病毒）作為對照。（**D**）自 MIA PaCa-2 BT-001 感染之細胞培養物中純化的 4-E03 的考馬斯藍染色後的電泳圖譜。泳道 2 及 5：重組 4-E03；泳道 1 及 4：來自 MIA PaCa-2 BT-001 感染之細胞的培養基中的經純化之 4-E03。泳道 1 及 2：非還原條件；泳道 3 及 4：還原條件。（**E**）在藉由 VV_{GM}-αhCTLA4（BT-001）感染後 48 小時 4-E03 及人類 GM-CSF 在指示人類腫瘤細胞中的表現量。（**F**）由 TF-1 增殖分析確定的 E）中產生之 GM-CSF 的生物活性。包括重組人類 GM-CSF（獲自歐洲藥典參考標準之莫拉司亭（molgramostim））作為陽性對照。（**G** 及 **H**）BT-001 感染之 MIA PaCa-2 細胞產生的 4-E03 的功能評估，（**G**）活體外：藉由與固定化重組 hCTLA 蛋白結合，如圖 1E 所示，及（**H**）活體內：（Treg 耗盡）如圖 1D 所示。

【0240】 **圖 3： 瘤內 VV_{GM}-αCTLA4 具有與腫瘤限制之 CTLA-4 受體飽和及 Treg 耗竭相關之活體內抗腫瘤活性。**（**A**）攜帶 CT26 腫瘤之小鼠用 VV_{GM}-αCTLA4（7.5×10^6、7.5×10^5 或 7.5×10^4 pfu），VV-αCTLA4（7.5×10^6 pfu）或空對照 VV（7.5×10^6 pfu）處理（n=20 隻小鼠/組）。（**B**）在以 10^7 pfu 三次 i.t.注射

（第0天、第2天及第4天）VV_{GM}-αCTLA4之後或在單次i.p.注射3 mg/kgαCTLA-4 mAb 5-B07之後攜帶CT26腫瘤之小鼠之腫瘤及血清中αCTLA-4之藥物動力學（n=3隻小鼠/時間點）。灰色區域指示CTLA-4受體飽和的EC_{10}至EC_{90}範圍（參見圖1J）。（**C**）在VV_{GM}-αCTLA4注射後第10天藉由FACS分析腫瘤及脾中$FoxP3^+$細胞之數目。圖表顯示來自3個獨立實驗之彙集資料（n=13隻小鼠/組）。

【0241】 **圖4：** **瘤內VV_{GM}-αCTLA4在跨越發炎及冷腫瘤微環境的同基因型腫瘤模型中具有廣泛的抗腫瘤活性。**（**A**）攜帶CT26、A20或EMT6腫瘤之BALB/c小鼠，或攜帶MC38或B16腫瘤之C57BL/6小鼠，接受了三次VV_{GM}-αCTLA4的i.t.注射或缺乏αmCTLA-4 mAb的對照病毒（VV空白或VV_{GM}）。當腫瘤體積約為50-100 mm^3時或在腫瘤細胞注射後4天（僅B16）開始治療。圖表顯示個別小鼠的腫瘤生長及相應的存活率（n=10）。（**B**）將CT26腫瘤細胞植入BALB/c小鼠之右側腹及左側腹。當腫瘤達到約100 mm^3之體積時，開始在右側腹腫瘤中i.t.注射VV_{GM}-αCTLA4（豎直虛線，與A中相同））（n=9-10）。

【0242】 **圖5：** **瘤內VV_{GM}-αCTLA4引發強大的全身性$CD8^+$ T細胞依賴性抗腫瘤免疫。**（**A**）BALB/c小鼠在用CT26腫瘤細胞sc攻擊前後用CD8（短虛線）或CD4（長虛線）耗竭抗體進行治療。當腫瘤達到約20至50 mm^3之體積時，如圖4A中開始治療。顯示一項代表性實驗（出自2個），每組10隻小鼠。（**B-D**）攜帶CT26腫瘤之小鼠用VV i.t.治療或用αCTLA-4 mAb（純系5-B07，3 mg/kg）i.p.治療。腫瘤細胞懸浮液及脾細胞離體用 VV 特異性或 CT26（AH-1）特異性肽再刺激，且$IFN\text{-}\gamma^+$及$TNF\text{-}\alpha^+$ $CD8^+$ T細胞或MHC I類標記之多聚體陽性$CD8^+$ T細胞之百分比藉由FACS定量。（**B**）顯示AH-1肽陽性（上

圖）或細胞介素陽性（下圖）脾細胞的流動式細胞測量術圖。（**C**）抗原特異性及（**D**）IFN-γ^+/TNF-α^+ $CD8^+$ T 細胞的量化在指定器官中。各圓點表示一隻小鼠。（n=3-6 次實驗）*p<0.05、**p<0.01、***p<0.005、****p<0.001 藉由單向方差分析。

【0243】 **圖 6： 瘤內誘導之 $CD8^+$ T 細胞抗腫瘤免疫係 FcγR 依賴的及 cDC1 依賴的。**（**A**）攜帶 CT26 腫瘤之 WT 及 *Fcer1g*$^{-/-}$ BALB/c 小鼠接受 VV_{GM}-αCTLA4 或 PBS 之 i.t.注射，如圖 4A 所示。圖表顯示腫瘤體積（左圖及中圖）及小鼠存活率（右圖）。豎直線指示治療結束。（n=10 隻小鼠/組）（**B**）在用 VV_{GM}-αCTLA4 與 VV 空白治療的 CT26 腫瘤中，GO 項在 352 個差異性表現之基因集中富集，無論上調或下調。顯示具有最低調整 p 值的 20 個富集項。（**C**）與來自圖 6b 之 5 個最富集的 GO 項相關的差異性表現之基因的網路視圖。發現僅上調之基因與此等 5 種富集 GO 項相關。（**D**）攜帶 MC38 腫瘤 WT 及 *Batf3*$^{-/-}$ BALB/c 小鼠接受 VV_{GM}-αCTLA4 或 PBS 之 i.t.注射，如圖 4A 及 6A 所示。圖表顯示腫瘤體積（左圖及中圖）及小鼠存活率（右圖）。豎直線指示治療結束。（n=8-10 隻小鼠/組）。

【0244】 **圖 7： 瘤內 VV_{GM}-αCTLA4 擴大周邊效應 $CD8^+$ T 細胞且減少 Treg 及耗盡的 $CD8^+$ T 細胞。**攜帶 CT26「雙」腫瘤之 BALB/c 小鼠經 i.t.（僅右側腹腫瘤）用 VV_{GM}-αCTLA4 或 PBS 治療。在治療後第 10 天收集脾臟、注射及對側腫瘤，用設計成用於鑑別 T 細胞群體的高維圖染色。（**A**）i.t.VV_{GM}-αCTLA4 可在經注射腫瘤及未注射腫瘤（上圖）中減少活化之 $CD4^+$ Treg 細胞（$FoxP3^+$ $Klrg1^+$，「T1」），減少耗盡之 $CD8^+$ T 細胞（$PD1^+TIM3^+$，「T2」）且擴增活化之效應 $CD8^+$ T 細胞（$Klrg1^+$，「T3」），以及在脾臟中擴增活化之 $CD8^+$ T 細

胞（S1，下圖)。（**B**）顯示 A 中所示之定量資料。顯示一個具有每組含 5 隻小鼠的代表性實驗（出自 3 個）。（**C**）流動式細胞測量術圖顯示所選 i.t. T 細胞簇的特徵標記。

【0245】 **圖 8：瘤內 VV_{GM}-αCTLA4 與 αPD-1 協同作用以排斥「冷」ICB 抗性腫瘤。**（**A** 及 **B**）C57BL/6 小鼠攜帶兩個 B16 腫瘤，一個大腫瘤（5×10^5 個細胞，經治療腫瘤）及一個小腫瘤（1×10^5 個細胞，對側）接受三次 VV_{GM}-αCTLA4 的 i.t.注射（垂直虛線）及 αPD-1 的 i.p.注射（29F.1A12，10 mg/kg；每週兩次，持續三週，灰色區域）。（**A**）存活率（n=10-20），*$p<0.05$，藉由對數秩測試。（**B**）瘤內注射及對側腫瘤的腫瘤生長曲線。（**C**）當腫瘤體積達到約 135 mm^3 時，攜帶 A20 腫瘤之 BALB/c 小鼠用 VV_{GM}-αCTLA4 i.t. (在 1×10^5 pfu 之次佳劑量下），αPD-1 i.p.（RMP1-14，10 mg/kg 之全劑量）或兩者之組合治療三次。圖表顯示動物存活率（n=10）。

【0246】 **圖 9： CTLA4 特異性 mAb 之表徵。**（**A**）將新鮮切除之卵巢瘤、腹水及血液樣品與健康的 PBMC 進行比較。藉由流動式細胞測量術評估 $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$Treg 細胞、$CD4^+$非 Treg 細胞及 $CD8^+$效應 T 細胞上之 CTLA-4 表現，且與 PBMC 轉移兩週後自 NOG 脾臟分離的人類 T 細胞上的表現進行比較。資料表示個別患者/供體，n=11 表示健康 PBMC，n=20 表示腹水，n=9 表示腫瘤，n=5 表示患者血液。（**B**）將人類 PBMC i.v.注射至 NOG 小鼠中。移植後 2 至 3 週，剝離脾臟且經 i.p.將細胞懸浮液注射於 SCID 接收者中，隨後用 10 mg/kg 4-E03 hIgG1、4-E03 hIgG1 N297Q 或同型對照處理。藉由 i.p.灌洗所收集細胞且在處理後定量 24 小時。細胞耗竭%相對於同型對照標準化。各圓點表示一隻小鼠。（**C**）藉由 Biacore 分析評估 4-E03 及伊匹單抗對可溶性人類 CTLA-4 之結合動

力學。在晶片上藉由固定化之抗人類 Fc 捕捉 mAb 且在各循環中注射不同濃度之 CTLA-4 蛋白質。4-E03 及伊匹單抗之 K_D 值分別為 0.6 nM 及 2.7 nM。（**D**）藉由流動式細胞測量術，抗 CTLA-4 mAb 與 CTLA-4 內源性表現人類 T 細胞的劑量依賴性結合。(**E**)藉由 ELISA 測試效價劑量的小鼠替代物抗體 5-B07 mIgG2a（10 μg/ml，具有 3 倍稀釋步驟）對小鼠 CTLA-4 及 CD28 的結合。(**F**)將 1×10^6 CT26 細胞 s.c.注射至 BALB/c 小鼠（n=7）。當腫瘤達到約 100 mm^3 之尺寸時，在第 0 天、第 4 天及第 7 天小鼠接受 200 μg（10 mg/kg）5-B07 mIgG2a、5-B07 mIgG1 N297A 或同型對照抗體。在第 8 天，取出腫瘤且藉由 FACS 分析 TIL。所展示資料為一個代表性實驗之平均值（+SD），其中每組 n=7 隻小鼠。

【0247】 **圖 10： 病毒及轉殖基因在腫瘤及血液中之藥物動力學。**（**A** 及 **B**）圖 3B 中描述的腫瘤樣品亦用於量測 LoVo 異種移植腫瘤中（**A**）鼠類 GM-CSF 的瘤內濃度，（**B**）病毒載量及 **C-E**）藥物動力學。將 LoVo 細胞植入瑞士裸小鼠之右側腹。當腫瘤體積達到約 120 mm^3（定義為 D0）時，小鼠藉由單次注射 10^5 pfu 之 VV_{GM}-hCTLA4（BT-001）或 VV i.t.或 i.p. 3 mg/kg 之 4-E03 單株抗體進行處理。在每個指定時間點收集三隻小鼠的血液及腫瘤。（**C**）4-E03、（**D**）GM-CSF 及（**E**）病毒之濃度分別藉由 ELISA 測定且在 Vero 細胞上效價。該等線連系各時間點的值的中值。

【0248】 **圖 11： 經 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 在經治療及未經治療腫瘤中誘導持久的抗腫瘤反應。**（**A**）將 CT26 腫瘤細胞植入 BALB/c 小鼠的左右兩側。在腫瘤達到約 100 mm^3 之體積時開始在右側腹腫瘤中 i.t.注射 VV_{GM}-αCTLA4（×3，相隔兩天）。在治療後一天評估經治療及對側腫瘤中之病毒濃度。（n=3 隻小鼠/組；小鼠 1-3（M1-3）；N.D.=未偵測到）。**B-C**）用指定劑量的 VV_{GM}-αCTLA4

治療攜帶 CT26 腫瘤之小鼠，如同 A）。或者，10^7或 10^5 pfu VV_{GM}-αCTLA4 經 i.v.給與。顯示個別腫瘤生長曲線（**B**）及存活率曲線（**C**）。（**D**）抑制再受攻擊之腫瘤生長。將 CT26 腫瘤細胞經 s.c.植入至 BALB/c 小鼠中。計劃經 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 或空白對照 VV 進行處理，如同在 A）。如圖 4B 之圖例所示，在最後一次 VV 注射後 100 天，用 CT26 或 Renca 細胞經由 s.c.再次攻擊存活的小鼠。

【0249】 **圖 12： 瘤內誘導之 CD8 T 細胞免疫係 FcγR 依賴性的。**WT 及 *Fcer1g*-/- BALB/c 小鼠經 s.c.接受 1×10^6個 CT26 細胞當腫瘤達到約 100 mm^3時，小鼠在第 0 天、第 2 天及第 5 天接受三次 VV_{GM}-αCTLA4 或 PBS 對照之 i.t.注射（10^7 pfu 最終劑量）。在第 8 天，分離腫瘤及脾臟，且藉由 FACS 分析 $FoxP3^+$ $CD4^+$細胞。

【0250】 **圖 13： 經 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 之治療視 $CD8^+$ T 細胞而定。**（**A**）在用 1×10^6個 CT26 細胞 s.c.挑戰小鼠前 3 天，用 1 mg 之 CD8 或 CD4 耗竭抗體（或相應同型對照抗體）治療或不治療一組 10 隻 BALB/c 小鼠。再過 4 天後（相對於治療開始的第-3 天），i.p.投予 200 μg 耗竭抗體。然後在第 0、2 及 4 天經 i.t.以 1×10^7 pfu VV_{GM}-αCTLA4 治療小鼠。顯示人道端點之存活百分比。資料代表 2 個獨立實驗。（**B**）攜帶 CT26 腫瘤之小鼠用 VV i.t.治療或用抗 CTLA-4 mAb（純系 5-B07，3 mg/kg）i.p.治療。腫瘤細胞懸浮液離體用 VV 特異性或 CT26（AH-1）特異性肽再刺激，培養 4h，且 IFN-γ^+及 TNF-α^+ $CD8^+$ T 細胞之數目藉由流動式細胞測量術定量。各圓點表示一隻小鼠。代表性實驗（n=3-6）**p<0.01、***p<0.005、****p<0.001，藉由單向方差分析。（**C**）及（**D**）顯示藉由無監督簇鑑別之（**C**）12 個瘤內及（**D**）10 個脾 CD3+亞群之中值標記表現的熱圖。

【0251】 **圖 14： B16 腫瘤對抗 CTLA-4 加抗 PD-1 之全身性治療係難治性的。**攜帶 B16 腫瘤之 C57BL/6 小鼠在第 4、7、11 天經 i.p.用 10 mg/kg 之抗 PD-1 或抗 PD-1 及抗 CTLA-4 的組合（10mg/kg）進行治療。（**A**）資料表示為所指示細胞接種後幾天的腫瘤體積（mm^3）；每條線表示個別鼠標。（**B**）下圖顯示指定治療之後，攜帶 B16 之小鼠之人道端點的存活百分比。（**C**）攜帶 B16 腫瘤之 C57BL/6 小鼠接受三次 VV_{GM}-αCTLA4 i.t.注射及/或抗 PD-1 i.p.注射，如圖 8 中所描述。最後一次治療後六天，收集腫瘤且通過流動式細胞測量術分析腫瘤浸潤性 T 細胞之數目。各圓點表示一隻小鼠。（n=3 個實驗）。*$p<0.05$，藉由單向方差分析。顯示高度 T 細胞發炎之 CT26 腫瘤微環境中的 T 細胞浸潤水準以供參考（在細胞接種後約第 20 天在 CT26 腫瘤中測定）。

【實施方式】

實例

材料及方法

細胞株

人類胚胎腎細胞株 293T、鼠類黑色素瘤 B16-F10、鼠類大腸癌瘤 CT26、鼠類 B 細胞淋巴瘤 A20、鼠類乳房 EMT6 及鼠類路易斯肺癌（Lewis lung carcinoma）細胞株（LL/2）係購自美國菌種保藏中心（ATCC）且經人類 CTLA-4 穩定轉染之細胞（293T-CTLA4）購自 Crown Bio。細胞在補充有 10% FCS、10 mM HEPES 及 1 mM 丙酮酸鈉之 RPMI+glutamax（CT26）或 DMEM+glutamax（MC38，B16-F10）中培養。EMT6 細胞在補充有 15% FCS、10 mM HEPES 及 1 mM 丙酮酸鈉之 Waymouth 培養基中維持。將表現 hFcγRIIIA-158V 及 GFP（購自 ATCC）之

NK-92 細胞株在經補充之 α-MEM 培養基中培養（Binyamin 等人, 2008）。在 R10 培養基（含有 2 mM 麩醯胺酸、1 mM 丙酮酸、100 IU/ml 青黴素及鏈黴素及 10% FBS 之 RPMI 1640；Life Technologies 之 GIBCO）中培養初生細胞。人類大腸直腸腺癌細胞株 LoVo（ATCC）、胰臟腫瘤細胞株 MIA PaCa-2（ATCC）及人類胃癌細胞株 Hs-746 T（ATCC）在補充有 10% FBS 且含有 40 mg/L 之建它黴素（gentamicin）的 DMEM（Gibco）中生長。人類卵巢腫瘤細胞株 SK-OV-3（ATCC）及人類大腸直腸癌細胞株 HCT 116（ATCC）在補充有 10% FBS 且含有 40 mg/L 建它黴素之 Mc Coy's 5A 培養基（ATCC）中生長。人類紅血球母細胞細胞株 TF-1（ATCC）在補充有 10% FBS 且含有 40 mg/L 之建它黴素+ 2 ng/mL 之 GM-CSF 的 RPMI 1640（Sigma）中生長。

【0252】 *小鼠*

將小鼠維持在當地無病原體設施中。對於所有實驗，年輕成年小鼠性別及年齡均匹配且隨機分配至實驗組。所有程序均經當地實驗動物倫理委員會批准（Malmö/Lunds djurförsöksetiska nämnd）；在 BioInvent 以許可號 17196/2018 或 2934/2020；或在 Transgene APAFIS Nr21622 項目 2019072414343465，且按照當地倫理準則執行。C57BL/6 及 BALB/c 小鼠購自 Taconic、Janvier 或 Charles River。所使用之基因改變的品系為：C.129P2(B6)-*Fcer1gtm1Rav*（BALB/c 背景之 *Fcer1g*-KO 及 BALB/cAnNTac WT 對照），購自 Taconic；及 B6.129S(C)-*Batf3*tm1Kmm/J（Hildner 等人, 2008）；C57BL/6J 背景之 *Batf3*-KO 及 C57BL/6J WT 對照，購自 Jackson Laboratories。

【0253】 *人類（臨床）樣品及倫理*

獲得了斯科訥大學醫院（Skåne University Hospital）倫理委員會的倫理批准。

根據赫爾辛基宣言（Declaration of Helsinki）提供知情同意書。患者樣品經由瑞典隆德斯科納大學醫院的婦產科及腫瘤科（Department of Obstetrics and Gynecology and the Department of Oncology at Skånes University Hospital, Lund, Sweden）獲得。腹水係作為經分離之單細胞懸浮液形式評估。

【0254】 *人體組織之處理*

將獲自經歷手術之患者的卵巢腫瘤樣品切成小片，且在 37℃下在具有 DNA 酶 I（Sigma）及 Liberase TM（Roche Diagnostics）之 R10 中培育 20 分鐘。以機械方式解離剩餘組織，且使其與細胞懸浮液一起通過 70 μm 細胞過濾器。獲得匹配的周邊血液樣品且使用 Ficoll-Paque PLUS（Cytiva）藉由在 Leucosep 管（Greiner）上以 800×g 離心 20 分鐘來分離周邊血液單核細胞。人類白血球層獲自瑞典哈爾姆斯塔德醫院（the hospital of Halmstad (Sweden)）中之血液中心且根據標準方案處理。

【0255】 *抗體依賴性細胞毒性*

使用經穩定轉染以表現 CD16-158V 等位基因以及 GFP 之 NK-92 細胞株進行 ADCC 分析。使用 $CD4^+$ T 細胞分離套組（Miltenyi Biotec）自健康供體之周邊血液分離 $CD4^+$目標 T 細胞。細胞在 37℃下用 CD3/CD28 dynabeads（Life Technologies，Thermo Fisher）及 50 ng/ml 重組 hIL-2（R&D Systems）刺激 72 小時，以上調 CTLA-4。目標細胞與 10 μg/ml 之 mAb 在 4℃下預培育 30 分鐘，隨後與 NK 細胞混合。細胞以 2:1 效應子:目標細胞比率培育 4 小時。藉由流動式細胞測量術測定裂解。簡言之，在培育結束時，細胞懸浮液在黑暗中在 4℃下用 VioGreen 結合之抗 CD4（M-T466，Miltenyi Biotec）連同可固定存活染料 eFluor780（eBioscience）染色 30 分鐘，且接著藉由 FACS 分析細胞。

【0256】 *活體外功能阻斷*

對於 SEB PBMC 分析，將來自健康供體之總 PBMC 接種在 96 孔盤（1×10^5 個細胞/孔）上，且在介於 20-0.625 μg/ml 範圍的滴定劑量的抗 CTLA-4 IgG 的存在下用 1 μg/ml 葡萄球菌腸毒素 B（SEB，Sigma Aldrich）刺激。3 天後，採集上清液，且根據製造商說明書，藉由 MSD（Meso Scale Discovery，美國羅克維爾（Rockville, USA））定量 IL-2。

【0257】 *活體外結合分析*

將表現 CTLA-4 之經轉染細胞與指定濃度之抗 CTLA-4 mAb 在 4℃下一起培育 20 分鐘，隨後用 APC 標記之山羊抗人類二級抗體（Jackson ImmunoResearch）洗滌及染色。未觀測到針對經空載體轉染之細胞的結合（圖中未示）。

【0258】 在分離的、活體外活化之 $CD4^+$ T 細胞上分析 IgG 與初生細胞的結合。簡言之，使用 MACS CD4 T 細胞分離套組（Miltenyi Biotec）藉由負選擇自總 PBMC 純化人類周邊 $CD4^+$ T 細胞。CD4+ T 細胞在 R10 培養基中用 CD3/CD28 dynabeads（Life Technologies）加 50 ng/ml 重組 hIL-2（R&D Systems）活體外活化 3 天，以上調 CTLA-4 表現。在活體外活化之人類 $CD4^+$ T 細胞與指定濃度之抗 CTLA-4 mAb 連同抗 CD4 一起培育。用 APC 標記之山羊抗人類 IgG 偵測結合的抗 CTLA-4 mAb。在競爭性結合分析中，將 2 μg/ml Alexa 647 標記之抗 CTLA-4 mAb 與重組人類或食蟹獼猴 CTLA-4-Fc 蛋白質（50 μg/ml；R&D Systems）混合，然後與表現 CTLA-4 的細胞一起培育。藉由 FACS 偵測結合之 IgG 結合。

【0259】 *VV 產生及純化*

重組病毒係藉由在雞胚胎纖維母細胞（CEF）中使用在 J2R 及 I4L 基因座處

編碼 GFP 或 mCherry 之起始親本哥本哈根痘瘡病毒及兩種轉移質體進行兩次連續同源重組而產生。轉移質體在 p7.5 啟動子下編碼 mAb 之重鏈且側接 J2R 重組臂，或在 p7.5 啟動子下編碼 mAb 之輕鏈，另外或不在 pSE/L 啟動子下編碼鼠類或人類 GM-CSF 且側接 I4L 重組臂（參見圖 2A）。重組病毒藉由非螢光斑塊之擴增/分離之若干循環來分離。重組病毒隨後產生於 CEF 上且在細胞藉由 5 μm 過濾裂解之後純化，接著使用 0.2 μm 切向流過濾進行純化/濃縮。最後，病毒藉由透濾調配於蔗糖 50 g/L、NaCl 50 mM、Tris 10 mM、麩胺酸鈉 10 mM pH 8 中，進行等分且儲存於-80℃下直至使用為止。

【0260】 用於此公開案之所有病毒來自 TK-RR-哥本哈根病毒株：

VV：非武裝痘瘡病毒或 TG6002（編碼 FCU1 嵌合酶之痘瘡病毒，基準重組 V）

VV_{GM}：編碼鼠類 GM-CSF 的痘瘡病毒

VV_{GM}-αCTLA4：編碼鼠類 GM-CSF 及 5-B07 的痘瘡病毒（抗小鼠 CTLA-4，小鼠 IgG2a）

VV-αCTLA4：編碼 5-B07 之痘瘡病毒

VV_{GM}-αhCTLA4（BT-001）：編碼人類 GM-CSF 及 4-E03 之痘瘡病毒（抗人類 CTLA-4，人類 IgG1）。

【0261】 *活體外病毒複製、溶瘤活性及轉殖基因表現*

藉由量測 LoVo 細胞感染後 24 小時、48 小時及 72 小時之總病毒效價來評估 BT-001 之複製，其中 BT-001 感染倍率（MOI）為 10^{-3}（亦即 1 病毒用於 1000 個細胞）。藉由 Vero 細胞上之溶菌斑分析確定病毒效價。

【0262】 在 MIA PaCa-2 細胞與 BT-001 以在圖例中指示之 MOI 培育 5 天

之後，藉由使用細胞計數器（Vi-Cell）定量細胞存活率來評定 BT-001 之溶瘤活性。BT-001 之複製及溶瘤活性均以目前正在臨床評估的哥本哈根 TK-RR-痘瘡病毒 TG6002 為基準（Foloppe 等人, 2019）。

【0263】 在 BT-001 以 MOI 0.05 感染若干人類腫瘤細胞株之後評估轉殖基因表現：LoVo、HCT116（結腸癌）、MIA PaCa-2（胰腺癌）、SK-OV3（卵巢癌）及 Hs176T（胃癌）。感染後 48 小時收集培養物上清液，離心且在 0.2 μm 上過濾，隨後藉由 ELISA 量測 4-E03 及 hGM-CSF 濃度。

【0264】 *抗體純化*

在無牛血清之 DMEM 中用 BT-001 以 MOI 0.01 感染十五個含有約 4.7 10^7 個 MIA PaCa-2 細胞/燒瓶之 F175 燒瓶。在感染之後七十二小時，收集細胞上清液，合併，離心且在 0.2 μm 上過濾，隨後添加 EDTA（2 mM 最終）及 Tris pH 7.5（20 mM 最終）。將池上清液在 4℃下裝載於先前在 PBS 中平衡之一毫升 protA Hitrap 管柱（GE healthcare，參考號 17-5079-01）上。結合之抗體藉由 100 mM 甘胺酸 HCl pH 2.8 溶離，且相對於 PBS 透析。純化之 4-E03 在還原或非還原條件下負載於 SDS-PAGE（NuPage Bis-Tris 凝膠，4-12% Thermo NP0323）上且凝膠用 InstantBlue（Expedeon，ISB1L）考馬斯藍染色。進一步評估此純化抗體（亦即，4-E03 MIA PaCa-2)之 CTLA-4 結合及活體內 Treg 耗竭活性。

【0265】 *酶聯結免疫吸附分析*

GMCSF。使用 Quantikine®ELISA GM-CSF 免疫分析（R&D Systems）測定人類及鼠類 GM-CSF 濃度。

【0266】 使用 TF-1 增殖分析法評估人類 GM-CSF 功能。在已知濃度的 hGM-CSF（標準或來自 BT-001 感染的細胞）存在下，TF-1 細胞之細胞增殖藉由

使用 MTS 到甲臢的酶促轉化（通過 490nm 處的吸光度測量）藉由活細胞的去氫酶的比色法來量測。將 490 nm 處之吸光度與 GM-CSF 濃度作圖，且將曲線與用重組 GM-CSF（亦即，莫拉司亭）獲得的曲線進行比較。

【0267】 *與 CTLA4/CD28 蛋白結合*。對於抗體結合 ELISA，將經純化之人類 CTLA4-Fc、人類 CD28-Fc（R&D Systems）及小鼠 CTLA4-Fc（Sino Biologicals）以 1 pmol/孔塗佈至分析盤上，同時以 5 pmol/孔塗佈小鼠 CD28-His（R&DSystems）。以 10 μg/ml 添加不同抗體，並且在室溫下結合 1 小時。使用抗小鼠/抗人類 H+L-HRP（Jackson Immunoresearch）或抗小鼠/人類 λ 輕鏈抗體 HRP（Bethyl）偵測結合的 n-CoDeR® mIgG2A 或 hIgG1 抗體。使用顯色基質（TMBT0440）或發光基質（Pierce 37070），並用 Tecan Ultra 進行讀盤。

【0268】 *阻斷 CD80/CD86 相互作用*。對於配體阻斷 ELISA，將經純化之人類 CTLA4-Fc（R&D Systems）以 2 pmol/孔（對於 CD80）或 1 pmol/孔（對於 CD86）塗佈至分析盤。添加濃度範圍為 0.4 pM 至 67 nM 的抗體並使其結合 1 小時。分別以 200 nM 及 100 nM 添加 his 標籤之配體（rhCD80 及 rhCD86；R&DSystems），如在 ELISA 的先導實驗中最佳化（資料未顯示）。進一步培育培養盤 15 分鐘。洗滌後，用 HRP 標記之抗 His 抗體（R&D Systems）偵測結合的配體。使用 Super Signal ELISA Pico（Thermo Scientific）作為基質，且使用 Tecan Ultra 微量培養盤讀取器來分析盤。或者，以 1 pmol/孔將小鼠 CTLA4-Fc（Sino Biological）塗佈至分析盤。在 2 倍稀釋步驟下，以 10 μg/ml（67 nM）之起始濃度添加抗體且使其結合 1 小時。添加 50 nM 經 His 標籤之配體 CD80 及 CD86（Sino Biological），且進一步培育培養盤 30 分鐘。如上文所描述進行偵測及讀取。

【0269】 *小鼠實驗*

活體內腫瘤實驗。培養腫瘤細胞僅在左側腹或兩個側腹中皮下注射（CT26 1×10^6 個細胞；MC38 5×10^5 個細胞；A20 5×10^6 個細胞；EMT6 1×10^6 個細胞；B16-F10 0.5 至 5×10^5 個細胞）。除非另有說明，否則經 i.t.用 10^7 pfu 之 VV_{GM}-αCTLA4 或對照 VV，三次，每隔一天治療小鼠。對於腫瘤生長實驗，用測徑規一週兩次量測所治療及遠端腫瘤之腫瘤尺寸且根據下式計算腫瘤體積（mm^3）：（寬度$^2\times$長度$\times0.52$）。當總腫瘤負荷（經治療及對側腫瘤結合）達到 2000 mm^3 的體積（實驗終點）時，對動物實施安樂死。對於功能性實驗，在圖例中指示之時間點收集及處理組織。小鼠腫瘤在 R10 中用 DNA 酶 I（Sigma）及 Liberase TM（Roche Diagnostics）在 37℃下消化 15 分鐘。然後將細胞通過 70 μm 細胞過濾器且直接用於分析。對於 DC 表型分析，在密度梯度離心（Cedarline Cat#CL5035）後富集活白血球。

【0270】 *原發性人類異種移植模型*。PBMC-NOG/SCID 小鼠藉由在 200 μl PBS 中靜脈內注射 NOG 小鼠（NOD.Cg-*Prkdc*scid *Il2rg*tm1Sug/JicTac（Taconic））及使用 Ficoll-PaquePLUS 分離的 $1\text{-}2\times10^7$ 個 PBMC 來產生。注射後大約兩週，隨後用來自重組 NOG 小鼠的 10×10^6 個脾細胞腹膜內注射 SCID 小鼠（CB-*Igh-1*b/IcrTac-Prkdc*scid*（Taconic））。1 小時後，用 10mg/kg 之 mAb 處理小鼠。在 24 小時之後收集小鼠之腹膜內流體。藉由 FACS，使用以下標記鑑別及定量人類 T 細胞亞群：CD45、CD4、CD8、CD25、CD127（全部來自 BD Biosciences）。

【0271】 *轉殖基因及病毒在腫瘤及血液中之藥物動力學*。在先前所描述之 CT26 腫瘤模型中，V_{GM}-αCTLA4 或 VV-αCTLA4 係在與上文所提及相同之條件下投予（亦即，在第 0 天、第 2 天及第 4 天 3 次 i.t.注射 10^7 pfu）。在第 1 天、

第 4 天（第三次注射前）、第 8 天及第 10 天收集三隻小鼠/時間點的腫瘤及血液。藉由對 Vero 細胞進行病毒效價，量測全血及在 PBS 中均質化的腫瘤中的病毒濃度。藉由 ELISA 在血清及腫瘤勻漿中量測 5-B07 及 mGM-CSF 兩者之濃度。在異種移植人類腫瘤模型中，將 LoVo 細胞皮下注射於瑞士裸小鼠之左側腹。在腫瘤體積達到約 120 mm^3 之後約兩週，將小鼠隨機分組且分成 2 組（15 隻小鼠/組）。第一組經 i.t.注射一次 10^5 pfu 之 VV_{GM}-αhCTLA4（BT-001）及第二組經腹膜內注射 3 mg/kg 的 4-E03。在病毒注射後第 1、3、6、10 及 20 天收集三隻小鼠/時間點的腫瘤及血液/血清。如先前段落中所述量測 4-E03 及 hGM-CSF 兩者之病毒效價及濃度。

【0272】 *抗原特異性 T 細胞反應*

在脾臟、治療過之腫瘤及對側腫瘤中分析抗原特異性 T 細胞反應。簡而言之，用 2 μg/ml 腫瘤（AH-1，SPSYVYHQF）特異性肽或病毒（S9L8，SPGAAGYDL）特異性肽（BioNordika）再刺激 1×10^6 個經分離細胞（Huang 等人，1996；Russell 及 Tscharke，2014）。在布雷菲爾德菌素 A（brefeldin A）（Sigma）存在下將腫瘤細胞脈衝 4 小時。將分離之脾細胞再刺激 48 小時，最後 4 小時在布雷非德菌素 A 存在下進行。隨後藉由對 CD45、TCR-β、CD8、TNF-α、IFN-γ 及 CD25 進行 FACS 染色來鑑別產生細胞介素的 $CD8^+$ T 細胞。同時，使用 MHCI 類多聚體（五聚體 H-2Ld-SPGAAGYDL-R-PE（S9L8）ProImmune、五聚體 H-2Ld-TPHPARIGL-R-PE（ctrl）ProImmune、抗原決定基肽多聚體 H-2Ld-SPSYVYHQF-APC（AH-1）Immudex，抗原決定基肽多聚體 H-2Ld-TPHPARIGL-APC（ctrl）Immudex）鑑別腫瘤及病毒特異性 $CD8^+$ T 細胞。

【0273】 *流動式細胞測量術*

死細胞通常使用可固定存活染料 eFluor™780、可固定存活染色 440UV 或碘化丙錠進行鑑別，且與雙重峰一起排除在分析之外。使用 FoxP3 染色緩衝液組（Thermo Fisher Scientific）進行細胞內染色。在 BD FACS Verse 或 Fortessa II 上進行樣品採集，且使用 FlowJo 10.7.2 分析資料。為了產生瘤內及脾 $CD3^+$ T 細胞之 UMAP，使用 FlowAI 工具（v.2.2）清洗資料，然後將樣品與治療組及器官進行條形碼化，並連接起來。FlowJo 外掛程式 UMAP（v3.1）使用預設設置（距離函數：歐幾里得，最近鄰：15，最小距離：0.5）在所得流動式細胞測量術標準（FCS）檔案上運行，且包括所有補償參數及正向散射（FSC）及側向散射（SSC）量測值。對於叢集識別，FlowJo 外掛程式 x-shift（v1.3）使用預設設置（最近鄰 K=82）在所得 UMAP 上運行，且包括以下參數：CD4、CD62L、CD25、ICOS、FoxP3、Klrg1、CD44、CTLA-4、PD-1、TIM-3、T-bet、GzmB、Ki-67。使用獲自 FlowJo 之按比例調整之通道值計算上述參數之每個簇的平均表現。平均表現熱圖係使用每個簇的參數平均值生成的，且在 0 及 1 之間按比例調整。

【0274】 *抗體*

用於流動式細胞測量術之單株抗體：抗人類 CD4-VioGreen（M-T466）Miltenyi Biotec 目錄號 130-113-259、抗人類 CD25-BV421（純系 M-A251）BD Biosciences 目錄號 562442、抗人類 CD127-FITC（純系 HIL-7R-M21）BD Biosciences 目錄號 561697、抗人類 CD8-APC（純系 RPA-T8）BD Biosciences 目錄號 555369、抗人類 CTLA-4-PE（純系 BNI3）BD Biosciences 目錄號 555853、小鼠 IgG2a、k 同型對照-PE BD Biosciences 目錄號 555574、抗小鼠 CD45.2-PerCP-Cy5.5（純系 104）BD Biosciences 目錄號 552950、抗小鼠 CD45.2-BUV737（純系 104）BD Biosciences 目錄號 612779、抗小鼠 CD25-BV421（純系 7D4）BD

Biosciences 目錄號 564571、抗小鼠 CD8-BV786（純系 53-6.7 ）BD Biosciences 目錄號 563332、抗小鼠 CD4 -BV510（純系 RM4-5 ）BD Biosciences 目錄號 563106、抗小鼠 TCRb-Alexa Fluor 488（純系 H57-597）BioLegend 目錄號 109215、抗小鼠 PD-1-BB700（純系 RMP1-30）BD Biosciences 目錄號 748242、抗小鼠 CTLA-4-PECF594（純系 UC10-4F10-11）BD Biosciences 目錄號 564332、抗小鼠 CTLA-4-APC（純系 UC10-4B9）BioLegend 目錄號 106310、抗小鼠 Klrg1-APC（純系 2F1）BD Biosciences 目錄號 561620、抗小鼠 CD62L-BUV395（純系 MEL-14 ）BD Biosciences 目錄號 740218、抗小鼠 TIM3-PE（純系 5D12）BD Biosciences 目錄號 566346、抗小鼠 ICOS-BV605（純系 7E.17G9 ）BD Biosciences 目錄號 745254、抗小鼠 CD44-APC-Cy7（純系 IM7）BD Biosciences 目錄號 560568、抗小鼠 Ki67-Alexa Fluor 700（純系 B56）BD Biosciences 目錄號 561277、抗人類顆粒酶 B-R718（純系 GB11）BD Biosciences 目錄號 566964、抗小鼠 Tbet-BV711（純系 O4-46）BD Biosciences 目錄號 563320、抗小鼠 FoxP3-PeCy7（純系 FJK-16s ）Thermo Fisher Scientific 目錄號 17-5773-82、抗小鼠 IFNg-PeCy7（純系 XMG1.2）BioLegend 目錄號 505826、抗小鼠 TNFa-Alexa Fluor 700（純系 MP6-XT22）BD Biosciences 目錄號 558000、五聚體 H-2Ld - SPGAAGYDL-R-PE（S9L8）ProImmune、五聚體 H-2Ld - TPHPARIGL-R-PE（ctrl）ProImmune、抗原決定基肽多聚體 H-2Ld - SPSYVYHQF-APC（AH-1）Immudex、抗原決定基肽多聚體 H-2Ld - TPHPARIGL-APC（ctrl）Immudex。

【0275】 二級抗體：山羊抗小鼠 IgG（H+L）Peroxidase Jackson ImmunoResearch 目錄號 115-035-003、山羊抗人類 IgG（H+L）Peroxidase Jackson ImmunoResearch 目錄號 109-035-003、山羊抗人類 IgG、Fc-片段特異性- APC

Jackson ImmunoResearch 目錄號 109-136-098、山羊抗人類 IgG-APC Jackson ImmunoResearch 目錄號 109-136-088、山羊抗人 κ 輕鏈 HRP Bethyl 目錄號 A80-115P、山羊抗小鼠 λ 輕鏈 HRP Bethyl 目錄號 A90-121P、山羊抗小鼠 IgG-APC Jackson ImmunoResearch 目錄號 115-136-146、抗 His MAb,(純系 AD1.1.10)R&D Systems 目錄號 MAB050、抗 His-HRP（純系 AD1.1.10）R&D Systems 目錄號 MAB050H。

【0276】 用於活體內實驗之市售抗體:抗小鼠 CD8(純系 53.6.72)BioXCell 目錄號 BP0004-1、抗小鼠 CD4（純系 GK1.5）BioXCell 目錄號 BE0003-1、抗小鼠 PD1（純系 29F.1A12）BioXCell 目錄號 BE0273、抗三硝基苯酚 rIgG2a 同型對照(純系 2A3)BioXCell 目錄號 BE0089、抗小鼠 CTLA-4(純系 9H10)BioXCell 目錄號 BE0131、抗小鼠 PD1（純系 RMP1-14）BioXCell 目錄號 BE0146。

【0277】 自 n-CoDeR 噬菌體呈現文庫分離之內部產生之小鼠及抗人類抗體。本文描述抗小鼠 CTLA-4（純系 5-B07）及抗人類 CTLA-4（純系 4-E03）。

【0278】 ***RNA 定序分析***

實驗程序。CT26 腫瘤細胞被植入每組 10 隻 BALB/c 小鼠。植入後約 1 週，當腫瘤體積達到 20-50 mm^3（定義為第 0 天）時，小鼠未經治療或在 D0 及 D2 用 50 μl i.t.中的 10^7 pfu 非武裝痘瘡病毒（VV 空白）或 VV_{GM}-αCTLA4 治療兩次。在 D4 時，使用 Qiagen kitRNeasy Plus 微型套組收穫腫瘤且萃取 RNA。樣品在-80℃下保存，直至隨後評估其品質之當天。視後續 3' mRNA 定序需要，使用 Agilent RNA 6000 奈米套組、Agilent 2100 生物分析儀系統、2100 Expt 軟體評估經純化之 RNA 的品質以確保至少 25%之 RNA 片段比 200 nt 長(DV200>25%)。製備股特異性文庫，且兩個末端藉由 IntegraGen（法國）定序（成對末端定序），

產生 100 nt 長讀數對。

【0279】 *資料分析*。藉由定製生物資訊管線處理配對讀數。簡言之，自讀數 1 提取獨特分子標識符（UMI）序列，而自讀數 2 提取所捕捉之 RNA 片段之 3'端的序列。在基於品質之修整及品質控制之後，針對含有小家鼠完整基因體（mm10 總成）加 VV_{GM}-αCTLA4 基因體作為人工染色體外之定製基因體，將讀段 2 與 STAR 映射（Dobin 等人, 2013）。然後使用套件工具 UMI 工具（Smith 等人, 2017）中的 dedup 程序以「獨特」方法對讀數進行去除重複。最後，使用 HTSeq 計數定量去除重複讀數（Anders 等人, 2015）。然後使用 DESeq2（Love 等人, 2014）對每個樣品的讀數計數資料進行標準化，且若兩個條件之間的倍數變化高於 2，並且調整後的 p 值低於 0.1（Benjamini-Hochberg 校多測試校正），則認為基因有差異地表現。基因本體（GO）富集分析係使用上述定義的差異性表現之基因集進行的，無論上調或下調，使用來自 R 封裝 clusterProfiler（Yu 等人, 2012）的函數 enrichGO。

【0280】 ***對腫瘤 Treg 相關受體具有特異性之 Treg 耗竭抗體的分離***

對腫瘤 Treg 細胞相關受體具有特異性之抗體藉由以下方式分離：基本上如先前所描述對活體外 CDR 改組之 n-CoDeR®抗體文庫經歷腫瘤相關 Treg 細胞（自 CT26、4T1、B16 及 Lewis 肺腫瘤攜帶小鼠分離）與來自腫瘤攜帶小鼠之 $CD4^+$ T 細胞耗竭的原始細胞及 $CD11b^+$細胞之差異性生物淘選（Veitonmaki 等人, 2013）。

【0281】 ***CTLA-4 mAb 生成***

自 n-CoDeR® scFv 噬菌體呈現文庫中分離出針對人類/小鼠 CTLA-4 的抗體片段。使用負載於鏈黴抗生物素蛋白 Dynabeads 或聚苯乙烯球上之生物素化

h/mCTLA-4-His 蛋白質（Sino Biological），藉由三個連續淘選實現特異性 CTLA-4 抗體之富集。第三輪選擇亦包括用編碼 h/mCTLA-4 之細胞外及跨膜區域或不相關的非目標蛋白的 cDNA（Sino Biological）瞬時轉染的懸浮調適 HEK293-EBNA 細胞。在每次選擇生物素化的非目標蛋白之前進行預選擇。在各選擇輪之後藉由胰蛋白酶消化溶離噬菌體且使用標準程序在培養盤上擴增。來自選擇 3 之噬菌粒轉化為產生 scFv 的形式，且用於隨後的篩選試驗，其中評估與可溶性（重組蛋白）及細胞結合抗原（瞬時轉染細胞）的特異性結合。市售抗體用於藉由流動式細胞測量術、螢光微陣列技術（FMAT）及 ELISA 評估重組及細胞表面結合人類(Yervoy, Bristol Myers Squibb；抗人類 APC，Jackson）及抗小鼠 CTLA-4（BioLegend）CTLA-4。在所有實驗中包括相應同型對照作為陰性對照。對於 scFv 的初級篩選，將 h/mCTLA-4 轉染之細胞接種至 FMAT 盤中。添加大腸桿菌表現之 scFv，然後添加去糖基化小鼠抗 His 抗體（R&D Systems）及抗小鼠 APC（Jackson）。使用 8200 偵測系統（Applied Biosystems）偵測染色細胞。將來自初級篩選之陽性純系再表現，且在 ELISA 中再測試與經轉染細胞及重組蛋白之結合。對於 ELISA，將大腸桿菌表現之 scFv 添加至用 h/mCTLA-4 或非目標蛋白塗佈的盤中。使用抗 FLAG-AP（Sigma Aldrich）偵測結合之 scFv，隨後添加基質（CDP-star，Life Technologies）及發光讀數（Tecan Ultra）。

【0282】 總計 42 及 31 種獨特純系分別轉化為 hIgG1 及 mIgG2a 變異體。VH 及 VL 分別經 PCR 擴增且插入至含有抗體之重鏈及輕鏈恆定區的表現載體中，且經轉染至懸浮調適之 HEK 293EBNA 細胞（ATCC）中。根據標準程序，在轉染後 6 天收穫培養基，且使用裝有連接至 ÄKTA Purifier 系統的 MabSelect（GE Healthcare）的管柱來純化抗體。用低 pH 緩衝液溶離抗體，且隨後在最終

滅菌過濾之前使用 Spectra/Por 透析膜 4（Spectrum Laboratories Inc）透析至適當調配物緩衝液。

【0283】 藉由 CE-SDS（LabChip XII；Perkin Elmer, Massachusetts, USA）及 SE-HPLC（Ultimate 3000，Thermo Fisher Scientific）評估抗體純度。使用適用於歐洲藥典 2.6.14 當前版本：細菌內毒素，「方法 D.顯色動力學方法（Method D. Chromogenic Kinetic method）」的顯色 LAL-Endochrome-K 套組（Charles River）測定，所有製劑的內毒素均低（<0.1 EU/mg 蛋白質）。

【0284】 然後在 ELISA 及 Biacore 中評估經純化之 IgG 與經傳染之 HEK 細胞以及初生細胞及重組蛋白的結合。

【0285】 *表面電漿共振*

還使用 Biacore 3000 用表面電漿共振（SPR）技術測試與重組蛋白的結合。將抗人類 Fc（GE Healthcare）固定於濃度為 330 nM 之 CM5 感測器晶片（GE Healthcare）上作為捕捉抗體。在預測試中評估 4-E03 及伊匹單抗以及重組蛋白的最佳濃度，以獲得良好的曲線擬合及限制質量轉移。抗體以 10 μl/min 添加（在此特定實驗中為 5 nM）1 分鐘，然後以 30 μl/min 添加效價濃度（4-E03 為 1.6 至 50 nM，伊匹單抗為 1.6 至 200 nM）的人類 CTLA-4 蛋白（Sino Biological）持續 3 分鐘。在每個循環之間用 10 mM 甘胺酸（pH 1.5）再生表面。

【0286】 *細胞轉染*

使用脂染胺 2000（Life Technologies）將編碼人類及小鼠（Sino Biological）CTLA-4 之 cDNA 轉染至懸浮調適之 293FT 細胞（Life Technologies）中。將經轉染的細胞在 FreeStyleTM 293 表現培養基（Life Technologies）中在 37℃及 5% CO2、120 rpm 下培養 48 小時。使用流動式細胞測量術分析目標表現。

【0287】 *資料可用性*

在此文中所報告之 RNAseq 資料的指定寄存編號為 GEO：GSE176052。

【0288】 *定量及統計分析*

所有統計分析均使用 GraphPad Prism 9.0（GraphPad Software Inc, La Jolla, CA）進行。使用斯圖登氏 t 檢驗或單向方差分析計算 p 值。使用 Kaplan-Meier 方法繪製人道終點的生存期，且藉由對數秩檢驗分析顯著性。當 $P<0.05$ 時接受顯著性。

【0289】 *結果*

Treg 耗竭抗 CTLA-4 抗體的鑑別及表徵

免疫檢查點阻斷及抗 CTLA-4 抗體治療係經過臨床驗證的方法，但抗 CTLA-4 抗體功效的潛在機制尚未完全表徵。CTLA-4 在維持對自體抗原的耐受性方面的核心作用，同時允許 T 細胞介導之有效識別及移除外來抗原表現細胞及腫瘤細胞，已得到充分證實（Leach 等人，1996；Tivol 等人，1995；Waterhouse 等人，1995）。累積資料表明，抗 CTLA-4 抗體除可降低 T 細胞識別腫瘤抗原及排斥腫瘤的臨界值外，亦可以經由在抗體與表現 FcγR 的效應細胞相互作用後耗竭腫瘤內 Treg 細胞來發揮治療活性（Peggs 等人，2009；Simpson 等人，2013）（Ingram 等人，2018）。與此一致，最新資料指示 FcγR 及 Treg 耗竭在包括伊匹單抗之抗 CTLA-4 抗體之功效中的作用（Arce Vargas 等人, 2018）。

【0290】 使用目標不可知 F.I.R.S.T™發現平台（Veitonmaki 等人, 2013），本發明人鑑別能夠耗竭 Treg 細胞且提高 T 細胞發炎 CT26 小鼠腫瘤模型中之存活率的一系列抗體及其相關目標（資料未顯示，圖 1A 及 B）。在此等抗體當中鑑別出 CTLA-4 及抗 CTLA-4 抗體，且抗 CTLA-4 mIgG2a mAb 耗竭瘤內 Treg 細

胞且在治療攜帶同基因型 CT26 腫瘤之動物時賦予存活率（圖 1A）。人類 CTLA-4 特異性 IgG1 抗體的集中篩選鑑別了若干種純系，該等純系對表現 CTLA-4 之人類 T 細胞具有相似活體外耗竭活性（圖 1C）。在對多個供體進行篩選時，一個純系（4-E03）因其持續較強的 CTLA-4^{+} T 細胞耗竭功效而脫穎而出（圖 1C）。為研究此純系明顯更強的耗竭活性的活體內相關性，本發明人轉向將人類 PBMC 移植至 NOD SCID IL-2R γ-/-（NSG）小鼠中的模型。由於移植物抗宿主類型的相互作用，人類 Treg 及 CD8+ T 細胞經強烈活化，且顯示出與人類腫瘤中觀測到的相似的共刺激及共抑制分子表現（Buchan 等人，2018）（圖 9A）。NOG-hPBMC CD4^{+} CD25^{+} CD127^{低} Treg 及 CD8^{+} T 細胞的分析實際上揭露與從 9 名卵巢癌患者獲得的 T 細胞上觀測到的相似的 CTLA-4 表現量（圖 9A）。此外，用 10 mg/kg 伊匹單抗或額外抗 CTLA-4 抗體純系（2-C06 及 2-F09）給藥 NOG-hPBMC 小鼠證實類似的人類 CD4^{+} CD25^{+} CD127^{低} Treg 細胞之活體內耗竭活性（圖 1D）。然而，4-E03 引起人類 Treg 細胞的顯著較大耗竭。重要的是，且與 CTLA-4 在瘤內及 NOG-hPBMC CD8^{+} T 細胞與 Treg 細胞相比的較低表現一致（圖 9A），4-E03 未顯示人類活化 CD8^{+} T 細胞的耗竭（圖 1D）。生物化學表徵，尤其 4-E03 抗體製劑之 HPLC-SEC 分析展示>95%單體 IgG（資料未示出），排除由抗體聚集引起之 4-E03 增強型 Treg 耗竭。與本發明人及其他觀測結果一致，抗 CTLA-4 mAb Treg 耗竭視抗體 Fc:FcγR 相互作用而定。與 WT FcγR 功能正常 IgG1 相比，4-E03（IgG1N297Q）的 FcγR 結合受損變異體顯示嚴重受損的 Treg 耗竭（圖 9B）。

【0291】 此等發現指示，4-E03 結合於 CTLA-4 上之功能上不同的抗原決定基。本發明人因此表徵 4-E03 相對於伊匹單抗及其他抗 CTLA-4 抗體之結合及

配體阻斷活性。所有抗體對人類 CTLA-4 之細胞外域均表現出高度特異性，且藉由 ELISA 未觀測到與其密切相關的人類同源物 CD28 的結合（圖 1E）。雖然 4-E03 及伊匹單抗以與 hCTLA-4 相似的效力及功效結合（圖 1E 及圖 9C），但僅 4-E03 顯示出與小鼠 CTLA-4 的弱但明顯的交叉反應性（圖 1E）。此等發現與兩個抗體與不同抗原決定基一致。

【0292】 4-E03 及伊匹單抗的進一步比較分析評估與活體外活化之人類 $CD4^+$ T 細胞上的內源性表現 CTLA-4 的結合（圖 9D 及圖 1F），B7:CTLA-4 相互作用的阻斷（圖 1G），或抑制 B7:CTLA-4 介導之 T 細胞抑制（圖 1H），揭露在其他情況下幾乎相同的功效及效力。總之，結果表明，4-E03 與功能上不同的 CTLA-4 抗原決定基結合，其與較強的 Treg 耗竭相關，但等效阻斷 B7:CTLA-4 誘導之 T 效應細胞抑制對伊匹單抗靶向的抗原決定基。

【0293】 由於 4-E03 僅與小鼠 CTLA-4 發生微弱的交叉反應（圖 1E），因此本發明人隨後專注於篩選，以鑑別用於在免疫活性小鼠腫瘤模型中進行活體內概念驗證研究的合適替代物。一種純系（5-B07）經鑑別，其顯示與小鼠 CTLA-4 轉染之 CHO 細胞（圖 1I）及小鼠 CTLA-4 蛋白（圖 9E）高度特異性結合，阻斷 B7:CTLA-4 相互作用（圖 1J）及與人類環境中之 4-E03 相比瘤內小鼠 Treg（圖 1K）類似強耗竭。此外，抗 mCTLA-4（5-B07）具有抗腫瘤活性且提高攜帶 CT26 腫瘤之 BALB/c 小鼠的存活率（圖 1L）。如在人類細胞上在抗 hCTLA-4（4-E03）之情況下所觀測，發現小鼠 Treg 之抗 mCTLA-4（5-B07）耗竭取決於 Fc:FcγR 相互作用。5-B07 之 Fc:FcγR 結合功能正常但非 Fc:FcγR 結合受損的變異體耗竭瘤內 Treg（圖 9F）。

【0294】 相似的顯著 Treg 耗竭活性，以及其對 CTLA-4 之相似高特異性

及 CTLA-4:B7 家族相互作用的阻斷活性，表明抗 hCTLA-4（4-E03）及抗 mCTLA-4（5-B07）的治療潛力作為合適的 MoA 匹配的替代物。

【0295】 **用於腫瘤選擇性 CTLA-4 阻斷及 Treg 耗竭之抗體編碼溶瘤病毒工程改造**

抗 CTLA-4 抗體療法之常見副作用與 CTLA-4 作為維持 T 細胞穩態及對自身耐受性的中心檢查點的公認作用一致（Tivol 等人, 1995；Waterhouse 等人, 1995）。然而，Quezada 及其同事近期工作表明，瘤內 Treg 耗竭可能顯著促進伊匹單抗的臨床活性（Arce Vargas 等人，2018），且瘤內遞送的 Treg 耗竭抗體可能在小鼠腫瘤模型中提供顯著的抗腫瘤活性（Fransen 等人，2013；Marabelle 等人，2013b）。此抗 CTLA-4 之雙重活性，分別作用於中心及周邊區室，表明將抗 CTLA-4 療法定位於腫瘤可能係一種有吸引力的策略，可以將抗 CTLA-4 功效與毒性分離。

【0296】 發明人假設，經工程改造以表現 Treg 耗竭抗 CTLA-4 的瘤內遞送之溶瘤病毒（OV）將代表達成有效但安全的腫瘤定位抗 CTLA-4 療法的特別有吸引力的方法。除了能夠在感染腫瘤細胞後在 TME 中產生局部抗體及阻斷 CTLA-4 受體及 Treg 耗竭外，OV 被認為具有直接及間接的抗腫瘤活性，且已經批准用於癌症免疫治療（Bommareddy 等人, 2018）.

【0297】 因此，本發明人設計一種痘瘡病毒載體，該載體源自減毒的哥本哈根病毒株（Foloppe 等人，2019），具有臨床證明的安全性及在全球天花疫苗接種計劃中觀測到的強免疫調節作用，以及在免疫荒漠型及免疫排除型癌症的小鼠實驗模型中的溶胞及炎症細胞浸潤誘導特性（Fend 等人，2017；Kleinpeter 等人，2016；Liu 等人，2017；Marchand 等人，2018），具有全長抗 hCTLA-4 或

抗 mCTLA-4 IgG 抗體序列。亦生成另外編碼 GM-CSF（VV_{GM}-αCTLA4）（圖 2A）的變異體載體，其為一種生長因子誘導劑及骨髓組織生成及先天免疫細胞趨化性的增強劑，且評估其治療效果。

【0298】 在基因重構之後，重組抗 CTLA-4 編碼病毒經證實可以感染、複製（圖 2B）及裂解（圖 2C）腫瘤細胞株。進一步顯示與重組產生的蛋白質相比，用經工程改造之溶瘤病毒感染的腫瘤細胞株產生全長 IgG 抗體及 GM-CSF 轉殖基因（圖 2D 及 2E），與 CTLA-4 受體（圖 2G）等效結合且支持 GM-CSF 依賴性 TF-1 細胞增殖（圖 2F）。BT-001 感染之 MIA-PaCa-2 腫瘤細胞產生的 4-E03 亦顯示活體內耗竭人類 Treg 細胞（圖 2H）。

【0299】 瘤內 VV_{GM}-αCTLA4 具有與腫瘤選擇性 CTLA-4 受體飽和及 Treg 耗竭相關的抗腫瘤活性

VV_{GM}-αCTLA4 抗腫瘤活性首先在 CT26 BALB/c 模型中進行評估，該模型已知被 T 細胞高度浸潤且對全身性抗 CTLA-4 抗體治療敏感（Grosso 及 Jure-Kunkel，2013）。三次瘤內注射 7.5×10^4、7.5×10^5 或 7.5×10^6 pfu VV_{GM}-αCTLA4 至攜帶 CT26 腫瘤之動物表現出劑量依賴性抗腫瘤作用，在 10^6-10^7 pfu 達到峰值，其中治癒了 6-7/10 隻動物（圖 3A）。用不含抗 CTLA-4 抗體及/或 GM-CSF 轉殖基因的對照病毒治療顯示出對抗 CTLA-4 抗體的絕對依賴（0/10 小鼠存活），以及 GM-CSF 對抗 CTLA-4 的邊緣增強作用，以獲得治療效果（7/10 與 5/10 小鼠存活）。基於已確立之劑量依賴性、抗 CTLA-4 抗體依賴性及 GM-CSF 增強效應，本發明人因此使用瘤內遞送 1×10^7 pfu 之劑量進行研究對雙轉殖基因編碼 OV（VV_{GM}-αCTLA4）之治療及機理評估以及表徵。

【0300】 本發明人隨後在瘤內投予轉殖基因編碼痘苗 OV 之後評估抗

CTLA-4（圖 3B）、GM-CSF（圖 10A）及病毒顆粒（圖 10B）之腫瘤及全身性濃度。瘤內注射 10^7 VV_{GM}-αCTLA4 感染性顆粒進入同基因型小鼠攜帶腫瘤之免疫勝任型小鼠產生與腫瘤持續飽和相關的腫瘤內抗體暴露，但與血液、CTLA-4 表現細胞無關（圖 3B 及圖 1I）。類似地，相較於血液，向攜帶人類腫瘤異種移植免疫缺陷小鼠 i.t.投予 VV_{GM}-αhCTLA4 在腫瘤中產生的抗體濃度高出幾個數量級（圖 10C-E）。與瘤內投予在腫瘤中達到受體飽和濃度但並非全身性區室（圖 3B）一致，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 導致瘤內 Treg 細胞幾乎完全耗竭，但不影響攜帶 CT26 腫瘤之 BALB/c 小鼠脾臟中的 Treg 數目（圖 3C）。

【0301】 總體而言，結果表明，瘤內投予抗 CTLA-4 編碼痘瘡病毒成功地達成了腫瘤限制性 CTLA-4 受體飽和及活體內 Treg 耗竭，支持其腫瘤選擇性抗 CTLA-4 治療性質並促進在多種癌症實驗模型中的活體內功效及耐受性。

【0302】 **VV_{GM}-αCTLA4 具有廣泛之抗腫瘤活性**

本發明人繼續評估抗腫瘤活性，即 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 在一系列免疫勝任型的小鼠癌症模型中的抗腫瘤活性，該等模型跨越不同遺傳小鼠背景下不同來源的血液學癌（A20）及實體癌（CT26 BALB/c 結腸；EMT6 BALB/c 乳房、MC38 C57BL/6 結腸及 B16 C57BL/6 黑色素瘤，圖 4A），代表高度 T 細胞發炎（CT26）至免疫排除型（B16）腫瘤微環境。該等模型包括對用抗 CTLA-4 或抗 PD-1 之 ICB 敏感或具有抗性之模型。

【0303】 引人注目的是，將 VV_{GM}-αCTLA4 經 i.t.投予至攜帶以多種免疫炎症類型腫瘤微環境為表徵之已建立之同基因型腫瘤的 C57BL/6 或 BALB/c 小鼠中已治癒了大多數（A20=10/10，EMT6=8/10，MC38=8/10 及 CT26=10/10 存活的小鼠）的動物（圖 4A）。同樣令人印象深刻的是，在以免疫荒漠型 TME 及

抗 PD-1 及抗 CTLA-4 為特徵的 B16 C57BL/6 模型中，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 顯著延緩了腫瘤生長且治癒 3/10 的動物。此等結果指示 VV_{GM}-αCTLA4 在不同癌症類型中的廣泛治療潛力，包括具有不同發炎性及免疫排除型之患者中。

【0304】 **用 VV_{GM}-αCTLA4 進行瘤內治療誘導持久的全身性抗腫瘤免疫**

臨床前及臨床研究已經證明腫瘤局部癌症免疫療法的治療潛力。單獨的瘤內溶瘤病毒療法（Andtbacka 等人，2015）或與 ICB 聯合（Chesney 等人，2018；Ribas 等人，2017）在黑色素瘤癌症患者中誘導持久反應。從機制上講，已提出 i.t.溶瘤療法可誘導或增強發炎細胞浸潤至注射腫瘤中，導致腫瘤抗原呈遞增加，遷移至引流淋巴結，且在引發後，$CD8^+$ T 細胞運輸至遠端（未注射）腫瘤病變以發揮全身抗腫瘤「遠端」效應（Ngwa 等人，2018）。在臨床中，此類全身性適應性抗腫瘤記憶反應的誘導將係至關重要的，因為癌症患者可能會出現以轉移、不可偵測或不可注射之腫瘤為特徵的廣泛疾病。

【0305】 本發明人使用多管齊下的方法來評估是否 i.t.VV_{GM}-αCTLA4 誘導遠端效應及全身性抗腫瘤免疫。首先，使用「雙腫瘤模型」，其中腫瘤細胞經皮下移植至每隻動物的左右側腹，但僅一個腫瘤注射有 OV 而另一個未經治療，可以評估遠端效應且表現為未注射的腫瘤中腫瘤生長減少。

【0306】 在攜帶 CT26 腫瘤之小鼠中瘤內注射最有效之 VV_{GM}-αCTLA4 劑量導致注射腫瘤的完全排斥（9/9）及未注射腫瘤的幾乎完全排斥（7/9），表明有強烈的遠端效應（圖 4B）。以下真正遠端性質，即 i.t.OV 投予的真正遠端性質得到雙重證實。首先，且為了排除病毒顆粒自注射至未注射之腫瘤擴散的潛在治療效果，對未注射之腫瘤進行分析且確認病毒顆粒呈陰性（圖 11A）。

【0307】 其次，使用雙腫瘤模型，本發明人比較治療上最有效（10^7 pfu）

及次佳（10^5 pfu）劑量之局部（i.t.）或全身性（i.v.）投予的 VV_{GM}-αCTLA4 的抗腫瘤活性。與真正遠端效應一致，與兩種測試劑量之靜脈內投予相比，i.t.投予賦予增強的存活率（圖 11C）。事實上，在排斥未注射之腫瘤方面，經 i.t.給藥 10^5 pfu 至少與大 100 倍之 i.v.注射劑量一樣有效（圖 11B 及 11C）。最後，且與之一致，經 i.t.OV 投予誘導適應性抗原特異性免疫反應之免疫記憶特徵，治癒的動物受保護以免受相同（CT26）但並非無關（Renca）腫瘤之再次攻擊（圖 11D）。

【0308】 **VV_{GM}-αCTLA4 引發強大全身性 $CD8^+$ T 細胞依賴性抗腫瘤免疫**

本發明人藉由評估與 $CD4^+$ T 細胞耗竭或 $CD8^+$ T 細胞耗竭之 CT26 腫瘤攜帶小鼠相比免疫完整之 VV_{GM}-αCTLA4 治療活性來研究全身性抗腫瘤免疫反應之性質（圖 5A 及圖 13A）。引人注目的是，$CD8^+$ T 細胞耗竭完全消除 VV_{GM}-αCTLA4 抗腫瘤活性。$CD4^+$ T 細胞耗竭減少但並未去除 VV_{GM}-αCTLA4 效應。此等資料證實 VV_{GM}-αCTLA4 抗腫瘤活性極其取決於 $CD8^+$ T 細胞。除了證明遠端效應及針對再次攻擊的腫瘤特異性保護外，結果強烈表明腫瘤內遞送之 VV_{GM}-αCTLA4 誘導強大的全身性 $CD8^+$ T 細胞抗腫瘤免疫性。

【0309】 因此，本發明人隨後評估是否 i.t.VV_{GM}-αCTLA4 在腫瘤及周邊誘導或擴增之腫瘤特異性及病毒特異性 $CD8^+$ T 細胞。用 VV_{GM}-αCTLA4 瘤內治療 CT26 攜帶腫瘤之 BALB/c 小鼠，或用抗 mCTLA-4 mAb 5-B07（3 mg/kg）全身性（i.p.）模擬臨床上可獲得之抗 CTLA-4 療程。藉由兩種方法量化腫瘤及中心區室（脾臟）中的 CT26 腫瘤特異性及痘苗特異性 $CD8^+$ T 細胞；使用 CT26 腫瘤抗原（AH-1）特異性及痘瘡病毒特異性多聚體直接量化所收集脾臟中的腫瘤特異性 CD8+ T 細胞，且評估活體外對脾細胞（圖 5B）刺激後 IFN-γ^+ TNF-α^+ $CD8^+$ T 細胞或分別用 CT26 衍生之腫瘤肽 AH-1 及痘苗衍生之肽 S9L8 或評估

TIL。包括用 PBS 或僅編碼 GM-CSF 之 VV 治療作為對照。如所預期，且與瘤內 VV_{GM}-αCTLA4 誘導強大的全身性 $CD8^+$ T 細胞依賴性抗腫瘤免疫一致，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 誘發之腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞在注射之腫瘤及周邊（未注射之腫瘤及脾臟）區室（圖 5B-5D 及 13B）中，如藉由脾細胞的活體外刺激或抗原決定基肽多聚體染色進行評估。令人印象深刻的是，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 擴增腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞與全身性抗 CTLA-4 相比更有效。用 PBS 或缺乏 αCTLA-4 之病毒的對照治療藉由任一讀出均不誘導腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞。有趣的是，用 VV_{GM}-αCTLA4 經 i.t.治療亦誘導痘苗特異性 $CD8^+$ T 細胞，即使數目較少。

【0310】 總體而言，此等資料表明腫瘤內 VV_{GM}-αCTLA4 誘導強大的全身性 $CD8^+$ T 細胞依賴性抗腫瘤免疫。

【0311】 **瘤內誘導之 CD8+ T 細胞抗腫瘤免疫係 FcγR 依賴性的且與 Treg 耗竭相關**

廣泛抗腫瘤活性、在腫瘤及周邊中的腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞的強烈擴增以及 Treg 細胞之腫瘤限制性耗竭，支持用 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 進行高效及安全的治療

【0312】 為進一步評估及證實抗體介導之 Treg 耗竭在抗腫瘤免疫中的作用，本發明人比較 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 在攜帶 CT26 腫瘤之 WT 及常見 γ 鏈缺陷（*Fcer1g*$^{-/-}$）BALB/c 小鼠中的抗腫瘤作用。*Fcer1g*$^{-/-}$小鼠缺乏功能性活化 Fcγ 受體及抗 CTLA-4 抗體活體內 Treg 耗竭及相關的抗腫瘤活性先前顯示為活化 FcγR 依賴性（Arce Vargas 等人，2018；Simpson 等人，2013）。與抗 CTLA-4 誘導之 Treg 耗竭一致，i.t.VVGM-αCTLA4 抗腫瘤免疫，WT（10/10），但並非 FcγR 缺陷動物（3/10），完全受到保護且自其癌症中治癒（圖 6A）。在 FcγR 缺陷動物

中觀測到的有限但顯著的抗腫瘤活性與本發明人及其他人的觀測結果一致，即病毒載體（圖 4A）及 CTLA-4:B7 阻斷本身在不存在 Treg 耗竭的情況下（圖 9F 及 12A）延遲腫瘤生長，但僅貢獻有限的生存優勢。

【0313】 除為經抗體塗佈之目標細胞提供免疫效應介導之 ADCC 及 ADCP 外，FcγR 已經證明可以促進腫瘤抗原交叉呈遞（DiLillo 及 Ravetch，2015），擴大及增強 $CD8^+$ T 細胞抗腫瘤反應以涵蓋通常排除的 MHCII 限制性細胞外腫瘤抗原。本發明人的發現 i.t.VV_{GM}-αCTLA4 抗腫瘤免疫為 FcγR 依賴性的，且誘導腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞的更強勁擴增，另外誘導病毒特異性 $CD8^+$ T 細胞表明其亦可能促進腫瘤抗原交叉呈遞。與病毒骨架（VV）注射及未經治療之攜帶 CT26 腫瘤之小鼠相比（圖 6B 及圖 6C），藉由自 VV_{GM}-αCTLA4 注射收集之腫瘤的差異基因表現分析強化此概念。除了上調 Batf 本身外，差異基因分析表明 I 型 IFN 反應及 CD8α 標記之上調與抗原交叉呈遞 cDC1 樹突狀細胞相關。額外標記支持以上表徵之 $CD8^+$ T 細胞依賴性（及潛在 NK 細胞介導之顆粒酶依賴性）腫瘤細胞溶解，從而導致 VV_{GM}-αCTLA4 抗腫瘤免疫之觸發及驅動。

【0314】 為評定 VV_{GM}-αCTLA4 誘導之抗腫瘤免疫性中抗原交叉呈遞之作用，本發明人使用缺乏轉錄因子 *Batf3* 之小鼠（*Batf3*$^{-/-}$小鼠）。*Batf3*$^{-/-}$小鼠缺乏 $CD8\alpha^+$樹突狀細胞，且因此在感染期間表現出有缺陷的抗原交叉呈遞及 $CD8^+$ T 細胞對病毒的反應嚴重受損，且在小鼠癌症實驗模型中對腫瘤抗原的反應嚴重受損（Hildner 等人，2008）。此外，已知 cDC1 及抗原交叉呈遞可介導免疫檢查點阻斷劑的治療活性，包括 αCTLA-4（Gubin 等人，2014）。因此，發明人比較了 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 在移植有 MC38 腫瘤之 *Batf3*$^{+/+}$及 *Batf3*$^{-/-}$C57BL/6 小鼠中的抗腫瘤活性。引人注目的是，*Batf3* 缺陷消除了 i.t.VV_{GM}-αCTLA4 抗腫瘤免疫，

如藉由 0/8 *Batf3*$^{-/-}$與存活的 9/9 WT 小鼠相比（圖 6D）所表明。

【0315】 總體而言，此等結果證實 VV_{GM}-αCTLA4 具有 FcγR 依賴性及 cDC1 依賴性抗腫瘤活性，瘤內鑑別誘導之 Treg 耗竭及腫瘤抗原交叉呈現作為主要機制，及瘤內 CTLA-4:B7-阻斷及腫瘤溶解作為支持機制，係基礎 i.t.VV_{GM}-αCTLA4 誘導 $CD8^+$T 細胞抗腫瘤免疫的基礎。

【0316】 瘤內 VV_{GM}-抗 CTLA-4-VV 擴大周邊效應 $CD8^+$ T 細胞且減少 Treg 及耗盡的 $CD8^+$T 細胞

本發明人繼續定性地特性化 i.t.VV_{GM}-αCTLA4 如何調節注射之及側腹腫瘤以及周邊的 TIL 反應。使用多色流動式細胞測量術及經設計以用於鑑別功能不同的抗腫瘤及促腫瘤 TIL 亞群的高維抗體圖譜，鑑別整個治療組中的 12 個 T 細胞簇（圖 7 及圖 13C）。引人注目的是，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 相比於用模擬治療動物消除了所注射腫瘤中之耗盡（PD-1^+ TIM-3^+）$CD8^+$ T 細胞且穩固地擴增未耗盡之 $Klrg1^+$效應 $CD8^+$ T 細胞（圖 7）。同時，且與以上發現一致，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 有效耗竭 CTLA-4^+腫瘤內 Treg，包括 $Klrg1^+$ Treg，已知其表現高水準的 CTLA-4 且特別具有抑制性（Nakagawa 等人，2016）（圖 7）。

【0317】 尚未注射編碼抗體之病毒之側接遠端腫瘤之評定揭示藉由 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 對 TIL 的調節類似但較低。此外，且根據本發明人的觀測結果，編碼 αCTLA4 之溶瘤病毒的瘤內投予在周邊（圖 5B-5D）中擴增腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞，i.t.VV_{GM}-αCTLA4 在脾臟中誘導活化之顆粒酶 B^+（$Klrg1^+$）$CD8^+$ T 細胞亞群（圖 7A）。最後，且與實現腫瘤限制性 Treg 耗竭之抗體編碼病毒一致，在腫瘤床中耗竭之 Treg 群體在脾臟中基本上未改變，藉由 i.t.VV_{GM}-αCTLA4（圖 7A）。

【0318】 **瘤內抗 CTLA-4-VV 與抗 PD-1 結合以排斥「冷」遠端腫瘤**

本發明人之觀測表明，VV_{GM}-αCTLA4 在注射之腫瘤中局部起作用，主要藉由涉及抗 CTLA-4mAb 依賴性腫瘤抗原交叉呈遞及 Treg 耗竭的機制，以「點燃」全身性適應性抗腫瘤免疫及強大的周邊腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞擴增。此等發現表明，VV_{GM}-αCTLA4 可能與幫助將 $CD8^+$ T 細胞動員至腫瘤的治療劑產生協同作用。認為抗 PD-1 主要藉由逆轉 T 細胞衰竭（Hui 等人, 2017；Wei 等人, 2018）且可能藉由動員幹細胞樣記憶 $CD8^+$ T 細胞至腫瘤來起作用（Galletti 等人, 2020；Simon 等人, 2020）。儘管抗 PD-1 能夠提高不同來源之多種實體癌的存活率，但抗 PD-1 並不能改善免疫浸潤較差的「冷腫瘤」患者的後果（Galon 及 Bruni，2019），其可能代表了當今癌症治療中最大未滿足的醫療需求。

【0319】 因此，基於其明顯不同且可能互補的作用機制，本發明人隨後研究了抗 PD-1 及 VV_{GM}-αCTLA4 的協同作用，其中重點係使用 B16 C57BL/6 作為模型系統的 ICB 抗性、免疫浸潤性差及免疫原性差的「冷」癌症。先前資料表明，B16 腫瘤對 ICB 治療係難治性的，包括抗 PD-1（10 mg/kg）、抗 CTLA-4（10 mg/kg）或其組合之臨床相關全身性投予（圖 14）。

【0320】 為了模擬可觸及的大腫瘤將被注射抗體編碼病毒，但無法注射小的或不可偵測的轉移病灶的臨床情況，本發明人建立雙腫瘤 B16/C57BL6 模型，其中動物攜帶一個「大」腫瘤及一個「小」腫瘤，且其中僅大腫瘤經 i.t.注射有 VV_{GM}-αCTLA4。用 10 mg/kg 之最大有效劑量進行全身性治療後，缺乏腫瘤生長抑制或生存益處來證實對抗 PD-1 的抗性（圖 8A）。

【0321】 如先前所觀測，用 VV_{GM}-αCTLA4 單一藥劑治療顯著減少原發注射腫瘤之腫瘤生長（圖 4 及 8B）。然而，i.t. VV_{GM}-αCTLA4 僅誘導未注射腫瘤

之生長的輕微延遲（圖 8B），此未轉化為使動物存活（圖 8A）。接著引人注目地，且與單一藥劑或組合之抗 PD-1 及抗 CTLA-4 療法相比，使用 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 及全身性抗 PD-1 的組合治療顯著抑制注射及未注射的腫瘤生長，使得約 20%的動物在此 ICB 治療抗性「冷」癌症模型中治癒（圖 8A）。

【0322】 與 VV_{GM}-αCTLA4 能夠將 ICB 抗性冷腫瘤轉變為發炎 ICB 反應性表型進一步一致，使用 VV_{GM}-αCTLA4 的組合治療（但並非單獨的抗 PD-1）誘導 T 細胞大量流入 B16 腫瘤，使該等腫瘤與發炎的 CT26 腫瘤相比變得類似地密集富含 T 細胞（圖 14C）。

【0323】 此等指示，組合之 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 及全身性抗 PD-1 的協同效應在移植了同基因型 A20 腫瘤的 BALB/c 小鼠中得到證實。該模型顯示對抗 PD-1 具有半反應性，其中約 20%的動物藉由完全治療性 i.p.給藥（10 mg/kg）而治癒（圖 8C）。雖然 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 的最佳治療劑量係完全保護性的（10/10 隻動物治癒，圖 4），以 1/100 的最佳劑量進行的次佳治療顯示出不明顯的腫瘤生長抑制作用，且無生存優勢。當治療性 i.p.抗 PD-1 及亞治療性 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 組合時，大多數動物（7/10）被治癒（圖 8C）。

【0324】 *論述*

本發明人提供了活體內概念驗證，即腫瘤內投予癌病毒編碼之 Treg 耗竭 αCTLA-4 與已獲批的全身性 αCTLA-4 方案相比具有更強、更廣泛的抗腫瘤活性，但經由其腫瘤限制性質的暴露指示為安全且耐受性良好的。I.t.VV_{GM}-αCTLA4 與全身性重組 αCTLA-4 相比誘導更強的腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞擴增，且在免疫浸潤差的「冷」同基因型小鼠腫瘤模型中具有抗腫瘤活性，該模型對臨床相關給藥 αCTLA-4 及 αPD-1 具有抗性。值得注意的是，吾人之觀測表明，由

癌病毒 αCTLA-4 誘導之有效的全身性抗腫瘤免疫嚴格地來源於注射腫瘤中的「免疫點燃」效應；i.t.VV_{GM}-αCTLA4 與病毒擴散或抗體暴露於遠端未注射腫瘤無關，而實際上達成腫瘤限制性 CTLA-4 受體飽和及 Treg 耗竭。

【0325】 此等觀測結果對 i.t. VV_{GM}-αCTLA4 預期的臨床療效及耐受性具有重要意義。自功效視角，其表明局部投予癌病毒編碼之 αCTLA-4 與可獲得的（伊匹單抗）相比，及 Treg 耗竭最佳化之（Arce Vargas，Furness 等人，2018）或「遮蔽」（Gutierrez，Long 等人，2020）全身性 αCTLA-4 抗體方案以及與先前所描述之編碼非 Treg 耗竭最佳化 αCTLA-4 （Aroldi, Sacco 等人，2020）之溶瘤病毒方法相比可提供更大的治療效益。在機理水準下，VV_{GM}-αCTLA4 誘導 FcγR 依賴性 Treg 耗竭及 $cDC1^+$抗原交叉呈遞可能為所觀測之強大 $CD8^+$ T 細胞擴增及與 αPD-1 協同作用的基礎以排斥冷腫瘤。除介導內源性抗腫瘤免疫反應之誘導（Hildner 等人，2008）及全身性檢查點阻斷療法之功效（Gubin, Zhang 等人，2014；Salmon, Idoyaga 等人，2016；Garris, Arlauckas 等人，2018）外，cDC1 促進瘤內 $CD8^+$ TIL 之增殖反應，擴增 $TCF1^+$幹樣前驅物的池，且誘導 $TIM3^+$末端效應子在 αPD-1 療法期間之產生（Mao 等人, 2021）。

【0326】 類似地，用 mAb 達成對共刺激或共抑制受體（例如 IL-2R 及 CTLA-4）的 Treg 耗竭可促進 $CD8^+$效應功能且與 αPD-1 協同作用（Wei 等人，2019；Solomon 等人，2020）。關於減少 Treg 且擴增抗腫瘤 $CD8^+$ T 細胞之「雙活性」免疫調節抗體的開發，累積的資料表明目標生物學、效應 $CD8^+$ T 細胞增強及 Treg 耗竭特性的微調，以及遞送方案的重要性。例如，最近證明與配體-阻斷 αIL-2R 抗體（Solomon 等人, 2020）相比，FcγR 勝任型非配體阻斷 IL-2R 的抗體，其耗竭 Treg 但不使 $CD8^+$效應 T 細胞失去關鍵（IL-2 介導的）生長生存信

號，在癌症治療中具有優越的治療潛力。

【0327】 類似地，但不同的是，本發明人最近報導針對 4-1BB 之抗體可藉由抗體同型轉換（改變 FcγR 接合）來耗竭 Treg 或促進效應 T 細胞擴增，但利用兩種機制需要依序投予或鉸鏈工程（Buchan 等人，2018）。如本文在溶瘤病毒感染之情況下所描述，當單獨或與協同性檢查點阻斷療法（例如抗 PD-1/L1）組合使用時，Treg 耗竭增強功能性阻斷抗 CTLA-4 對注射腫瘤之空間限制似乎係利用免疫調節性抗 CTLA-4 抗體之最大治療活性的特別有前景的方法。

【0328】 若干觀測結果支持最佳化抗 CTLA-4 中的 Treg 耗竭以用於腫瘤局部療法。首先，獨立研究已經確定抗 CTLA-4 之治療功效取決於 Treg 耗竭且與之相關（Arce Vargas 等人，2018；Simpson 等人，2013）。本文提供 Treg 耗竭抗 CTLA-4 純系之治療活性資料，其與 FcγR 缺陷型（非耗竭）對應物相比，其在 FcγR 功能正常（Treg 耗竭）抗體 Fc 格式及宿主中顯示出強烈的療效，支持此觀點。其次，雖然最近報導用伊匹單抗治療之黑色素瘤患者的臨床結果與 FcγR 接合及 Treg 耗竭相關，但來自本發明人 T 細胞人類化小鼠模型的資料表明，與本文載體化的抗 CTLA-4 抗體 4-E03 相比，伊匹單抗針對表現腫瘤內相關水準的 CTLA-4 的人類 Treg 細胞具有有限的耗竭活性。此外，雖然臨床耐受劑量之伊匹單抗（1 mg/kg 至 3 mg/kg，取決於適應症及方案）僅與亞飽和 CTLA-4 受體佔有率及次最大效應相關（Ribas 等人，2005）（Bertrand 等人，2015），本發明人資料表明溶瘤載體化及 i.t.投予可以以明顯安全的方式產生治療上最佳之暴露（持續的 CTLA-4 受體飽和）--即使 Treg 耗竭增強之抗 CTLA-4 亦如此。最後，支持吾人對 Treg 耗盡增強及檢查點阻斷「雙活性」αCTLA-4 抗體的載體化，抗體介導之 CTLA-4 阻斷最近顯示與 FcγR 依賴性耗竭協同作用以改善腫瘤特異性 $CD8^+$

T 細胞反應。CTLA-4 之抗體阻斷使腫瘤內 Treg 功能不穩定，且經由涉及改變糖酵解及競爭 B7 配體的過程促進 B7:CD28 共刺激及抗腫瘤 $CD8^+$ T 效應功能（Zappasodi 等人，2021）。

【0329】 參考文獻

1. Hodi FS、O'Day SJ、McDermott DF、Weber RW、Sosman JA、Haanen JB 等人，使用伊匹單抗改善轉移性黑色素瘤患者之存活率（Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma）.《新英格蘭醫學雜誌（*N Engl J Med.*）》2010;363(8):711-23。

2. Larkin J、Chiarion-Sileni V、Gonzalez R、Grob JJ、Cowey CL、Lao CD 等人，在未經治療之黑色素瘤中使用納武單抗及伊匹單抗之組合或單一療法（Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma）.《新英格蘭醫學雜誌》2015;373(1):23-34。

3. Topalian SL、Hodi FS、Brahmer JR、Gettinger SN、Smith DC、McDermott DF 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》2012;366(26):2443-54.

4. Sharma P、Hu-Lieskovan S、Wargo JA 及 Ribas A，對癌症免疫療法之原發性、適應性及獲得性抗性（Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy）.《細胞（*Cell*）》.2017;168(4):707-23。

5. Chen DS 及 Mellman I.腫瘤學遇到免疫學：癌症-免疫循環(Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle）.《免疫（*Immunity*）》.2013;39(1):1-10.

6. Gajewski TF、Schreiber H 及 Fu YX.腫瘤微環境中之先天性及適應性免疫

細胞（Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment）.《自然-免疫學（*Nat Immunol*）》.2013;14(10):1014-22。

7. Wagner J、Wickman E、DeRenzo C 及 Gottschalk S.實體腫瘤之 CART 細胞療法：光明的未來抑或黑暗的現實？（CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality?）《分子治療（*Mol Ther.*）》 2020;28(11):2320-39。

8. Ribas A、Dummer R、Puzanov I、VanderWalde A、Andtbacka RHI、Michielin O 等人，溶瘤病毒療法促進瘤內 T 細胞浸潤且改善抗 PD-1 免疫療法（Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy）.《細胞》.2017;170(6):1109-19 e10。

9. Wei SC、Sharma R、Anang NAS、Levine JH、Zhao Y、Mancuso JJ 等人，負共刺激藉由對可能的細胞狀態施加邊界來限制 T 細胞分化（Negative Co-stimulation Constrains T Cell Differentiation by Imposing Boundaries on Possible Cell States）.《免疫》.2019;50(4):1084-98.e10。

10. Arce Vargas F、Furness AJS、Litchfield K、Joshi K、Rosenthal R、Ghorani E 等人，Fc 效應功能有助於人類抗 CTLA-4 抗體之活性（Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies）.《癌細胞（*Cancer Cell*）》.2018;33(4):649-63 e4。

11. Postow MA、Chesney J、Pavlick AC、Robert C、Grossmann K、McDermott D 等人，在未經治療之黑色素瘤中納武單抗及伊匹單抗對比伊匹單抗（Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma）.《新英格蘭醫學雜誌》2015;372(21):2006-17。

12. Bertrand A、Kostine M、Barnetche T、Truchetet ME 及 Schaeverbeke T.與

抗 CTLA-4 抗體相關之免疫相關不良事件：系統回顧及薈萃分析（Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis）.《BMC 醫學（*BMC Med.*）》2015;13:211。

13. Tivol EA、Borriello F、Schweitzer AN、Lynch WP、Bluestone JA 及 Sharpe AH.CTLA-4 之損失導致大量淋巴細胞增殖及致命多器官組織破壞，揭露 CTLA-4 之關鍵負調節作用（Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4）.《免疫》.1995;3(5):541-7。

14. Marabelle A、Kohrt H 及 Levy R.瘤內抗 CTLA-4 療法：提高療效同時避免毒性（Intratumoral anti-CTLA-4 therapy: enhancing efficacy while avoiding toxicity）.《臨床癌症研究（*Clin Cancer Res*）》. 2013;19(19):5261-3。

15. Marabelle A、Kohrt H、Sagiv-Barfi I、Ajami B、Axtell RC、Zhou G 等人，在單個部位耗竭腫瘤特異性 Treg 可根除播散性腫瘤（Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors）.《臨床研究雜誌（*J Clin Invest.*）》2013;123(6):2447-63。

16. Waterhouse P、Penninger JM、Timms E、Wakeham A、Shahinian A、Lee KP 等人，在缺乏 Ctla-4 之小鼠中早期致死性的淋巴增生性疾病（Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4）.《科學（*Science*）》.1995;270(5238):985-8。

17. Leach DR、Krummel MF 及 Allison JP.藉由 CTLA-4 阻斷增強抗腫瘤免疫性（Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade）.《科學》.1996;271(5256):1734-6。

18. Peggs KS、Quezada SA、Chambers CA、Korman AJ 及 Allison JP.CTLA-4 對效應及調節性 T 細胞區室之阻斷有助於抗 CTLA-4 抗體的抗腫瘤活性（Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies）.《實驗醫學雜誌（*J Exp Med.*）》2009;206(8):1717-25。

19. Simpson TR、Li F、Montalvo-Ortiz W、Sepulveda MA、Bergerhoff K、Arce F 等人，腫瘤浸潤性調節性 T 細胞之 Fc 依賴性耗竭共同定義抗 CTLA-4 療法對黑色素瘤之功效（Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma）.《實驗醫學雜誌》2013;210(9):1695-710。

20. Ingram JR、Blomberg OS、Rashidian M、Ali L、Garforth S、Fedorov E 等人，抗 CTLA-4 療法需要 Fc 域才可發揮功效（Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy）.《美國國家科學院院刊（*Proc Natl Acad Sci U S A.*）》2018;115(15):3912-7。

21. Veitonmaki N、Hansson M、Zhan F、Sundberg A、Lofstedt T、Ljungars A 等人，藉由功能優先方法分離之人類 ICAM-1 抗體在活體內具有強大的巨噬細胞依賴性抗骨髓瘤活性（A human ICAM-1 antibody isolated by a function-first approach has potent macrophage-dependent antimyeloma activity in vivo）.《癌細胞》.2013;23(4):502-15。

22. Buchan SL、Dou L、Remer M、Booth SG、Dunn SN、Lai C 等人，針對共刺激受體 4-1BB 之抗體經由 T 調節細胞耗竭及促進 CD8 T 細胞效應功能增強抗腫瘤免疫（Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor

Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function）.《免疫》.2018。

23. Fransen MF、van der Sluis TC、Ossendorp F、Arens R 及 Melief CJ。CTLA-4 阻斷抗體之受控局部遞送誘導 CD8+ T 細胞依賴性腫瘤根除且降低毒副作用的風險（Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8+ T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects）.《臨床癌症研究》. 2013;19(19):5381-9。

24. Bommareddy PK、Shetigar M 及 Kaufman HL.將溶瘤病毒整合至聯合癌症免疫療法組合中（Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy）.《自然綜述：免疫學（*Nat Rev Immunol*）》.2018;18(8):498-513。

25. Foloppe J、Kempf J、Futin N、Kintz J、Cordier P、Pichon C 等人，TG6002 之增強腫瘤特異性，其為一種在涉及核苷酸代謝之兩個基因中缺失的武裝溶瘤痘瘡病毒（The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in Nucleotide Metabolism）.《分子療法溶瘤學（*Mol Ther Oncolytics*）》.2019;14:1-14。

26. Kleinpeter P、Fend L、Thioudellet C、Geist M、Sfrontato N、Koerper V 等人，將針對程式化細胞死亡-1（PD-1）之抗體、Fab 及 scFv 在溶瘤痘瘡病毒中進行載體化，使其在瘤內遞送且改善腫瘤生長抑制（Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody, a Fab and a scFv against programmed cell death -1 (PD-1) allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition）.《腫瘤免疫學（*Oncoimmunology*）》.2016;5(10):e1220467。

27. Fend L、Yamazaki T、Remy C、Fahrner C、Gantzer M、Nourtier V 等人，

免疫檢查點阻斷、免疫原性化療或 IFN-α 阻斷可增強溶瘤病毒療法之局部及遠端效應（Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy）.《癌症研究（*Cancer Res*）》. 2017;77(15):4146-57。

28. Liu Z、Ravindranathan R、Kalinski P、Guo ZS 及 Bartlett DL.溶瘤痘瘡病毒及 PD-L1 阻斷之合理組合協同作用以增強治療功效（Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy）.《自然-通訊（*Nat Commun*）》.2017;8:14754。

29. Marchand JB、Semmrich M、Fend L、Tornberg UC、Silvestre N、Frendé us B 等人，免疫治療學會第 33 屆年會（*Society of Immunotherapy 33rd Annual meeting*）.馬里蘭州國家港灣：《癌症治療期刊（Journal of Cancer Therapy）》；2018。

30. Grosso JF 及 Jure-Kunkel MN.腫瘤模型中之 CTLA-4 阻斷：臨床前及轉化研究概述（CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research）.《癌症免疫療法（*Cancer Immun*）》.2013;13:5。

31. Andtbacka RH、Kaufman HL、Collichio F、Amatruda T、Senzer N、Chesney J 等人，Talimogene Laherparepvec 可提高晚期黑色素瘤患者之持久反應率（Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma）.《臨床腫瘤學雜誌（*J Clin Oncol*）》.2015;33(25):2780-8。

32. Chesney J、Puzanov I、Collichio F、Singh P、Milhem MM、Glaspy J 等人，評估 Talimogene Laherparepvec 與伊匹單抗相較於伊匹單抗單獨治療晚期不可切除黑色素瘤患者之功效及安全性的隨機、開放標籤 II 期研究（Randomized,

Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma）.《臨床腫瘤學雜誌》.2018;36(17):1658-67。

33. Ngwa W、Irabor OC、Schoenfeld JD、Hesser J、Demaria S 及 Formenti SC. 使用免疫療法增強遠端效應（Using immunotherapy to boost the abscopal effect）.《自然綜述：癌症（*Nat Rev Cancer*）》.2018;18(5):313-22。

34. DiLillo DJ 及 Ravetch JV.差異化 Fc 受體參與驅動抗腫瘤疫苗效應（Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect）.《細胞》.2015;161(5):1035-45。

35. Hildner K、Edelson BT、Purtha WE、Diamond M、Matsushita H、Kohyama M 等人，Batf3 缺乏揭示 CD8α+樹突狀細胞在細胞毒性 T 細胞免疫中的關鍵作用（Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity）.《科學》.2008;322(5904):1097-100。

36. Gubin MM、Zhang X、Schuster H、Caron E、Ward JP、Noguchi T 等人，檢查點阻斷癌症免疫療法靶向腫瘤特異性突變抗原（Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens）.《自然》.2014;515(7528):577-81。

37. Nakagawa H、Sido JM、Reyes EE、Kiers V、Cantor H 及 Kim HJ.Helios 缺乏型 Treg 之不穩定性與轉化為 T 效應表型及增強之抗腫瘤免疫有關（Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity）.《美國國家科學院院刊》

2016;113(22):6248-53。

38. Hui E、Cheung J、Zhu J、Su X、Taylor MJ、Wallweber HA 等人，T 細胞共刺激受體 CD28 係 PD-1 介導之抑制的主要目標（T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition）.《科學》.2017;355(6332):1428-33。

39. WeiSC、DuffyCR 及 AllisonJP。免疫檢查點阻斷療法之基本機制（Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy）.《癌症發現（*Cancer Discov*）》.2018;8(9):1069-86。

40. Simon S、Voillet V、Vignard V、Wu Z、Dabrowski C、Jouand N 等人，PD-1 及 TIGIT 共表現識別一個循環 CD8 T 細胞亞群，可預測對抗 PD-1 療法之反應（PD-1 and TIGIT coexpression identifies a circulating CD8 T cell subset predictive of response to anti-PD-1 therapy）.《癌症免疫治療雜誌（*J Immunother Cancer*）》.2020;8(2)。

41. Galletti G、De Simone G、Mazza EMC、Puccio S、Mezzanotte C、Bi TM 等人，在人類中具有不同命運承諾之幹細胞樣 CD8(+)記憶 T 細胞原細胞的兩個亞群（Two subsets of stem-like CD8(+) memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans.）.《自然-免疫學》.2020;21(12):1552-62。

42. Galon J 及 Bruni D.用組合免疫療法治療免疫熱、改變之及冷腫瘤的方法（Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies）.《自然綜述：藥物發現（*Nat Rev Drug Discov*）》.2019;18(3):197-218。

43. Gutierrez M、Long GV、Friedman CF、Richards DA、Corr B、Bastos BR

等人，抗 CTLA-4 抗體 BMS-986249 單獨或與納武單抗組合用於晚期癌症患者：初始 I 期結果（Anti-CTLA-4 probody BMS-986249 alone or in combination with nivolumab in patients with advanced cancers: Initial phase I results）.《臨床腫瘤學雜誌》.2020;38(15_增刊):3058-。

44. Aroldi F、Sacco J、Harrington K、Olsson-Brown A、Nanclares P、Menezes L 等人，421RP2 之 1 期試驗的初步結果，同類首創，增強效力，抗 CTLA-4 抗體表現，溶瘤 HSV 作為單藥且與納武單抗組合用於實體瘤患者（Initial results of a phase 1 trial of RP2, a first in class, enhanced potency, anti-CTLA-4 antibody expressing, oncolytic HSV as single agent and combined with nivolumab in patients with solid tumors）.《癌症免疫療法雜誌（*Journal for ImmunoTherapy of Cancer*）》.2020;8(增刊 3):A256-A7。

45. Garris CS、Arlauckas SP、Kohler RH、Trefny MP、Garren S、Piot C 等人，成功的抗 PD-1 癌症免疫療法需要涉及細胞介素 IFN-γ 及 IL-12 之 T 細胞-樹突狀細胞串擾（Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN-gamma and IL-12）.《免疫》.2018;49(6):1148-61 e7。

46. Salmon H、Idoyaga J、Rahman A、Leboeuf M、Remark R、Jordan S 等人，腫瘤部位 CD103(+)樹突狀細胞原細胞之擴增及活化增強腫瘤對治療性 PD-L1 及 BRAF 抑制的反應(Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition）.《免疫》.2016;44(4):924-38。

47. Mao T、Song E 及 Iwasaki A. PD-1 阻斷驅動之抗腫瘤 CD8+ T 細胞免疫

需要 XCR1+樹突狀細胞（PD-1 blockade-driven anti-tumor CD8+ T cell immunity requires XCR1+ dendritic cells）.*bioRXIV*.2021。

48. Solomon I、Amann M、Goubier A、Vargas FA、Zervas D、Qing C 等人，保留效應 T 細胞上 IL-2 信號傳導之 CD25-Treg 耗竭抗體可增強效應活化及抗腫瘤免疫（CD25-Treg-depleting antibodies preserving IL-2 signaling on effector T cells enhance effector activation and antitumor immunity）.《自然-癌症（*Nat Cancer*）》.2020;1(12):1153-66。

49. Wei SC、Anang NAS、Sharma R、Andrews MC、Reuben A、Levine JH 等人，組合抗 CTLA-4 加抗 PD-1 檢查點阻斷利用部分不同於單一療法之細胞機制（Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies）.《美國國家科學院院刊》2019;116(45):22699-709。

50. Ribas A、Camacho LH、Lopez-Berestein G、Pavlov D、Bulanhagui CA、Millham R 等人，抗細胞毒性 T 淋巴細胞相關抗原 4 單株抗體 CP-675,206 在 I 期試驗中之黑色素瘤抗腫瘤活性及抗自體反應（Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206）.《臨床腫瘤學雜誌》.2005;23(35):8968-77。

51. Zappasodi R、Serganova I、Cohen IJ、Maeda M、Shindo M、Senbabaoglu Y 等人，CTLA-4 阻斷驅使糖酵解較低之腫瘤中 Treg 穩定性的損失（CTLA-4 blockade drives loss of Treg stability in glycolysis-low tumours）.《自然》.2021;591(7851):652-8。

52. Kim JM\Rasmussen JP 及 Rudensky AY.調節性 T 細胞可在小鼠整個生命週期中預防災難性的自體免疫（Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice）.《自然-免疫學》.2007;8(2):191-7。

53. Chambers CA、Krummel MF、Boitel B、Hurwitz A、Sullivan TJ、Fournier S 等人，CTLA-4 在調節及啟動 T 細胞反應中之作用（The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses）.《免疫學評論（*Immunol Rev*）》. 1996;153:27-46。

54. Binyamin L、Alpaugh RK、Hughes TL、Lutz CT、Campbell KS 及 Weiner LM.在抗淋巴瘤療法模型中，阻斷 NK 細胞抑制性自體識別可促進抗體依賴性細胞毒性（Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy）.《免疫學雜誌（*J Immunol*）》.2008;180(9):6392-401。

55. Chen T、Hoffmann K、Ostman S、Sandberg AS 及 Olsson O.藉由噬菌體呈現鑑別麥膠蛋白結合肽(Identification of gliadin-binding peptides by phage display). 《BMC 生物技術學刊（*BMC Biotechnol*）》. 2011;11:16。

56. Huang AY、Gulden PH、Woods AS、Thomas MC、Tong CD、Wang W 等人，鼠類結腸腫瘤之免疫顯性主要組織相容性複合物 I 類限制性抗原來源於內源性反轉錄病毒基因產物（The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product）.《美國國家科學院院刊》1996;93(18):9730-5。

57. Russell TA 及 Tscharke DC.痘瘡病毒病毒株 MVA 在 BALB/c 小鼠中之 CD8+ T 細胞免疫原性驚人地差（Strikingly poor CD8+ T-cell immunogenicity of

vaccinia virus strain MVA in BALB/c mice）.《免疫學與細胞生物學（*Immunol Cell Biol*）》. 2014;92(5):466-9。

58. Dobin A、Davis CA、Schlesinger F、Drenkow J、Zaleski C、Jha S 等人，STAR：超快通用 RNA-seq 對準器（STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner）.《生物資訊學（*Bioinformatics*）》.2013;29(1):15-21。

59. Smith T、Heger A 及 Sudbery I. UMI 工具：對唯一分子標識符之定序錯誤進行建模以提高量化準確性（UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy）.《基因體研究（*Genome Res*）》. 2017;27(3):491-9。

60. Anders S、Pyl PT 及 Huber W. HTSeq——一個用於處理高通量定序資料之 Python 框架（HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data）.《生物資訊學》.2015;31(2):166-9。

61. Love MI、Huber W 及 Anders S.使用 DESeq2 對 RNA-seq 資料之倍數變化及分散進行適度估計（Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2）.《基因體生物學（*Genome Biol*）》. 2014;15(12):550。

62. Yu G、Wang LG、Han Y 及 He QY. clusterProfiler：一個 R 封裝，用於比較基因簇之間的生物學主題（clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters）.《組學（*OMICS*）》.2012;16(5):284-7。

63. Chan, W. M.及 G. McFadden (2014).「溶瘤痘病毒(Oncolytic Poxviruses)」.《**病毒學年度評論（Annu Rev Virol）**》1(1): 119-141。

64. Marino, N.等人，(2017).「開發用於治療性轉殖基因局部腫瘤內表現之多功能溶瘤病毒平台（Development of a versatile oncolytic virus platform for local

intra-tumoural expression of therapeutic transgenes）」.《公共科學圖書館·綜合》**12**(5): e0177810。

65. McDermott, D. F.等人(2018).「對阿特珠單抗單獨或與貝伐單抗組合相較於舒尼替尼治療腎細胞癌反應的臨床活性及分子相關性（Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma）」.《自然-醫學（**Nat Med**）》**24**(6): 749-757。

66. Mosely, S. I.等人(2017).「用於免疫治療藥物發現之同基因型臨床前腫瘤模型的合理選擇（Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery）」.《癌症免疫學研究（**Cancer Immunol Res**）》**5**(1): 29-41。

67. Tumeh, P. C.等人(2014).「PD-1 阻斷藉由抑制適應性免疫抗性來誘導反應（PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance）」.《自然》**515**(7528): 568-571。

68. Bruni, D.等人(2020).「癌症預後及治療功效中之免疫背景及免疫評分（The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy）」.《自然綜述：癌症》**20**: 662-680。

69. Galon, J.等人(2006).「人類結腸直腸腫瘤內免疫細胞之類型、密度及位置可預測臨床結果（Type, density and location of immune cells within human colorectal tumours predict clinical outcome）」.《科學》**.313**: 1960-1964。

70. Fridman, W. H.等人(2012).「人類腫瘤之免疫環境：對臨床結果的影響（The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome）」.《自然

綜述：癌症》**12:** 298-306。

71. Fridman, W. H.等人(2017).「癌症預後及治療中之免疫背景（The immune contexture in cancer prognosis and treatment）」.《自然綜述：臨床腫瘤學（Nature Rev Clin Oncol）》**.14:** 717-334。

72. Hu, Z.等人(2018).「腫瘤浸潤性 CD45RO+記憶細胞與肺腺癌患者之良好預後相關（Tumor-infiltrating CD45RO+ memory cells correlate with favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma）」.《**胸部疾病雜誌（J. Thorac. Dis.）》10:** 2089-2099。

73. Lanzi A.等人(2020).「共識免疫評分：邁向大腸直腸癌的新分類（The consensus immunoscore: toward a new classification of colorectal cancer）」《**腫瘤免疫學》，9**:1-3。

74. Angell, H. K.等人(2020).「免疫評分：結腸癌及其他（The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond）」.《**臨床癌症研究》26:** 332-339。

【符號說明】無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="99686-序列表-vc-
20230106.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0"
productionDate="2023-01-07">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>111135598</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-09-20</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>BIOBX/P80242TW</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>EP</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>21306310.0</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2021-09-22</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">生物創新國際公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>BioInvent International AB</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">新穎抗體組合及其用途</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>63</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q150">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 2 is S or K</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置2中之X為S或K</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q152">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 3 is D, S or A</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為D、S或
A</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q153">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 5 is Y, S or A</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置5中之X為Y、S或
A</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q154">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q222">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 7 is S or N</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置7中之X為S或N</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q223">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 9 is V or I</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置9中之X為V或I</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>FXXYXMXWXRQAPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q224">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 3 is D or S</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為D或S</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q225">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 5 is Y, S or A</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置5中之X為Y、S或
A</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q226">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q227">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 7 is S or N</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置7中之X為S或N</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>FSXYXMXWVRQAPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q228">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 3 is D or S</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為D或S</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q229">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 5 is Y or S</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置5中之X為Y或S</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q230">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 7 is S or N</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置7中之X為S或N</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q231">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>FSXYXMXWVRQAPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q232">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 2 is G or A</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>位置2中之X為G或A</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q233">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 5 is W, G or N</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置5中之X為W、G或
N</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q234">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 6 is S or T</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置6中之X為S或T</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q235">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 7 is S or G</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置7中之X為S或G</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q236">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 8 is R or G</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置8中之X為R或G</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q237">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 10 is K, T or I</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置10中之X為K、T或
I</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q238">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 11 is G, Y, H or
D</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置11中之X為G、Y、H或
D</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q239">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 12 is Y or F</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置12中之X為Y或F</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q240">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q241">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 9 is D, S or Y</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置9中之X為D、S或
Y</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SXISXXXXXXXXADSVKGR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="5">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q242">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 2 is G or A</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置2中之X為G或A</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q243">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 5 is W, G or N</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置5中之X為W、G或
N</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q244">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 6 is S or T</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置6中之X為S或T</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q245">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 7 is S or G</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置7中之X為S或G</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q246">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 8 is R or G</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置8中之X為R或G</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q247">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 10 is K, T or I</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置10中之X為K、T或
I</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q248">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q249">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 9 is D, S or Y</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置9中之X為D、S或
Y</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q250">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 11 is G, Y, H or
D</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置11中之X為G、Y、H或
D</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SXISXXXXXXXYADSVKGR</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="6">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q251">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 2 is G or A</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置2中之X為G或A</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q252">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 5 is W or G</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置5中之X為W或G</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q253">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 7 is S or G</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置7中之X為S或G</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q254">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 8 is R or G</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置8中之X為R或G</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q255">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 10 is K or T</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置10中之X為K或T</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q256">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 11 is G or Y, H or
D</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置11中之X為G或Y、H或
D</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q257">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q258">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 9 is D or S</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置9中之X為D或S</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SXISXSXXXXXYADSVKGR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
```

```
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q259">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 2 is T or S</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置2中之X為T或S</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q260">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 10 is A or S</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置10中之X為A或S</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q261">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>X in position 11 is G or N</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>位置11中之X為G或N</NonEnglishQualifier_value>
```

```
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q262">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>X in position 13 is D or V</INSDQualifier_value>
   <NonEnglishQualifier_value>位置13中之X為D或V</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>14</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q263">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>X in position 14 is V or Y</INSDQualifier_value>
   <NonEnglishQualifier_value>位置14中之X為V或Y</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier>
   <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q264">
   <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
   <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q265">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 15 i s H or none</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置15中之X為H或無</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>CXGSSSNIGXXYXXX</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q266">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>CTGSSSNIGAGYDVH</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q267">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 1 is G, R, or D</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置1中之X為G、R或
D</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q268">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 3 is D, N, or S</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為D、N或
S</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q269">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q270">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 4 is N, Q or K</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置4中之X為N、Q或
K</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>XNXXRPS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q271">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 1 is G or R</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置1中之X為G或R</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q272">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>X in position 3 is D or N</INSDQualifier_value>
   <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為D或N</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier>
   <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q273">
   <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
   <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q274">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>X in position 4 is N or Q</INSDQualifier_value>
   <NonEnglishQualifier_value>位置4中之X為N或Q</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>XNXXRPS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="13">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q275">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 2 is A or Q</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置2中之X為A或Q</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q276">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 3 is V, A or S</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為V、A或
S</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q277">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>X in position 4 is W or Y</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置4中之X為W或Y</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q278">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 9 is N or S</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置9中之X為N或S</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q279">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 11 is V, W or P</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置11中之X為V、W或
P</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q280">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 13 is V or none</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置13中之X為V或無</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q281">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q282">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X in position 6 is D or S</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>位置6中之X為D或S</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>CXXXDXSLXGXVX</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q283">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 3 is V or A</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置3中之X為V或A</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q284">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X in position 11 is V or W</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>位置11中之X為V或W</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q285">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>CAXWDDSLNGXV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="15">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q286">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FSDYYMSWVRQAPG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q287">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SGISWSSRDKGYADSVKGR</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q288">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TTDLARY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q289">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GNDNRPS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q290">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>CAVWDDSLNGVV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>114</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..114</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q291">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSSRDKGYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTDLARYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q292">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNDNRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGVVFGGGTKLTVLG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q293">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>FSSYSMNWVRQAPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="23">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q294">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SAISGSGGSTYYADSVKGR</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="24">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
    <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q295">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARDRVEMNQWLAD</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q296">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>RNNQRPS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q297">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>CAAWDDSLNGWV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q298">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRVEMNQWLADWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q299">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLG</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q300">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FSSYAMSWVRQAPG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q301">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SGISGSGGYIHYADSVKGR</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q302">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ATYSSGLHDAFDI</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q303">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DNNKRPS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q304">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGYIHYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYSSGLHDAFDIWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q305">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q306">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FKAYSMSWIRQAPG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q307">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SGISNTGGSTDFADSVKGR</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q308">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARLGYSGYDDRGMDV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q309">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>CSGSSSNIGSNYVY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q310">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GNSNRPS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="40">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q311">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>CQSYDSSLSGPVV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="41">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q312">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYSMSWIRQAPGKGLEWVSGISNTGGSTDFAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARLGYSGYDDRGMDVWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="42">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q313">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDR
FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGPVVFGGGTKLTVLG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="43">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q314">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="44">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>105</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..105</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q315">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="45">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1335</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..1335</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q316">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcaccttcagtgactactacatgagctgggtccgccaggctcccgggaaggggctggagtggg
tctcaggcattagttggagtagtcgtgacaaaggctatgcggactctgtgaagggccgtttcaccatctccagagacaat
tccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacactgccgtgtattactgtaccacagatctcgc
taggtactggggccagggtacactggtcaccgtgagctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccct
cctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcag
cgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg
tggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggga
ccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggt
ggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
gagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg
ctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctc
atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga</INSDS
eq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>654</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..654</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q317">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctc
ctgcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtatcagcagctcccaggaacggcccccaaac
tcctcatctatggtaatgataaccggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctcc
ctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattactgtgcagtatgggatgacagcctgaatggtgtggt
attcggcggaggaaccaagctgacggtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctg
aggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaag
gcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcag
ctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtgg
agaagacagtggcccctacagaatgttcatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="47">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1353</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1353</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q318">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggg
tctcagctattagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaat
tccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacactgccgtgtattactgtgcgagagatcgggt
agagatgaaccagtggctggccgactggggccagggtacactggtcaccgtgagctcagcctccaccaagggcccatcgg
tcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc
gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagg
actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca
cctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctga
ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaaatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="48">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>654</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..654</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q319">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctc
ctgcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtatcagcagctcccaggaacggcccccaaac
tcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctcc
ctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttgggt
gttcggcggaggaaccaagctgacggtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctg
aggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaag
gcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcag
ctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtgg
agaagacagtggcccctacagaatgttcatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="49">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1353</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1353</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q320">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggg
tctcaggtattagtggcagcggtgggtacatacactatgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaat
```

tccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacactgccgtgtattactgtgcgacctatagcag
tggcctgcatgatgcttttgatatctggggccagggtacactggtcaccgtgagctcagcctccaccaagggcccatcgg
tcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc
gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagg
actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca
cctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctga
ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaaatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="50">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>654</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..654</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q321">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctc
ctgcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtatcagcagctcccaggaacggcccccaaac
tcctcatctatgacaataataagcgaccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctcc
ctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttgggt
gttcggcggaggaaccaagctgacggtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctg
aggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaag
gcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcag
ctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtgg
agaagacagtggcccctacagaatgttcatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1359</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1359</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q322">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcaccttcaaagcctatagcatgagctggatccgccaggctccagggaaggggctggagtggg
tctcaggtatcagtaacacgggaggtagcacagacttcgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaat
tccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacactgccatgtattactgtgcgagattgggata
tagtggctacgacgaccgtggtatggacgtctggggccaaggtacactggtcaccgtgagctcagcctccaccaagggcc
catcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactac
ttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtc

ctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtga
atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgc
ccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg
aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg
caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccat
ctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagg
tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcag
gtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccc
tgtctccgggtaaatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="52">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>654</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..654</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q323">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctc
ttgttctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtgtactggtatcagcagctcccaggaacggcccccaaactcc
tcatctatggtaacagcaatcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctg
gccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattactgccagtcctatgacagcagcctgagtggtcctgtggt
attcggcggaggaaccaagctgacggtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctg

aggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaag
gcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcag
ctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtgg
agaagacagtggcccctacagaatgttcatga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="53">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>236</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..236</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q324">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGWSCIILFLVATATGVHSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPG
TAPKLLIYGNDNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE
GSTVEKTVAPTECS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>463</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..463</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q325">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGK
GLEWVSGISWSSRDKGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTDLARYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="55">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>127</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..127</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q326">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELY
KQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="56">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>144</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..144</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q327">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISE
MFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPV
QE</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="57">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>124</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..124</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q328">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>小家鼠</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQG
LRGNFTKLKGALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="58">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>141</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q329">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>小家鼠</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MWLQNLLFLGIVVYSLSAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFS
FKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQK<
/INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="59">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>124</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..124</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q330">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>ccacccacttttatagtaagttttcacccataaataataaatacaataattaatttctcg
taaaagtagaaaatatattctaatttattgcacggtaaggaagtagaatcataaagaacagt</INSDSeq_sequence
>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="60">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>114</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..114</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q331">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tttattctatacttaaaaaatgaaaataaatacaaaggttcttgagggttgtgttaaattga
aagcgagaaataatcataaattatttcattatcgcgatatccgttaagtttg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="61">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>40</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```
    <INSDFeature_location>1..40</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q332">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaaaattgaaattttatttttttttttggaatataaata</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="62">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>236</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..236</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q333">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>小家鼠</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>MGWSCIILFLVATATGVHSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPG
TAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLF
PPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHE
GHTVEKSLSRADCS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="63">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>469</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..469</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q334">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>小家鼠</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK
GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRVEMNQWLADWGQGTLVTVSSAKT
TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCN
VAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN
NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK
KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS
FSRTPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種組合，其包含：

- 能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及

- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；

該組合用於治療患者之癌症，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【請求項2】 一種以下各者之用途：

- 能夠表現編碼特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子的核苷酸序列的溶瘤病毒；及

- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子；

其係用於製造用於治療患者之癌症的藥劑，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【請求項3】 一種用於治療患者之癌症的方法，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成，該方法包含向該患者投予：

- 能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒；及

- 特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子。

【請求項4】 一種能夠表現特異性結合於 CTLA-4 之第一抗體分子之溶瘤病毒，

其與特異性結合於 PD-1 及/或 PD-L1 之第二抗體分子組合使用；

用於治療患者之癌症，其中該癌症包含冷腫瘤或由其組成。

【請求項5】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該冷腫瘤藉由該第一及第二抗體分子治療。

【請求項6】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，

其中該特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子為 Fcγ 受體接合抗體。

【請求項7】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子為 Treg 耗竭抗體。

【請求項8】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒為溶瘤痘病毒。

【請求項9】 如請求項 8 所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該痘病毒屬於脊椎動物痘病毒亞科（Chordopoxvirinae subfamily），更佳屬於正痘病毒屬（Orthopoxvirus genus），較佳選自由痘瘡病毒（vaccinia virus）、牛痘病毒（cowpox virus）、金絲雀痘病毒（canarypox virus）、鼠痘病毒（ectromelia virus）及黏液瘤病毒（myxoma virus）組成之群組。

【請求項10】 如請求項 9 所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒為胸苷激酶（TK）及/或核糖核苷酸還原酶（RR）活性均有缺陷的痘瘡病毒，且包含編碼 SEQ ID NO: 20 及 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 53 及 SEQ ID NO: 54 之核苷酸序列。

【請求項11】 如請求項 9 或 10 所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該痘瘡病毒進一步包含編碼 GM-CSF，特別較佳為人類 GM-CSF（例如具有 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56）或鼠類 GM-CSF（例如具有 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58）之核苷酸序列。

【請求項12】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該病毒包含插入在病毒 J2R 基因座處之編碼該第一抗體分子之重鏈的核苷酸序列，及/或包含插入在病毒 I4L 基因座處之編碼該第一抗體分子之輕鏈的核苷酸序列。

【請求項13】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子選自由包含 1 至 6 個 CDR 的抗體分子組成之群組，該 1 至 6 個 CDR 選自由 SEQ ID NO: 3、6、8、10、12 及 14 組成之群組。

【請求項14】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子選自由以下組成之群組：包含 1 至 6 個 CDR VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1 及 VL-CDR3 之抗體分子，

- 其中 VH-CDR1 在存在時選自由 SEQ ID NO: 15、22、29 及 35 組成之群組；
- 其中 VH-CDR2 在存在時選自由 SEQ ID NO: 16、23、30 及 36 組成之群組；
- 其中 VH-CDR3 在存在時選自由 SEQ ID NO: 17、24、31 及 37 組成之群組；
- 其中 VL-CDR1 在存在時選自由 SEQ ID NO: 10 及 38 組成之群組；
- 其中 VL-CDR2 在存在時選自由 SEQ ID NO: 18、25、32 及 39 組成之群組；
- 其中 VL-CDR3 在存在時選自由 SEQ ID NO: 19、26 及 40 組成之群組。

【請求項15】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子包含六個具有 SEQ ID. NO: 15、16、17、10、18 及 19 之 CDR，或六個具有 SEQ ID NO: 22、23、24、10、25 及 26 之 CDR。

【請求項16】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子包含選自由 SEQ ID. NO: 20 及 27 組成之群組的可變重鏈及/或選自由 SEQ ID NO: 21 及 28 組成之群組的可變輕鏈。

【請求項17】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子包含重鏈恆定區 SEQ ID NO: 43 及/或輕鏈恆定區 SEQ ID NO: 44。

【請求項18】 如請求項 1 至 12 中任一項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子選自由伊匹單抗（ipilimumab）及曲美單抗（tremelimumab）組成之群組。

【請求項19】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子為能夠與如請求項 13 至 18 中任一項所定義之抗體分子競爭結合於 CTLA-4 的抗體分子。

【請求項20】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子選自由以下組成之群組：全尺寸抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、Fab、Fv、scFv、Fab'及$(Fab')_2$。

【請求項21】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第一抗體分子選自由以下組成之群組：人類 IgG 抗體、人類化 IgG 抗體及人類來源之 IgG 抗體。

【請求項22】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該病毒包含編碼如請求項 13 至 21 中任一項所定義之第一抗體分子的核苷酸序列。

【請求項23】 如請求項 22 所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該核苷酸序列包含選自由 SEQ ID NO: 45 至 52 組成之群組的序列或由其組成。

【請求項24】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第二抗體分子選自由以下組成之群組：人類抗體分子、人類化抗體分子及

人類來源之抗體分子。

【請求項25】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第二抗體分子為單株抗體分子或單株來源之抗體分子。

【請求項26】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第二抗體分子選自由以下組成之群組：全尺寸抗體、嵌合抗體、單鏈抗體及其抗原結合片段。

【請求項27】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第二抗體分子係人類 IgG 抗體、人類化 IgG 抗體分子或人類來源之 IgG 抗體分子。

【請求項28】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該第二抗體分子特異性結合於 PD1，且選自由以下組成之群組：帕博利珠單抗（pembrolizumab）；納武單抗（nivolumab）；西米普利單抗（cemiplimab）；卡瑞利珠單抗（camrelizumab）；斯巴達珠單抗（spartalizumab）；多斯利單抗（dostarlimab）；緹勒珠單抗（tislelizumab）；JTX-4014；斯迪利單抗（sintilimab）（IBI308）；特瑞普利單抗（toripalimab）（JS 001）；AMP-224；及 AMP-514（MEDI0680）。

【請求項29】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或第一抗體分子，其中該第二抗體分子特異性結合於 PD-L1，且選自由以下組成之群組：阿特珠單抗（atezolizumab）；德瓦魯單抗（durvalumab）；阿維魯單抗（avelumab）；CS1001；KN035（恩沃利單抗（envafolimab））；及 CK-301。

【請求項30】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該冷腫瘤為免疫荒漠型腫瘤；及/或免疫排除型腫瘤；及/或免疫浸潤較差之

腫瘤。

【請求項31】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該冷腫瘤選自由以下組成之群組：黑色素瘤；胰臟癌；前列腺癌；大腸直腸癌；肝細胞癌；肺癌；膀胱癌；腎癌；胃癌；子宮頸癌；默克爾細胞癌（Merkel cell carcinoma）；卵巢癌；頭頸癌；間皮瘤；及乳癌。

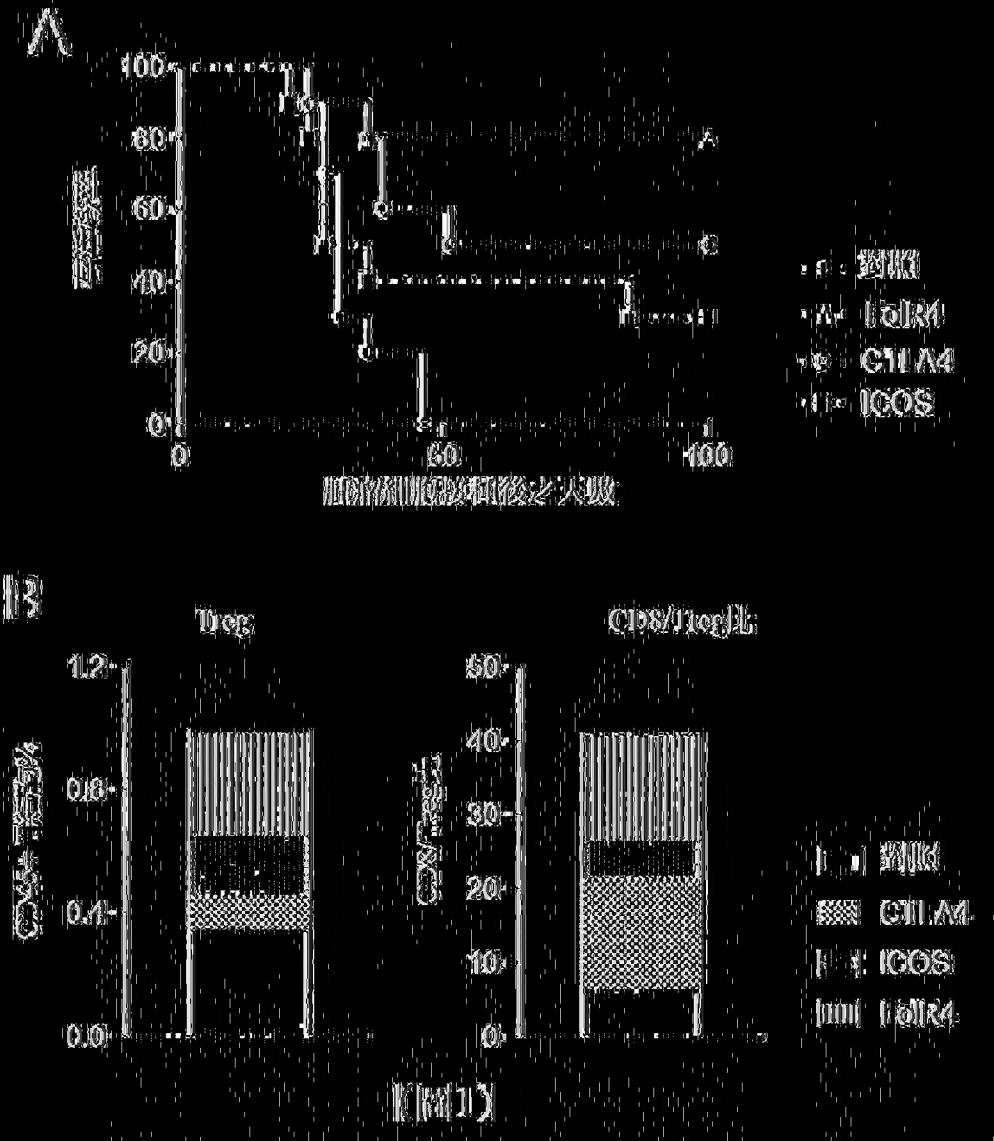
【請求項32】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該癌症係：對用特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子的治療具有抗性；或對用特異性結合於 PD1 之抗體分子的治療具有抗性；或對用特異性結合於 PD-L1 之抗體分子的治療具有抗性。

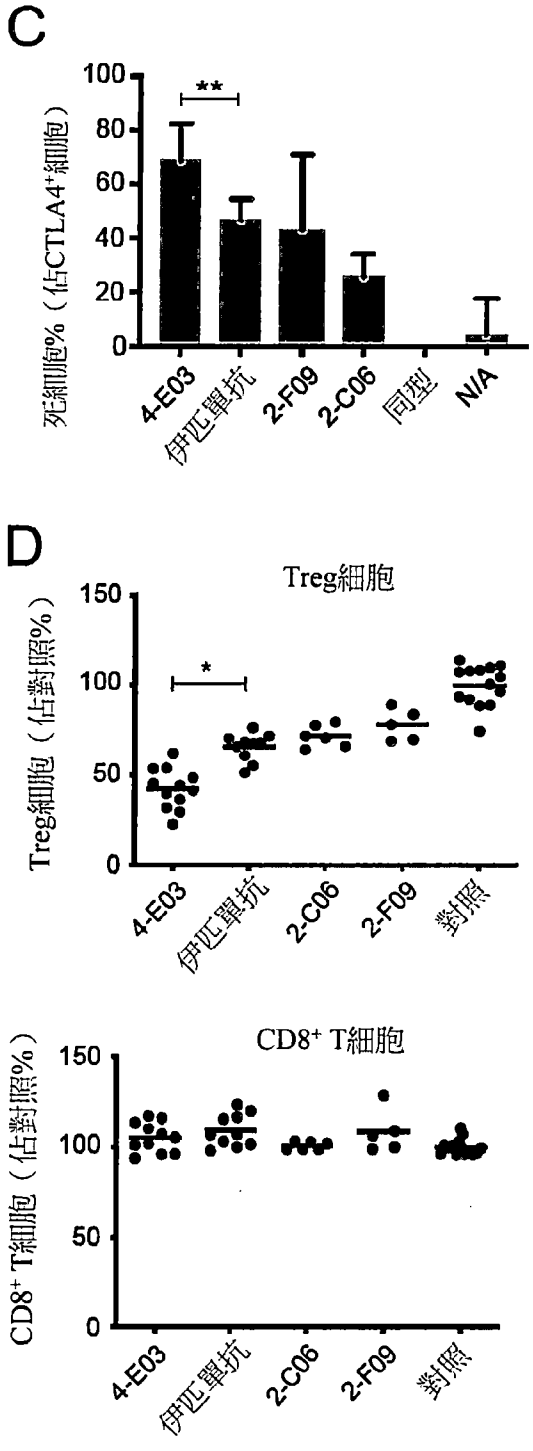
【請求項33】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該癌症係：對用特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子及特異性結合於 PD1 之抗體分子的治療具有抗性；或對用特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子及特異性結合於 PD-L1 之抗體分子的治療具有抗性；或對用特異性結合於 PD-1 之抗體分子及特異性結合於 PD-L1 之抗體分子的治療具有抗性；或對用特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子及特異性結合於 PD1 之抗體分子及特異性結合於 PD-L1 之抗體分子的治療具有抗性。

【請求項34】 如任一前述請求項所述之組合、或用途、或方法或溶瘤病毒，其中該患者先前已用特異性結合於 CTLA-4 之抗體分子、及/或特異性結合於 PD-1 之抗體分子及/或特異性結合於 PD-L1 之抗體分子治療，且其中已發現該患者對該治療具有抗性，或在該治療之後或期間變得對該治療具有抗性。

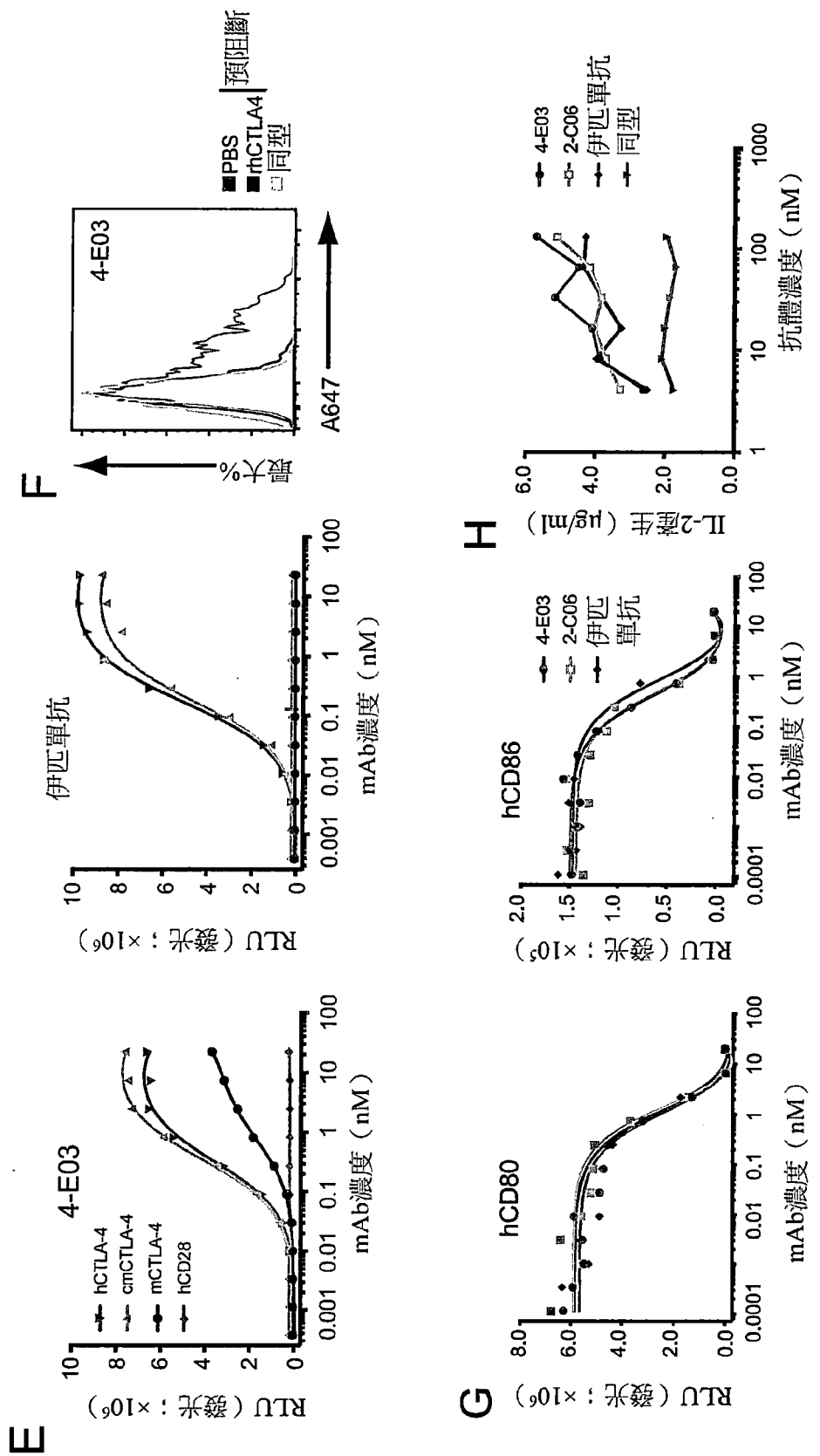
【請求項35】 基本上如本文中參考隨附編號段落、申請專利範圍、描述、實例及圖式所主張的組合、或用途、或方法或溶瘤病毒。

【図面】


A
100
80
60
40
20
0
0
60
100
対照
抗IL-6R抗体
抗CTLA-4抗体
抗ICOS抗体
B
Treg
CD8/Treg比
1.2
0.8
0.4
0.0
50
40
30
20
10
0
対照
抗CTLA-4抗体
抗ICOS抗体
抗IL-6R抗体

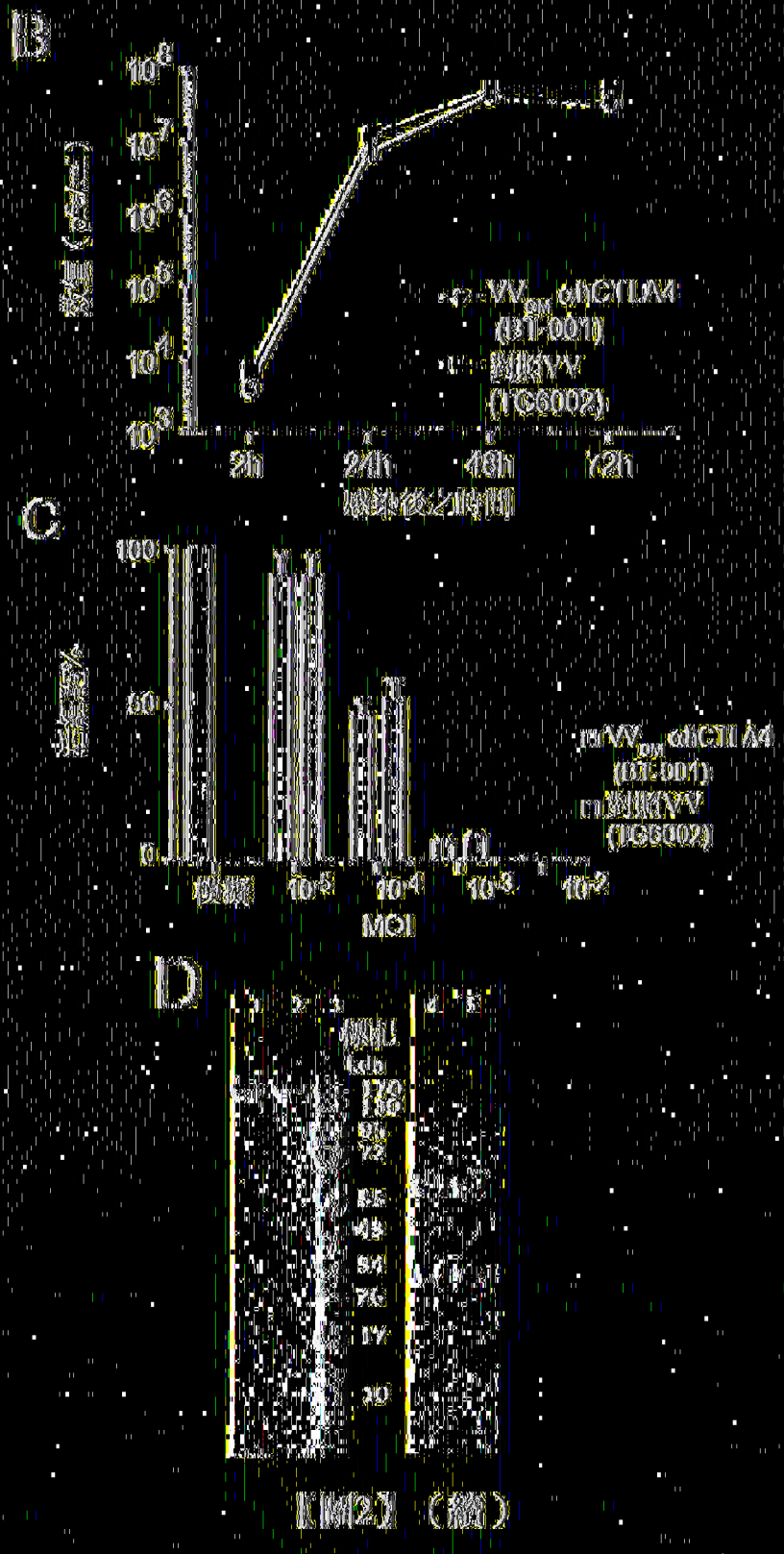

C
死細胞%（佔CTLA4+細胞）
100
80
60
40
20
0
**
4-E03
伊匹單抗
2-F09
2-C06
同型
N/A
D
Treg細胞
Treg細胞（佔對照%）
150
100
50
0
*
4-E03
伊匹單抗
2-C06
2-F09
對照
CD8+ T細胞
CD8+ T細胞（佔對照%）
150
100
50
0
4-E03
伊匹單抗
2-C06
2-F09
對照

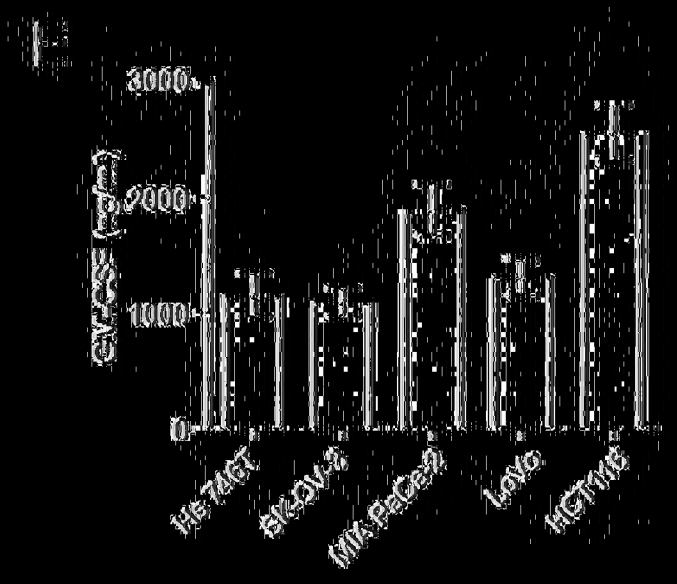
【圖1】（續）

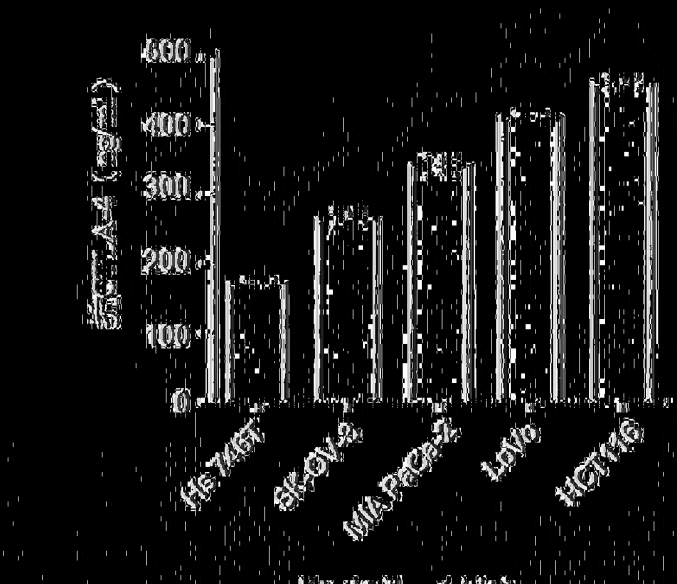

E
4-E03
hCTLA-4
cmCTLA-4
mCTLA-4
hCD28
RLU（發光；×10⁶）
mAb濃度（nM）
伊匹單抗
F
4-E03
細胞%
A647
PBS
mCTLA4
同型
預阻斷
G
hCD80
hCD86
4-E03
2-C06
伊匹單抗
RLU（發光；×10⁵）
mAb濃度（nM）
H
IL-2產生（μg/ml）
抗體濃度（nM）
同型

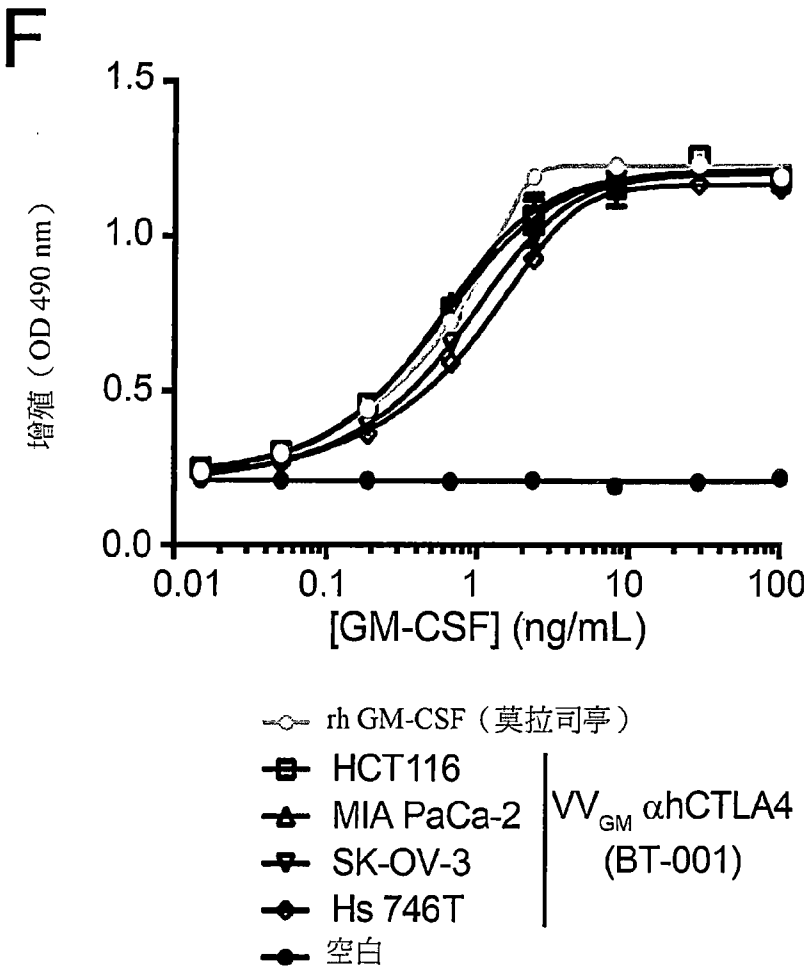
【圖1】（續）

202321458

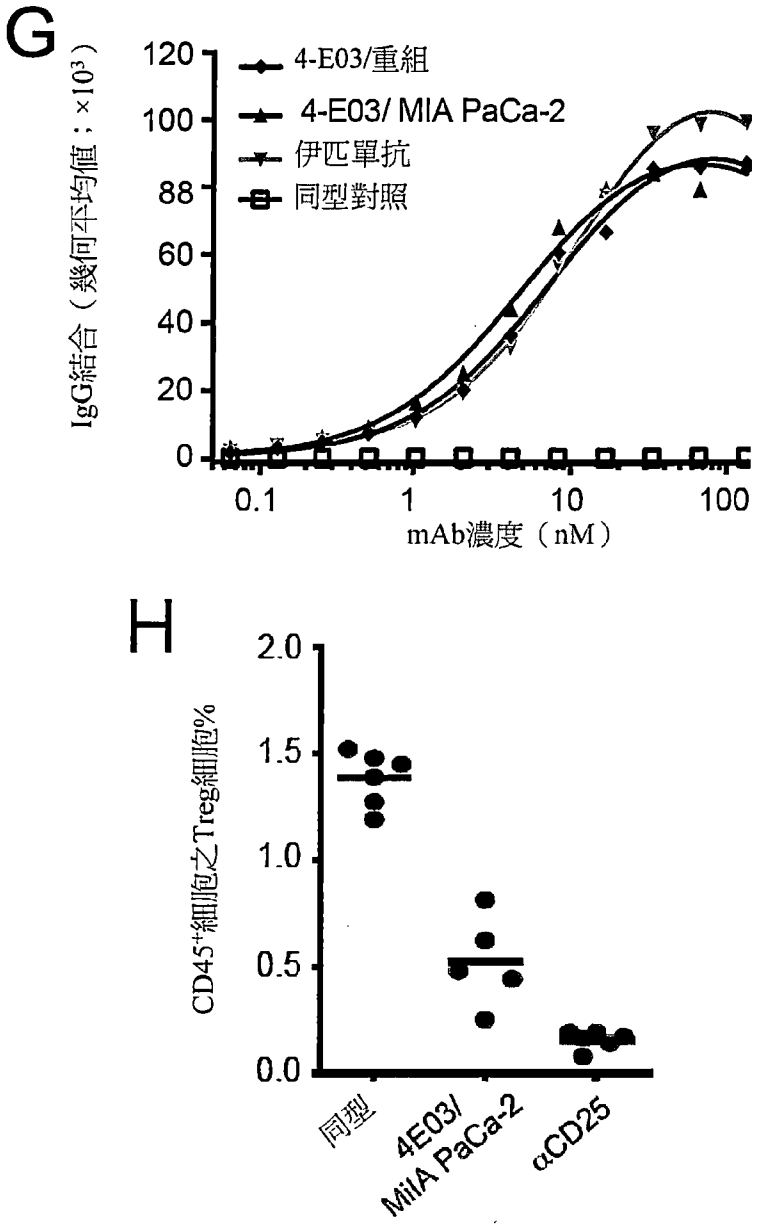

B
C
D
MOI
2h
24h
48h
72h


3000
2000
1000
0
HS 766T
SK-OV-3
MIA PaCa-2
LoVo
HCT116

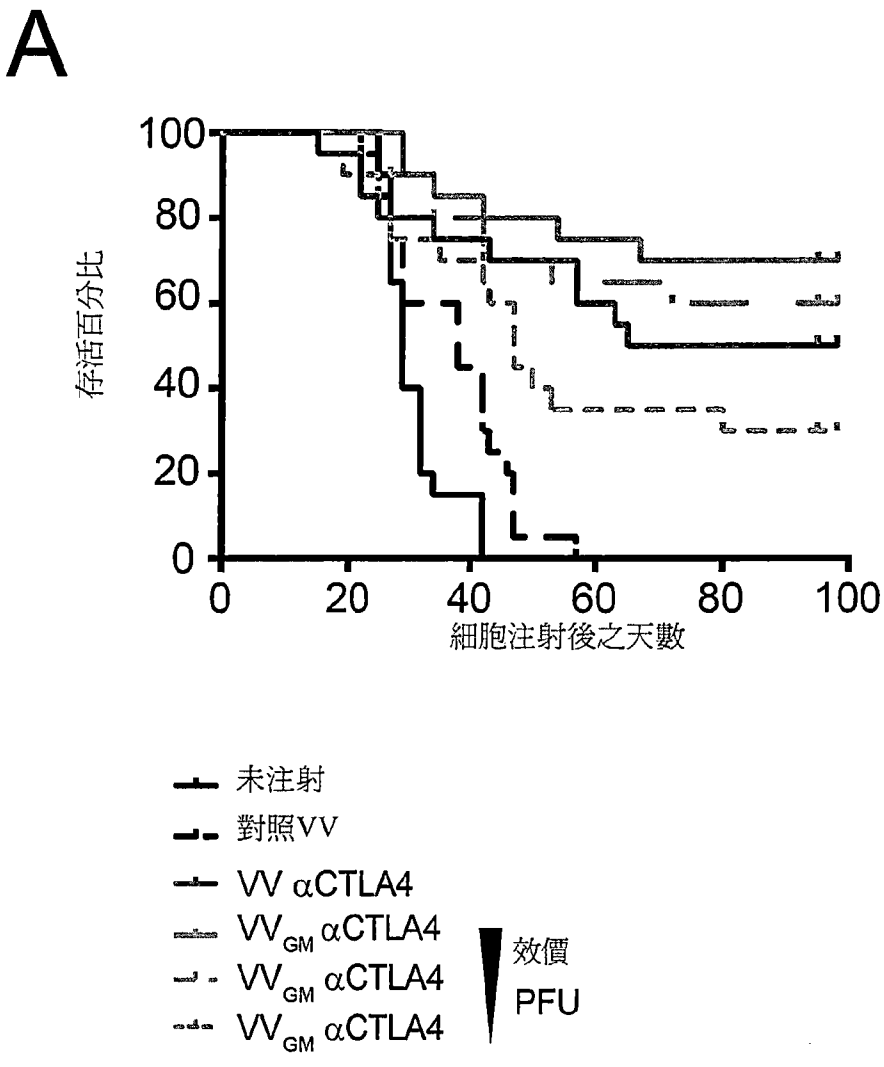

600
400
300
200
100
0
HS 766T
SK-OV-3
MIA PaCa-2
LoVo
HCT116


F
1.5
1.0
0.5
0.0
增殖（OD 490 nm）
0.01
0.1
1
10
100
[GM-CSF] (ng/mL)
rh GM-CSF（莫拉司亭）
HCT116
MIA PaCa-2
SK-OV-3
Hs 746T
空白
VV GM αhCTLA4
(BT-001)

【圖2】（續）


G
IgG結合（幾何平均值；×10³）
120
100
88
60
40
20
0
4-E03/重組
4-E03/ MIA PaCa-2
伊匹單抗
同型對照
0.1
1
10
100
mAb濃度（nM）
H
CD45⁺細胞之Treg細胞%
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
同型
4E03/
MiIA PaCa-2
αCD25

【圖2】（續）


A
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
20
40
60
80
100
細胞注射後之天數
未注射
對照VV
VV αCTLA4
VV$_{GM}$ αCTLA4
VV$_{GM}$ αCTLA4
VV$_{GM}$ αCTLA4
效價
PFU

【圖3】

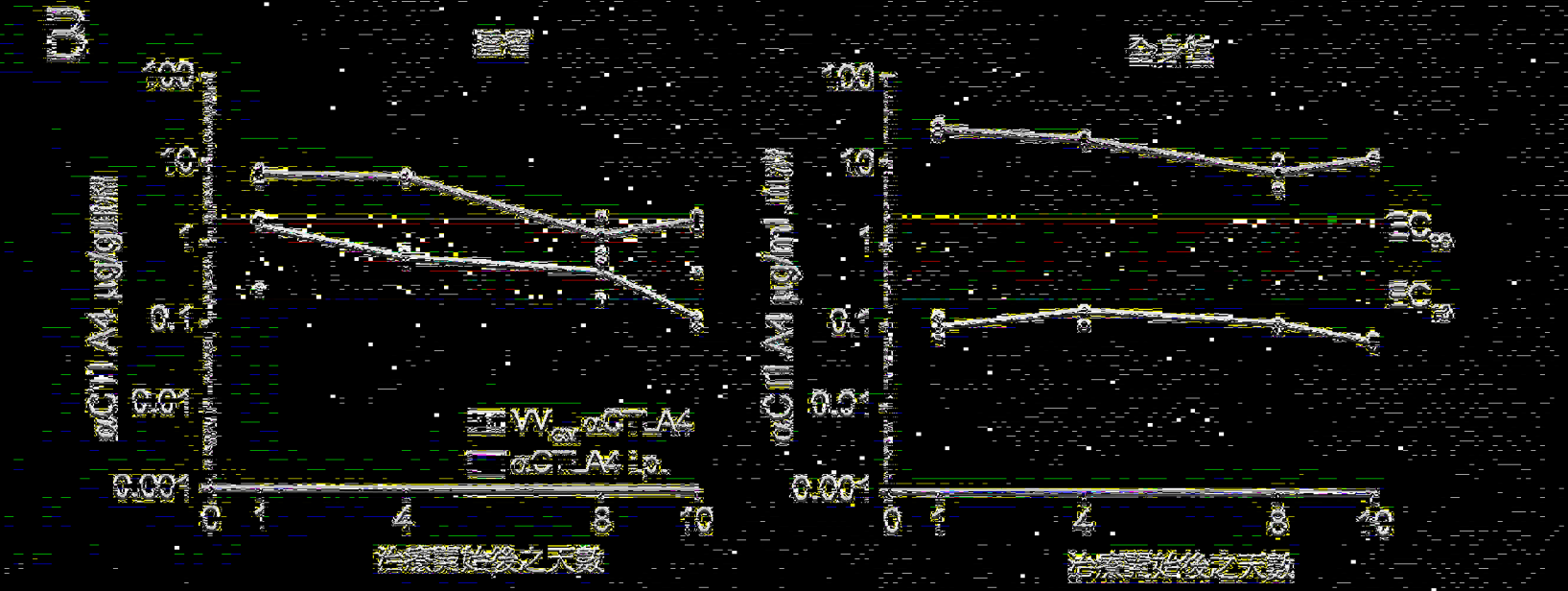
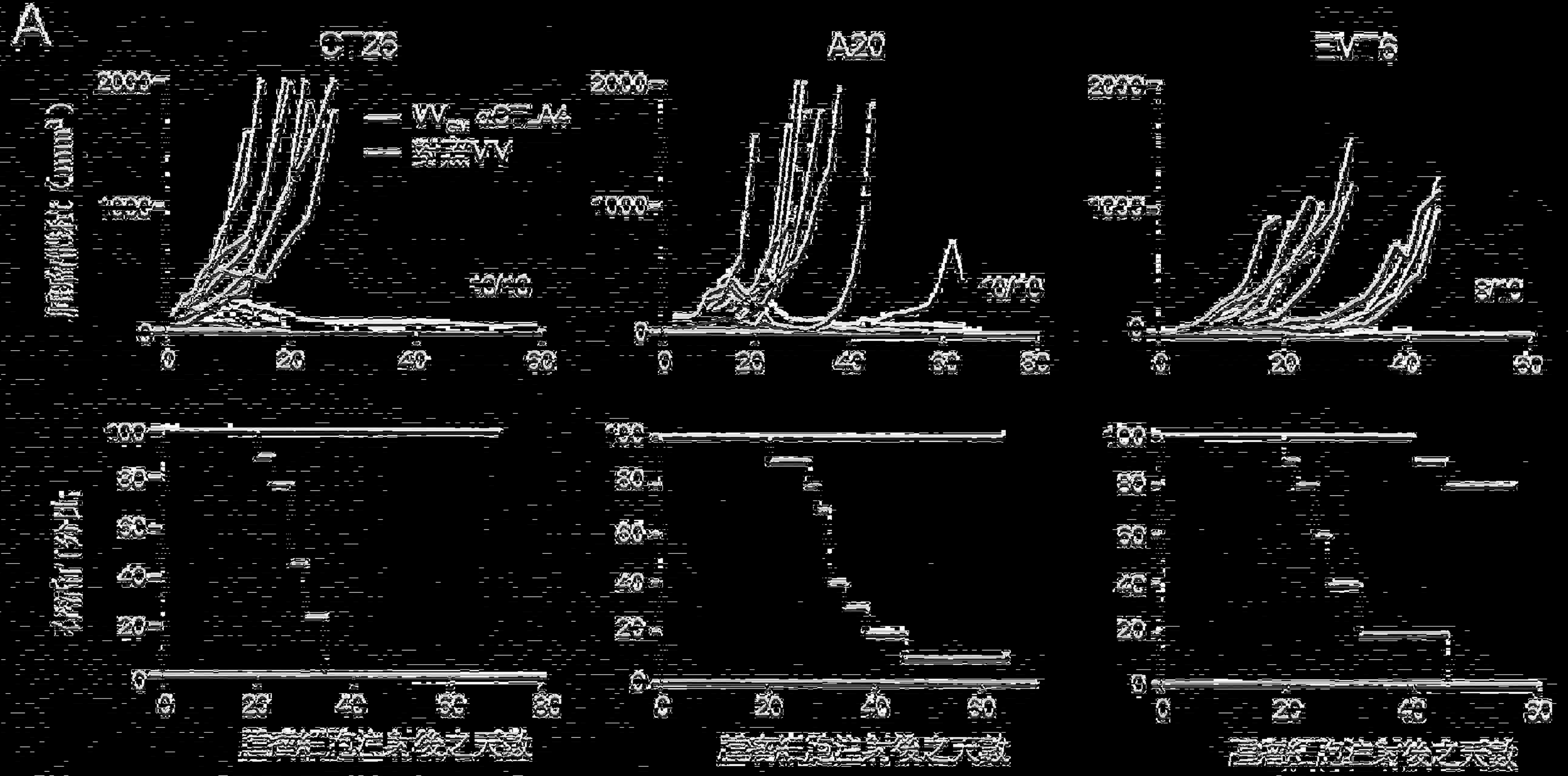


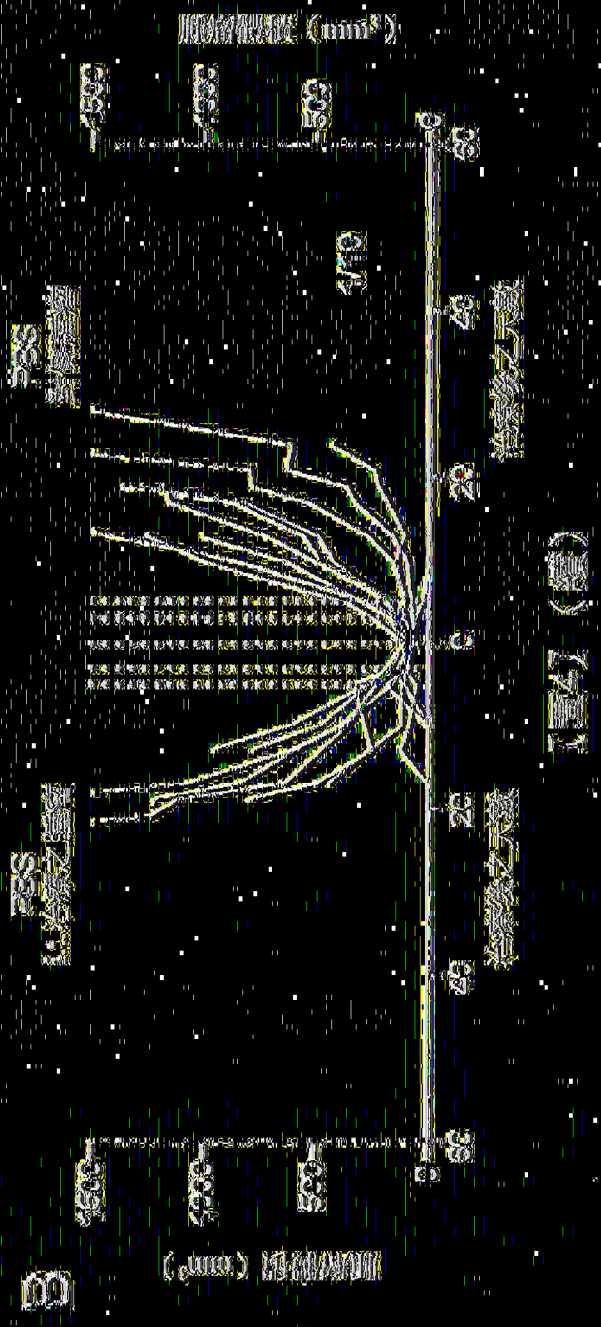
圖3（續）

FIG. 1
FIG. 2

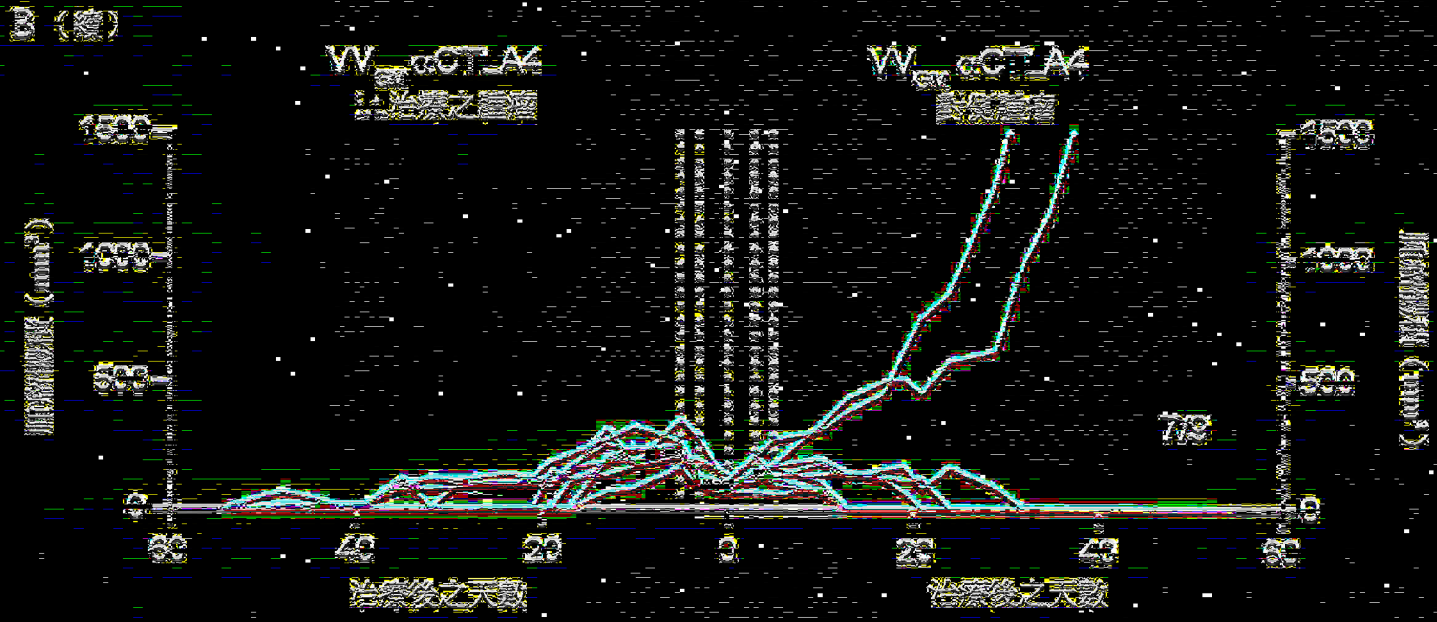


【圖4】

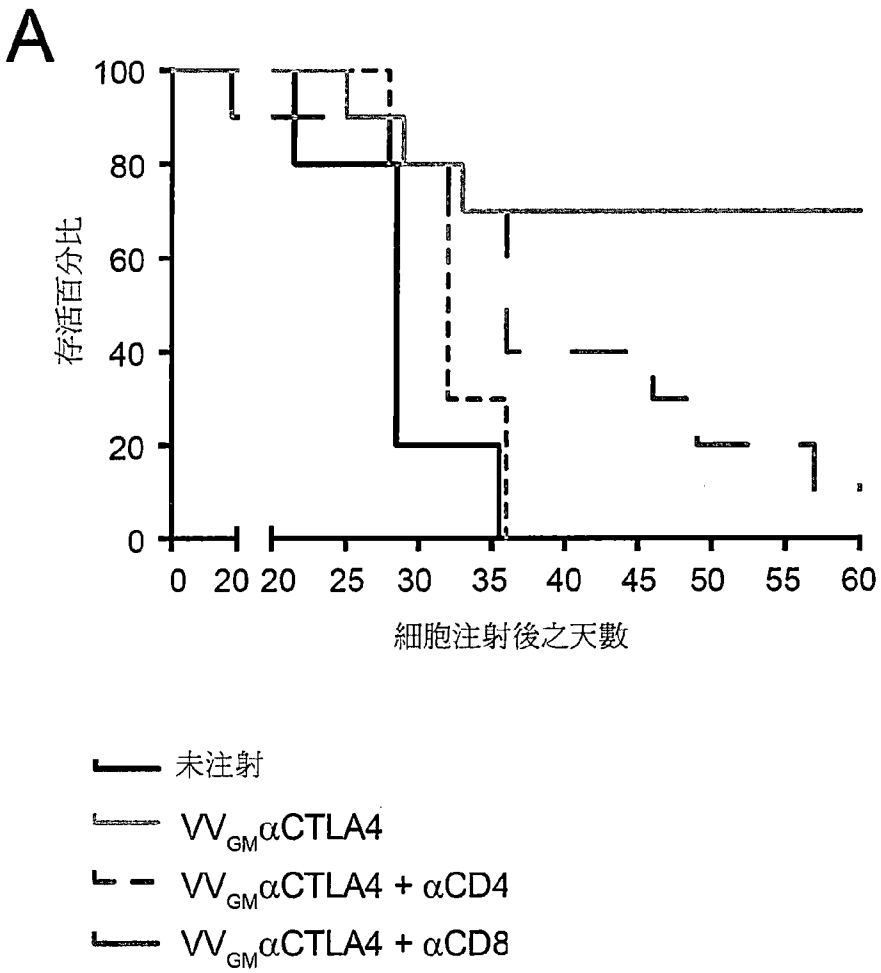
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)
(m)
(n)
(o)
(p)
(q)
(r)
(s)
(t)
(u)
(v)
(w)
(x)
(y)
(z)
(aa)
(ab)
(ac)
(ad)
(ae)
(af)
(ag)
(ah)
(ai)
(aj)
(ak)
(al)
(am)
(an)
(ao)
(ap)
(aq)
(ar)
(as)
(at)
(au)
(av)
(aw)
(ax)
(ay)
(az)
(ba)
(bb)
(bc)
(bd)
(be)
(bf)
(bg)
(bh)
(bi)
(bj)
(bk)
(bl)
(bm)
(bn)
(bo)
(bp)
(bq)
(br)
(bs)
(bt)
(bu)
(bv)
(bw)
(bx)
(by)
(bz)
(ca)
(cb)
(cc)
(cd)
(ce)
(cf)
(cg)
(ch)
(ci)
(cj)
(ck)
(cl)
(cm)
(cn)
(co)
(cp)
(cq)
(cr)
(cs)
(ct)
(cu)
(cv)
(cw)
(cx)
(cy)
(cz)
(da)
(db)
(dc)
(dd)
(de)
(df)
(dg)
(dh)
(di)
(dj)
(dk)
(dl)
(dm)
(dn)
(do)
(dp)
(dq)
(dr)
(ds)
(dt)
(du)
(dv)
(dw)
(dx)
(dy)
(dz)
(ea)
(eb)
(ec)
(ed)
(ee)
(ef)
(eg)
(eh)
(ei)
(ej)
(ek)
(el)
(em)
(en)
(eo)
(ep)
(eq)
(er)
(es)
(et)
(eu)
(ev)
(ew)
(ex)
(ey)
(ez)
(fa)
(fb)
(fc)
(fd)
(fe)
(ff)
(fg)
(fh)
(fi)
(fj)
(fk)
(fl)
(fm)
(fn)
(fo)
(fp)
(fq)
(fr)
(fs)
(ft)
(fu)
(fv)
(fw)
(fx)
(fy)
(fz)
(ga)
(gb)
(gc)
(gd)
(ge)
(gf)
(gg)
(gh)
(gi)
(gj)
(gk)
(gl)
(gm)
(gn)
(go)
(gp)
(gq)
(gr)
(gs)
(gt)
(gu)
(gv)
(gw)
(gx)
(gy)
(gz)
(ha)
(hb)
(hc)
(hd)
(he)
(hf)
(hg)
(hh)
(hi)
(hj)
(hk)
(hl)
(hm)
(hn)
(ho)
(hp)
(hq)
(hr)
(hs)
(ht)
(hu)
(hv)
(hw)
(hx)
(hy)
(hz)
(ia)
(ib)
(ic)
(id)
(ie)
(if)
(ig)
(ih)
(ii)
(ij)
(ik)
(il)
(im)
(in)
(io)
(ip)
(iq)
(ir)
(is)
(it)
(iu)
(iv)
(iw)
(ix)
(iy)
(iz)
(ja)
(jb)
(jc)
(jd)
(je)
(jf)
(jg)
(jh)
(ji)
(jj)
(jk)
(jl)
(jm)
(jn)
(jo)
(jp)
(jq)
(jr)
(js)
(jt)
(ju)
(jv)
(jw)
(jx)
(jy)
(jz)
(ka)
(kb)
(kc)
(kd)
(ke)
(kf)
(kg)
(kh)
(ki)
(kj)
(kk)
(kl)
(km)
(kn)
(ko)
(kp)
(kq)
(kr)
(ks)
(kt)
(ku)
(kv)
(kw)
(kx)
(ky)
(kz)
(la)
(lb)
(lc)
(ld)
(le)
(lf)
(lg)
(lh)
(li)
(lj)
(lk)
(ll)
(lm)
(ln)
(lo)
(lp)
(lq)
(lr)
(ls)
(lt)
(lu)
(lv)
(lw)
(lx)
(ly)
(lz)
(ma)
(mb)
(mc)
(md)
(me)
(mf)
(mg)
(mh)
(mi)
(mj)
(mk)
(ml)
(mm)
(mn)
(mo)
(mp)
(mq)
(mr)
(ms)
(mt)
(mu)
(mv)
(mw)
(mx)
(my)
(mz)
(na)
(nb)
(nc)
(nd)
(ne)
(nf)
(ng)
(nh)
(ni)
(nj)
(nk)
(nl)
(nm)
(nn)
(no)
(np)
(nq)
(nr)
(ns)
(nt)
(nu)
(nv)
(nw)
(nx)
(ny)
(nz)
(oa)
(ob)
(oc)
(od)
(oe)
(of)
(og)
(oh)
(oi)
(oj)
(ok)
(ol)
(om)
(on)
(oo)
(op)
(oq)
(or)
(os)
(ot)
(ou)
(ov)
(ow)
(ox)
(oy)
(oz)
(pa)
(pb)
(pc)
(pd)
(pe)
(pf)
(pg)
(ph)
(pi)
(pj)
(pk)
(pl)
(pm)
(pn)
(po)
(pp)
(pq)
(pr)
(ps)
(pt)
(pu)
(pv)
(pw)
(px)
(py)
(pz)
(qa)
(qb)
(qc)
(qd)
(qe)
(qf)
(qg)
(qh)
(qi)
(qj)
(qk)
(ql)
(qm)
(qn)
(qo)
(qp)
(qq)
(qr)
(qs)
(qt)
(qu)
(qv)
(qw)
(qx)
(qy)
(qz)
(ra)
(rb)
(rc)
(rd)
(re)
(rf)
(rg)
(rh)
(ri)
(rj)
(rk)
(rl)
(rm)
(rn)
(ro)
(rp)
(rq)
(rr)
(rs)
(rt)
(ru)
(rv)
(rw)
(rx)
(ry)
(rz)
(sa)
(sb)
(sc)
(sd)
(se)
(sf)
(sg)
(sh)
(si)
(sj)
(sk)
(sl)
(sm)
(sn)
(so)
(sp)
(sq)
(sr)
(ss)
(st)
(su)
(sv)
(sw)
(sx)
(sy)
(sz)
(ta)
(tb)
(tc)
(td)
(te)
(tf)
(tg)
(th)
(ti)
(tj)
(tk)
(tl)
(tm)
(tn)
(to)
(tp)
(tq)
(tr)
(ts)
(tt)
(tu)
(tv)
(tw)
(tx)
(ty)
(tz)
(ua)
(ub)
(uc)
(ud)
(ue)
(uf)
(ug)
(uh)
(ui)
(uj)
(uk)
(ul)
(um)
(un)
(uo)
(up)
(uq)
(ur)
(us)
(ut)
(uu)
(uv)
(uw)
(ux)
(uy)
(uz)
(va)
(vb)
(vc)
(vd)
(ve)
(vf)
(vg)
(vh)
(vi)
(vj)
(vk)
(vl)
(vm)
(vn)
(vo)
(vp)
(vq)
(vr)
(vs)
(vt)
(vu)
(vv)
(vw)
(vx)
(vy)
(vz)
(wa)
(wb)
(wc)
(wd)
(we)
(wf)
(wg)
(wh)
(wi)
(wj)
(wk)
(wl)
(wm)
(wn)
(wo)
(wp)
(wq)
(wr)
(ws)
(wt)
(wu)
(wv)
(ww)
(wx)
(wy)
(wz)
(xa)
(xb)
(xc)
(xd)
(xe)
(xf)
(xg)
(xh)
(xi)
(xj)
(xk)
(xl)
(xm)
(xn)
(xo)
(xp)
(xq)
(xr)
(xs)
(xt)
(xu)
(xv)
(xw)
(xx)
(xy)
(xz)
(ya)
(yb)
(yc)
(yd)
(ye)
(yf)
(yg)
(yh)
(yi)
(yj)
(yk)
(yl)
(ym)
(yn)
(yo)
(yp)
(yq)
(yr)
(ys)
(yt)
(yu)
(yv)
(yw)
(yx)
(yy)
(yz)
(za)
(zb)
(zc)
(zd)
(ze)
(zf)
(zg)
(zh)
(zi)
(zj)
(zk)
(zl)
(zm)
(zn)
(zo)
(zp)
(zq)
(zr)
(zs)
(zt)
(zu)
(zv)
(zw)
(zx)
(zy)
(zz)



2023.2.14 5:38

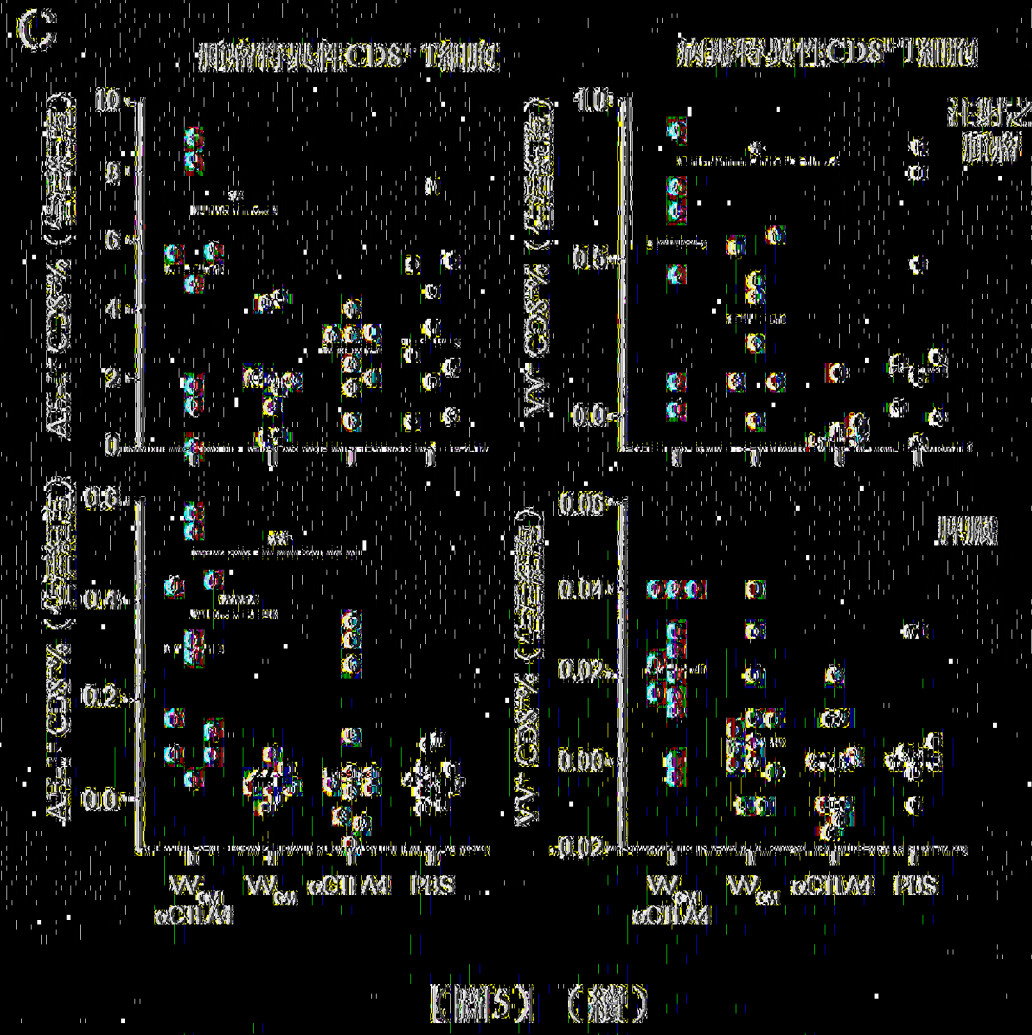


【圖4】（續）

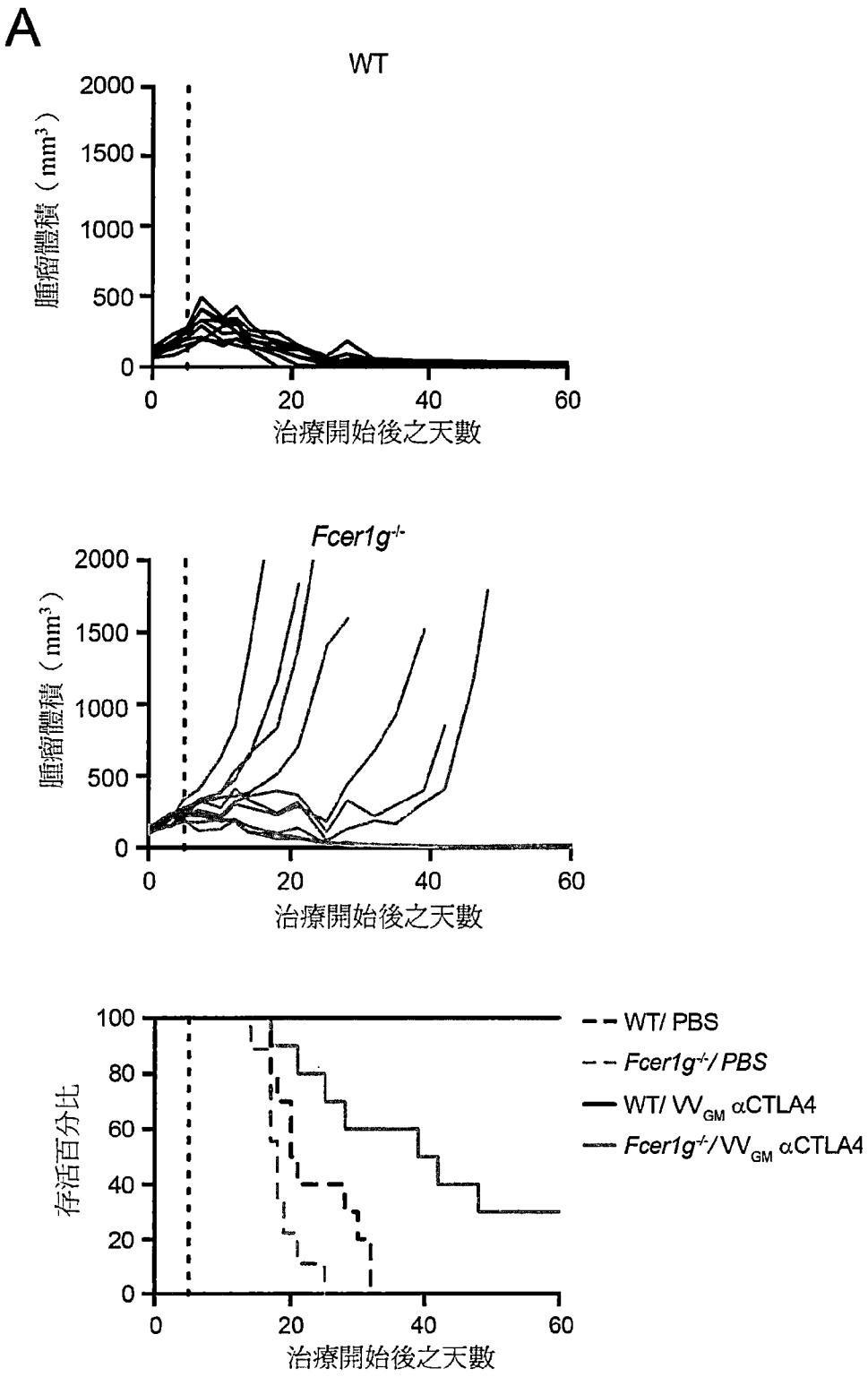

A
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0 20 20 25 30 35 40 45 50 55 60
細胞注射後之天數
未注射
VV$_{GM}$αCTLA4
VV$_{GM}$αCTLA4 + αCD4
VV$_{GM}$αCTLA4 + αCD8

【圖5】

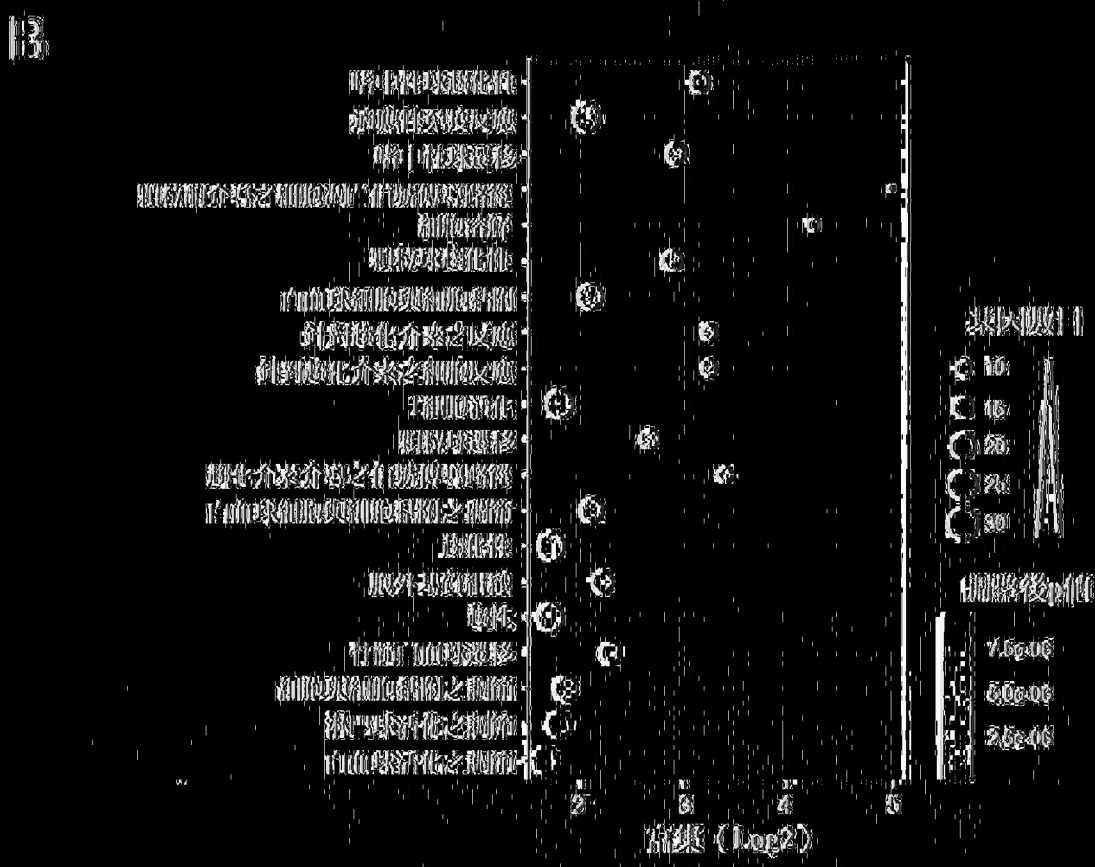
FIG. 3
H-N
C'-N
C'-C
C'-Cα
Cα-N
Cα-Cβ
Cα-C'
Cβ-Cγ
Cγ-Cδ
Cδ-Cε
Cε-Nζ


C
0.6
0.4
0.2
0.0
0.05
0.04
0.02
0.00
-0.02
PBS

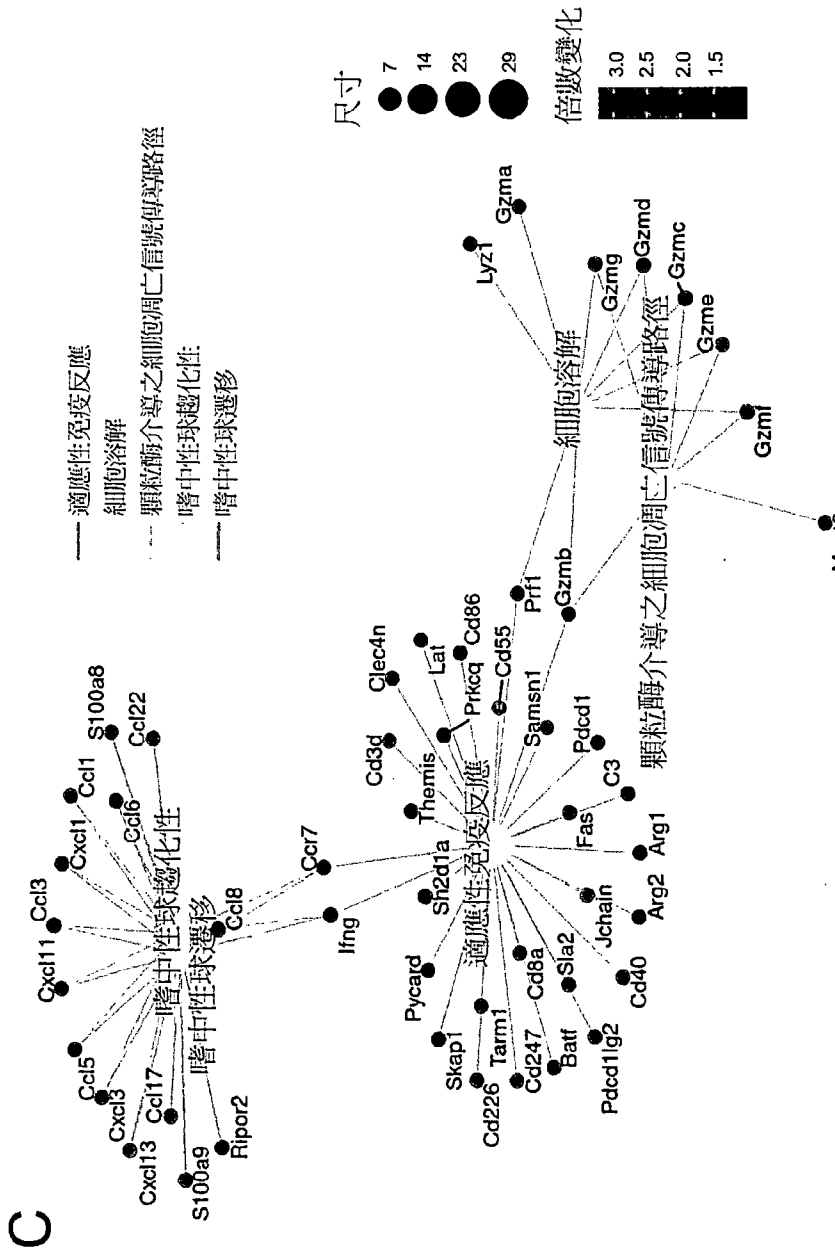
(b)
30
20
10
0
15
5
4
3
2
1
0
30
10
4
3
2
1
0
20
15
10
5
0
W
CONM
W
CONM
CONM
FBS


A
WT
腫瘤體積（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
治療開始後之天數
Fcer1g-/-
腫瘤體積（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
治療開始後之天數
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
治療開始後之天數
WT/ PBS
Fcer1g-/-/PBS
WT/ VVGM αCTLA4
Fcer1g-/-/VVGM αCTLA4

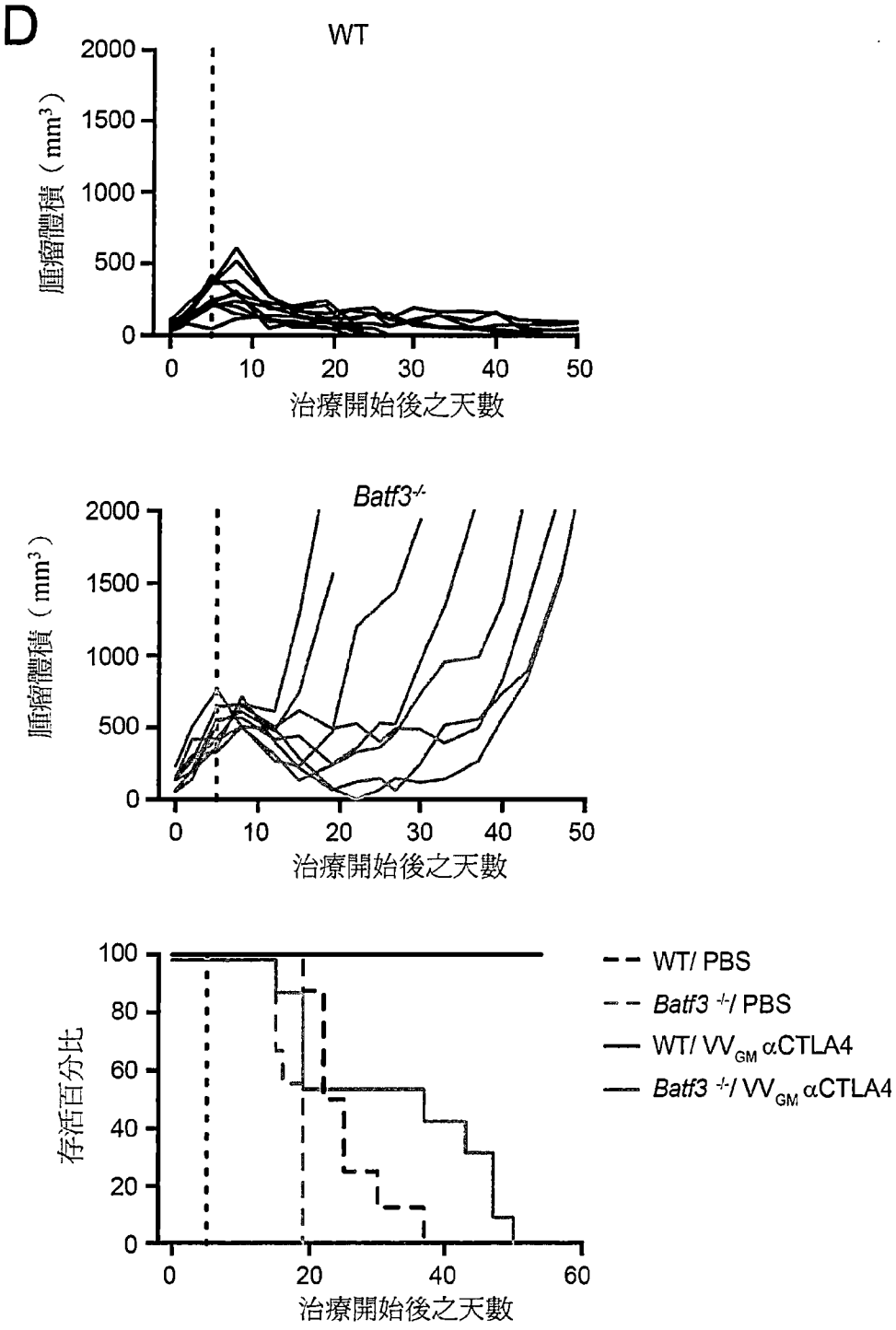
【圖6】



【附图6】（续）


C
適應性免疫反應
細胞溶解
顆粒酶介導之細胞凋亡信號傳導路徑
嗜中性球趨化性
嗜中性球遷移
尺寸
7
14
23
29
倍數變化
3.0
2.5
2.0
1.5
Ccl3
Cxcl11
Ccl1
Cxcl1
S100a8
Ccl6
Ccl22
Ccl5
Cxcl3
Ccl17
Cxcl13
S100a9
Ripor2
Ccl8
Ccr7
Ifng
嗜中性球趨化性
嗜中性球遷移
Cd3g
Clec4n
Lat
Themis
Prkcq
Cd86
Cd55
Sh2d1a
Samsn1
Pdcd1
C3
Fas
Arg1
Arg2
Jchain
Cd40
Pycard
Skap1
Cd226
Tarm1
Cd247
Cd8a
Sla2
Batf
Pdcd1lg2
適應性免疫反應
Prf1
Gzmb
Lyz1
Gzma
Gzmg
Gzmd
Gzmc
Gzme
Gzmf
Mcpt8
細胞溶解
顆粒酶介導之細胞凋亡信號傳導路徑

【圖6】（續）

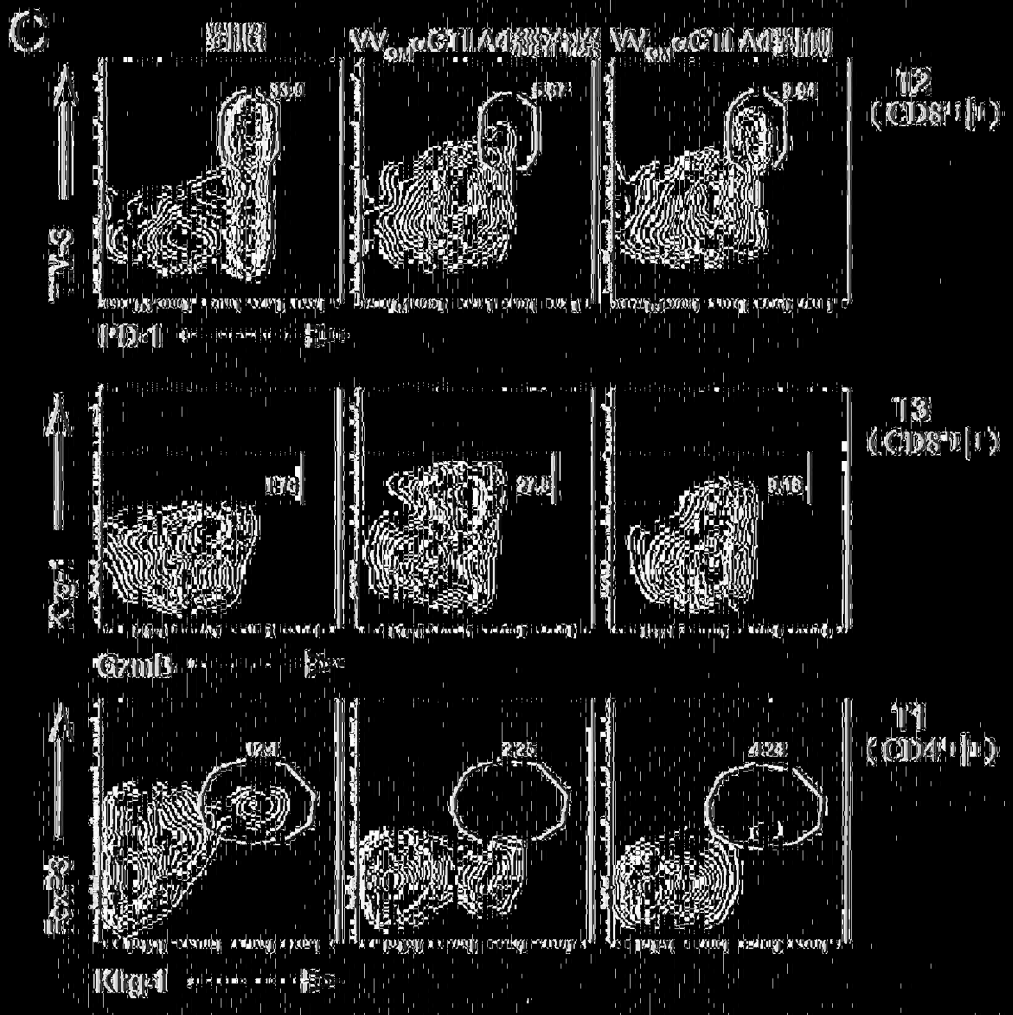

D
WT
腫瘤體積（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
治療開始後之天數
Batf3-/-
腫瘤體積（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
治療開始後之天數
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
治療開始後之天數
WT/ PBS
Batf3 -/- PBS
WT/ VVGM αCTLA4
Batf3 -/- VVGM αCTLA4

【圖6】（續）

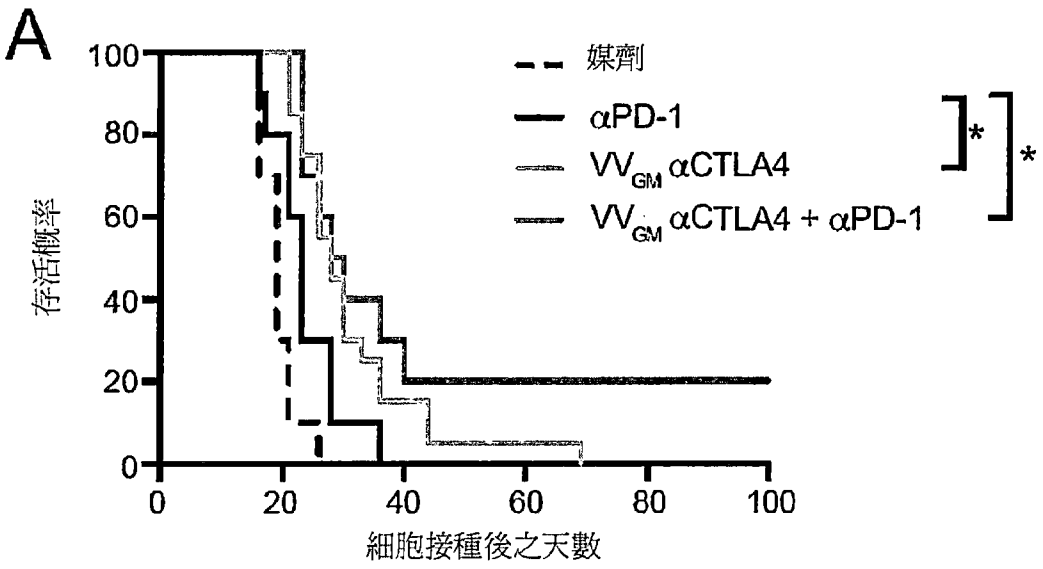
[図3]

[図4]

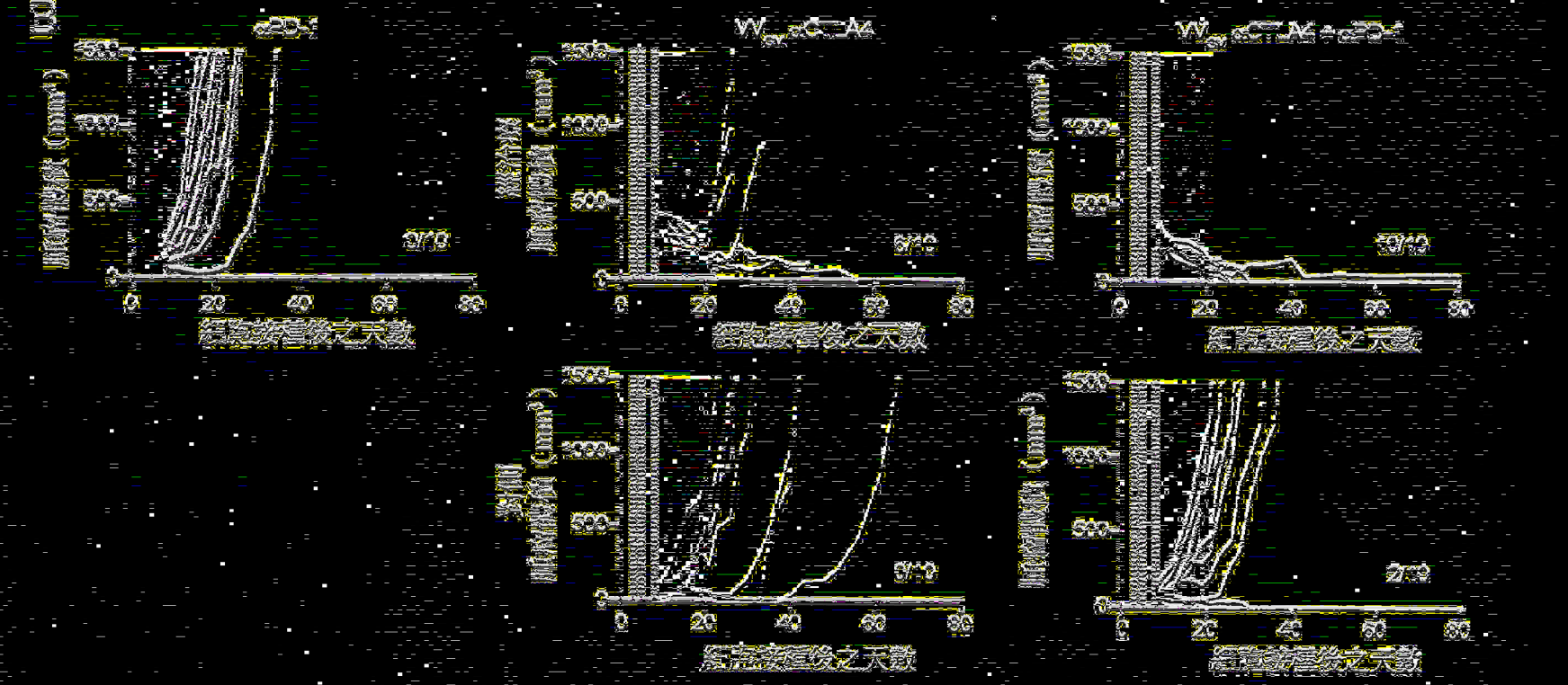
（続く）


C
Mock
VV-hGM-CSF
VV-hGM-CSF-hIL12
T2
(CD8+ IFN-γ+)
PD-1
T3
(CD8+ IFN-γ+)
Granzyme B
T1
(CD4+ IFN-γ+)
Ki67

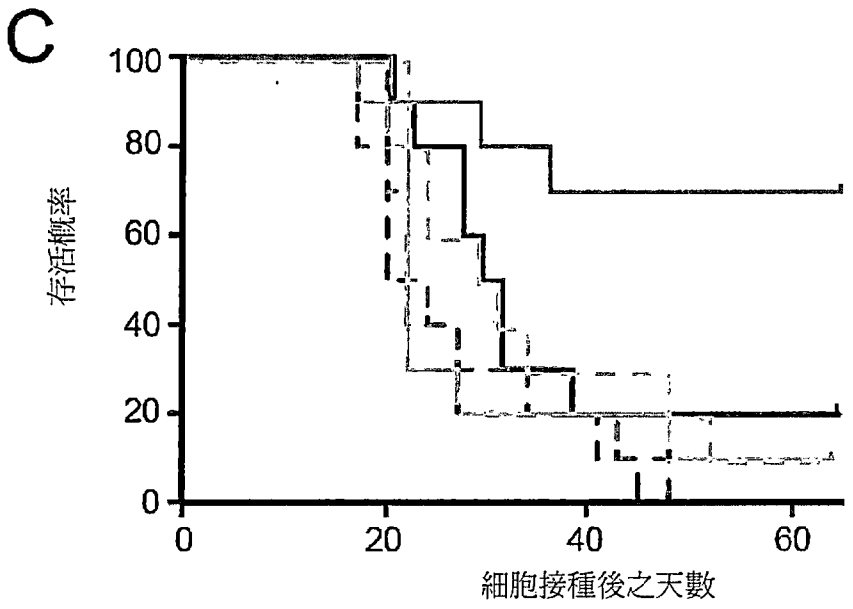
[図17] (続き)


A
100
80
60
40
20
0
存活概率
0
20
40
60
80
100
細胞接種後之天數
媒劑
αPD-1
VV$_{GM}$ αCTLA4
VV$_{GM}$ αCTLA4 + αPD-1
*
*

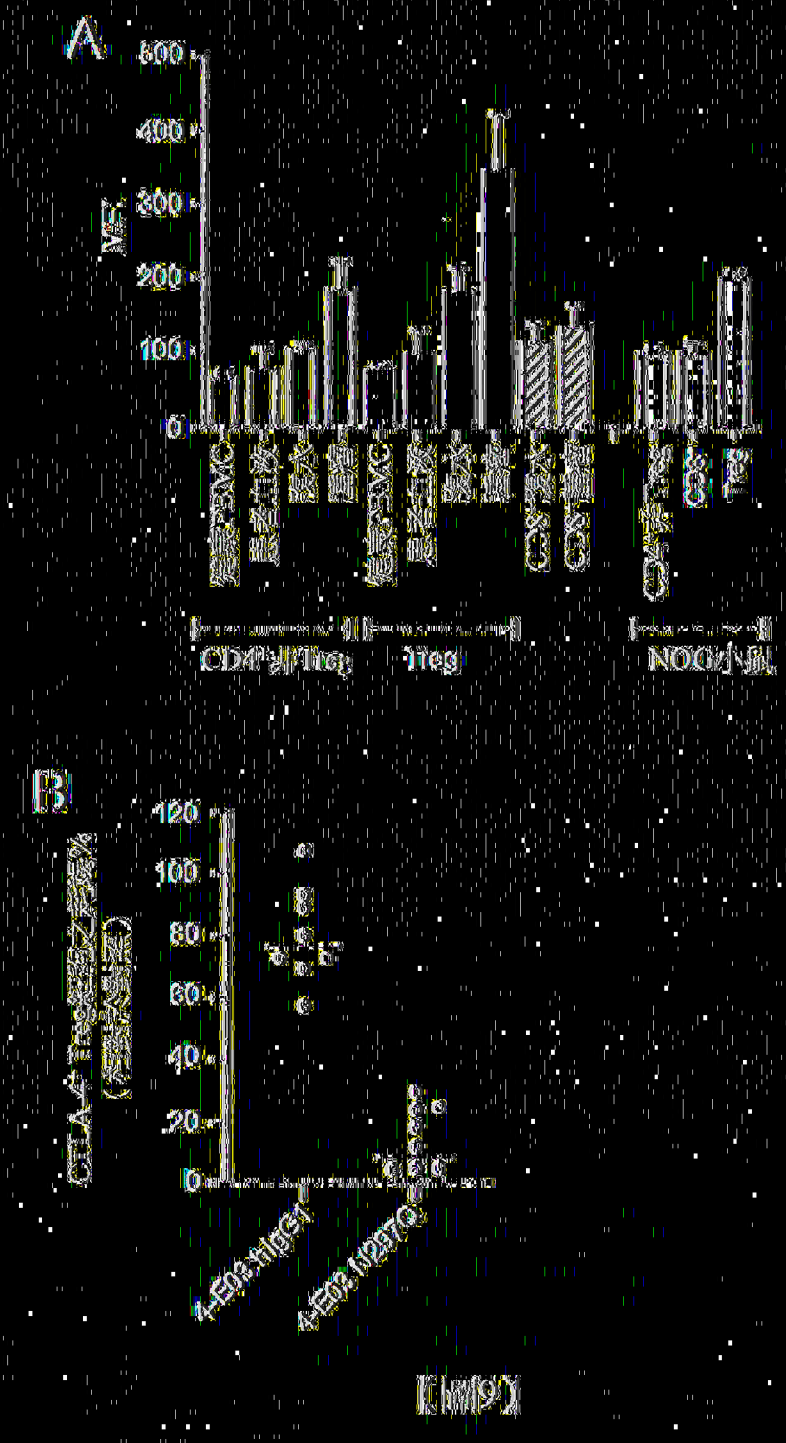
【圖8】

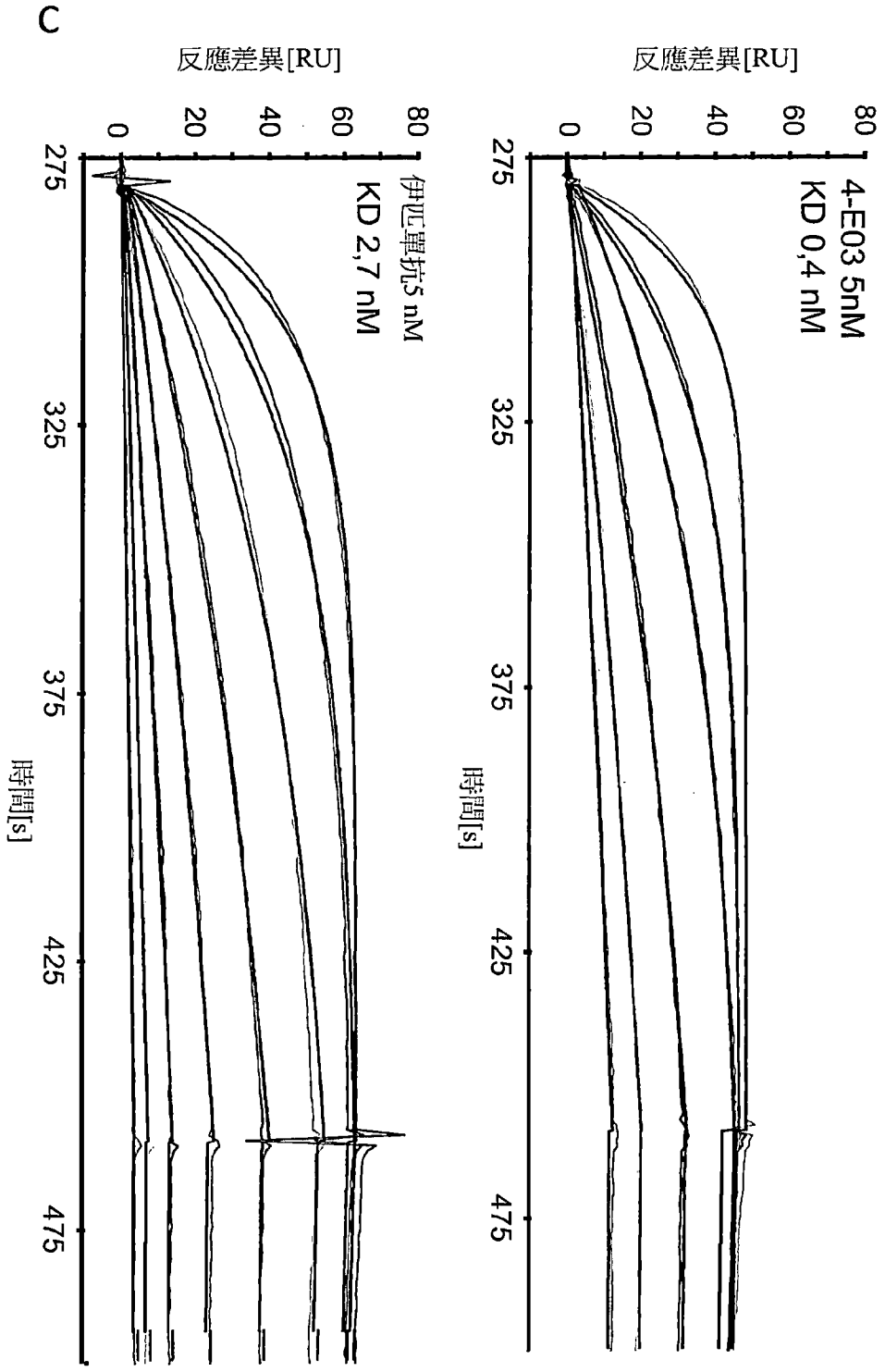


【图8】（续）

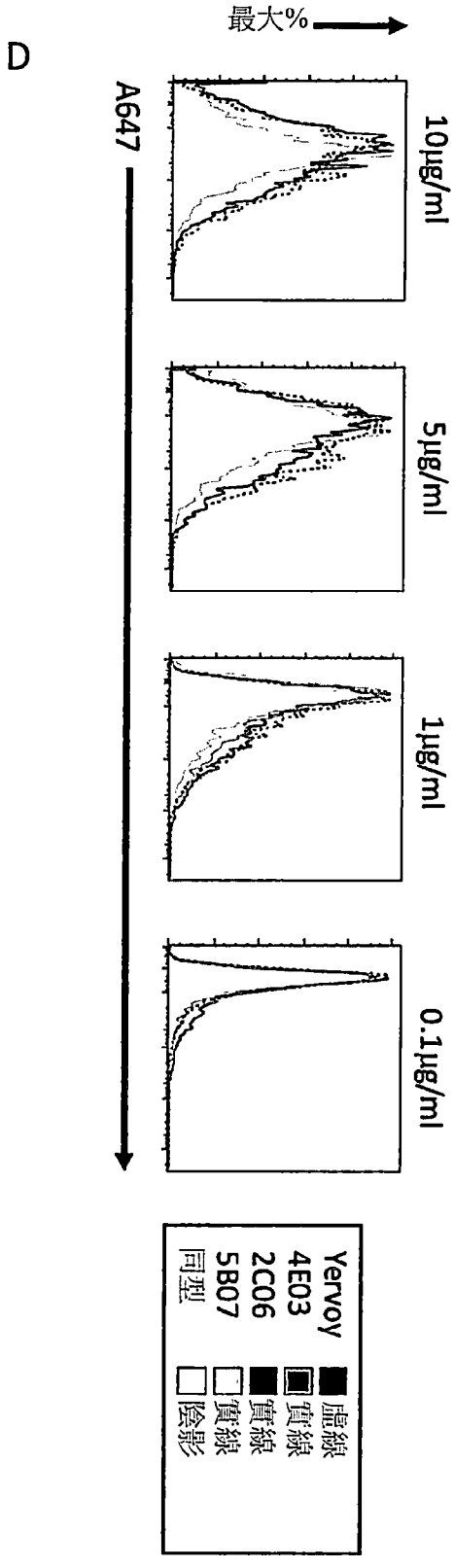

C
100
80
60
40
20
0
存活概率
0
20
40
60
細胞接種後之天數
VVGM αCTLA4 + αPD-1
VVGM αCTLA4 + 同型
對照VV + αPD-1
αPD-1
媒劑
對照VV

【圖8】（續）

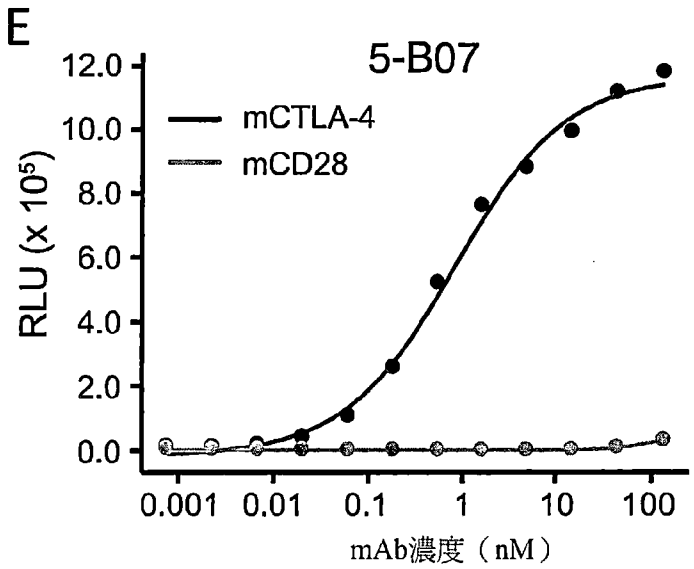

A
800
400
300
200
100
0
CD4+ Treg
Treg
NOG
B
120
100
80
60
40
20
0
4-EDC high
4-EDC low

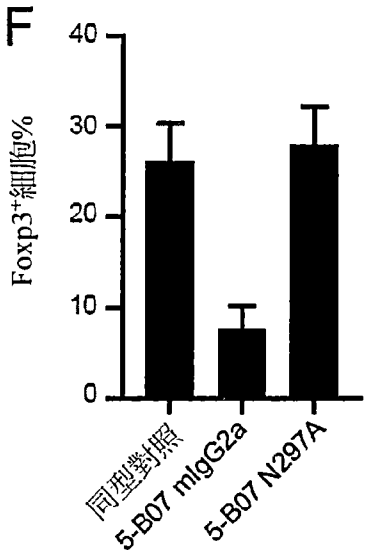

C
反應差異[RU]
0
20
40
60
80
伊匹單抗5 nM
KD 2,7 nM
275
325
375
425
475
時間[s]
反應差異[RU]
0
20
40
60
80
4-E03 5nM
KD 0,4 nM
275
325
375
425
475
時間[s]

【圖9】（續）

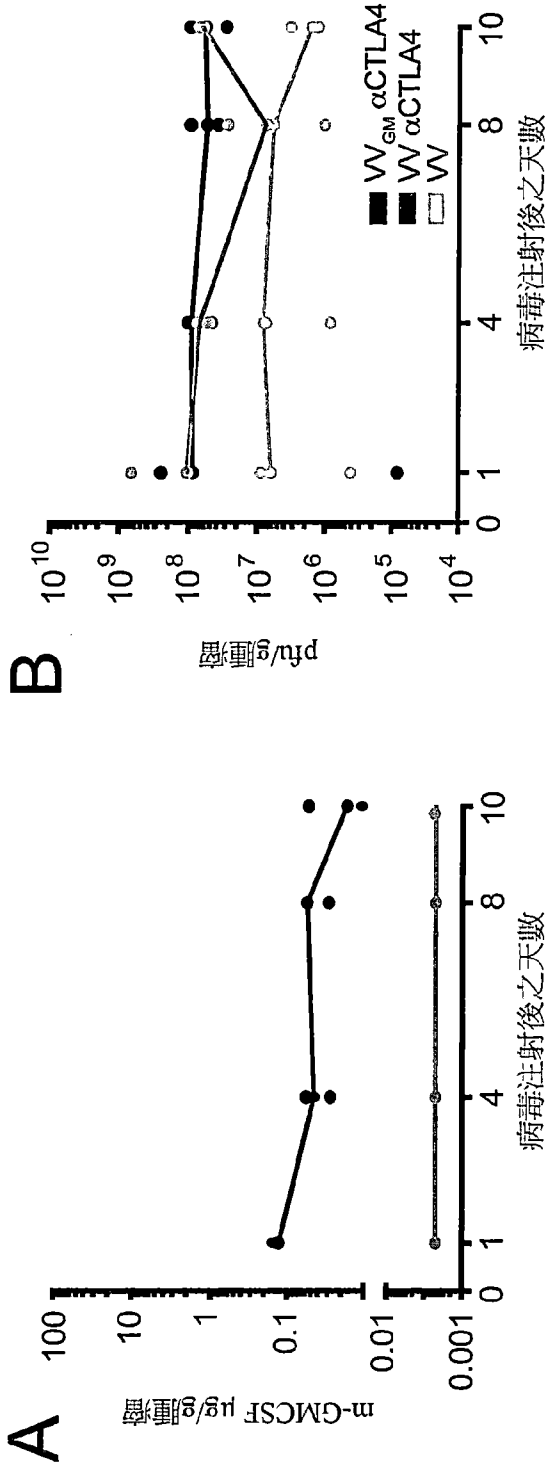

D
最大%
A647
10μg/ml
5μg/ml
1μg/ml
0.1μg/ml
Yervoy
4E03
2C06
5B07
同型
虛線
實線
實線
陰影

【圖9】（續）

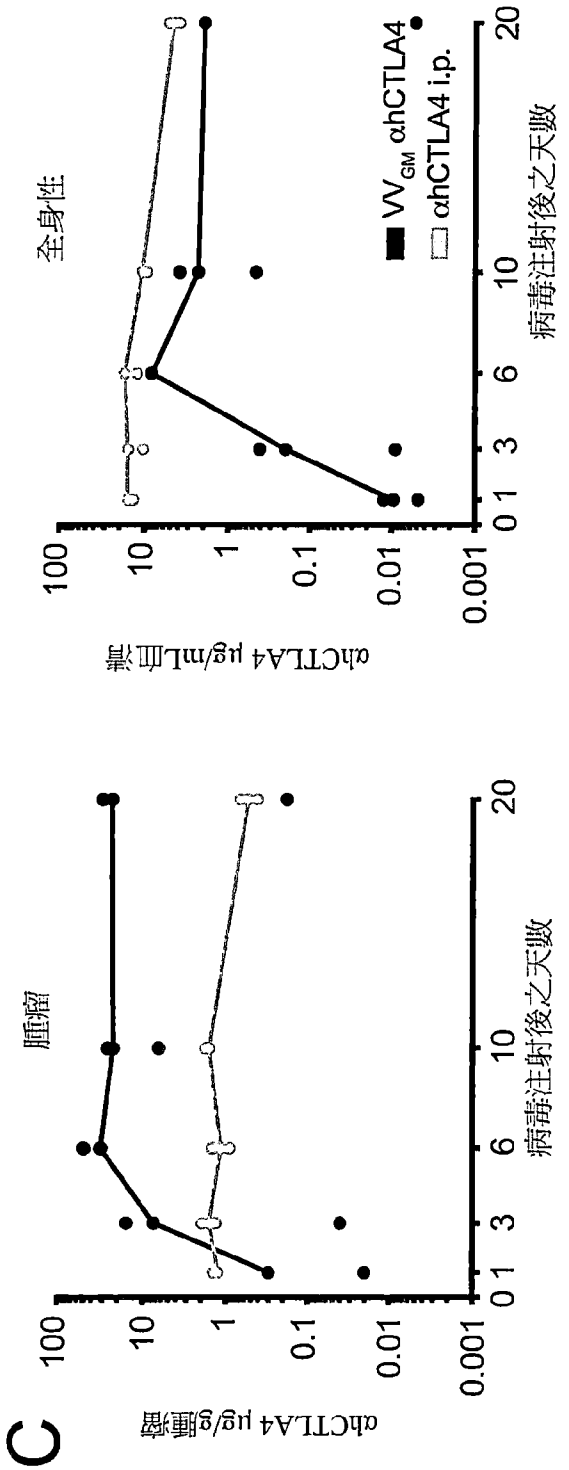

E
5-B07
mCTLA-4
mCD28
RLU (x 10^5)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb濃度（nM）


F
Foxp3+細胞%
40
30
20
10
0
同型對照
5-B07 mIgG2a
5-B07 N297A

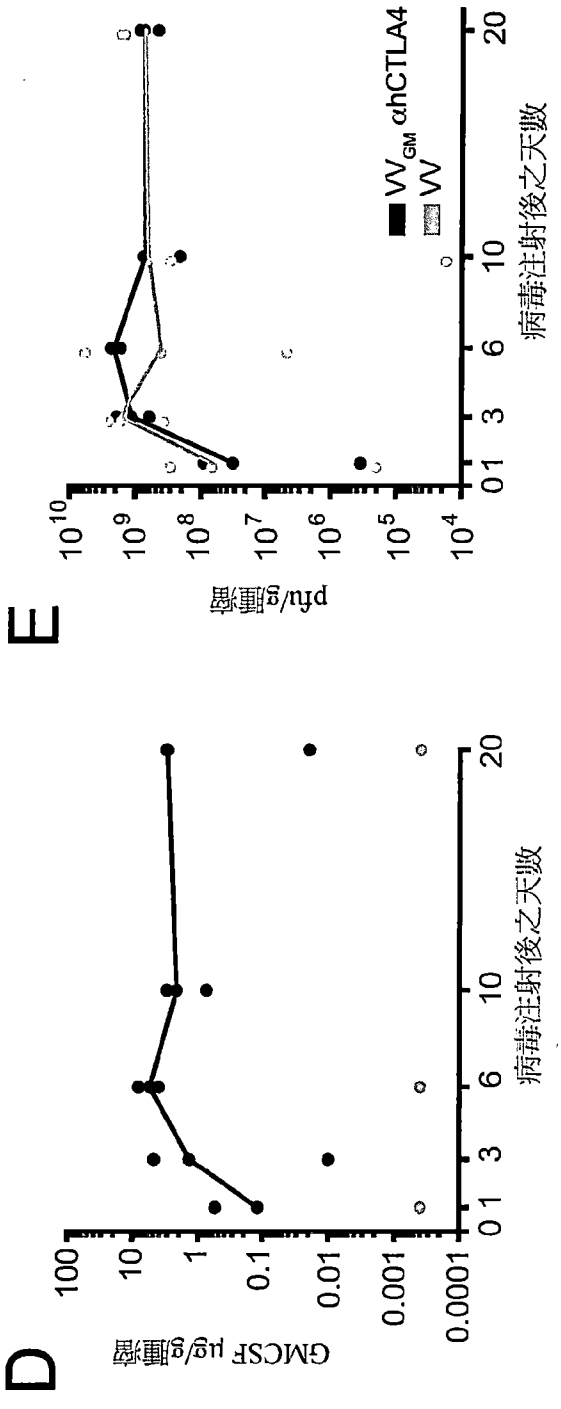
【圖9】（續）


A
m-GMCSF μg/g腫瘤
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
1
4
8
10
病毒注射後之天數
B
pfu/g腫瘤
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
VV_{GM} αCTLA4
VV αCTLA4
VV
病毒注射後之天數

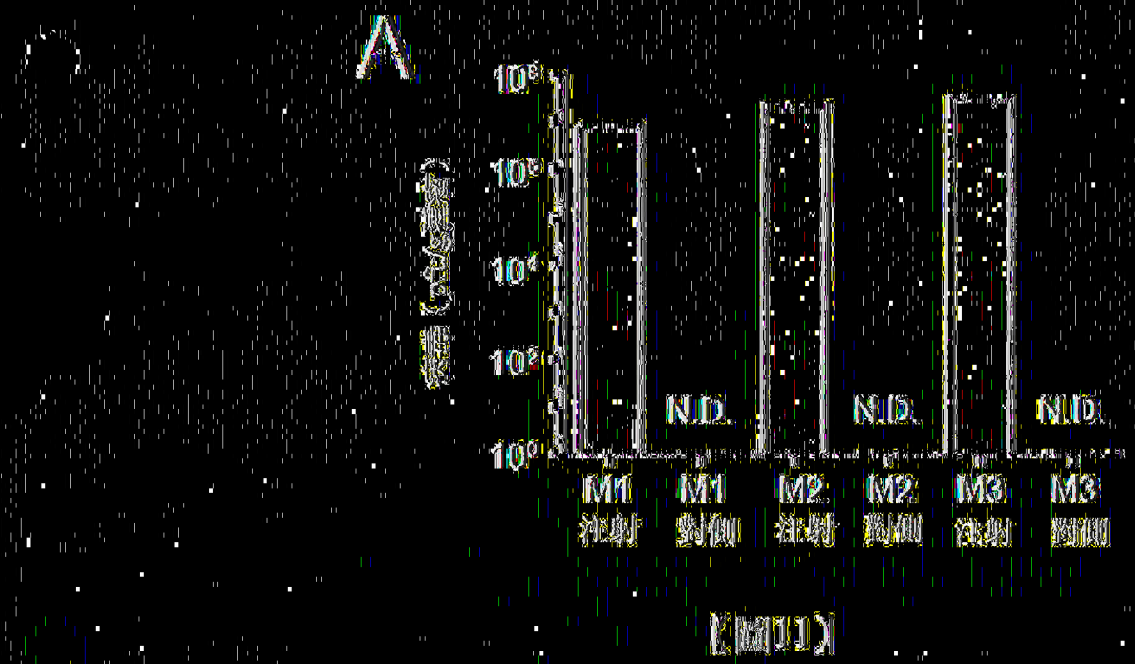
【圖10】

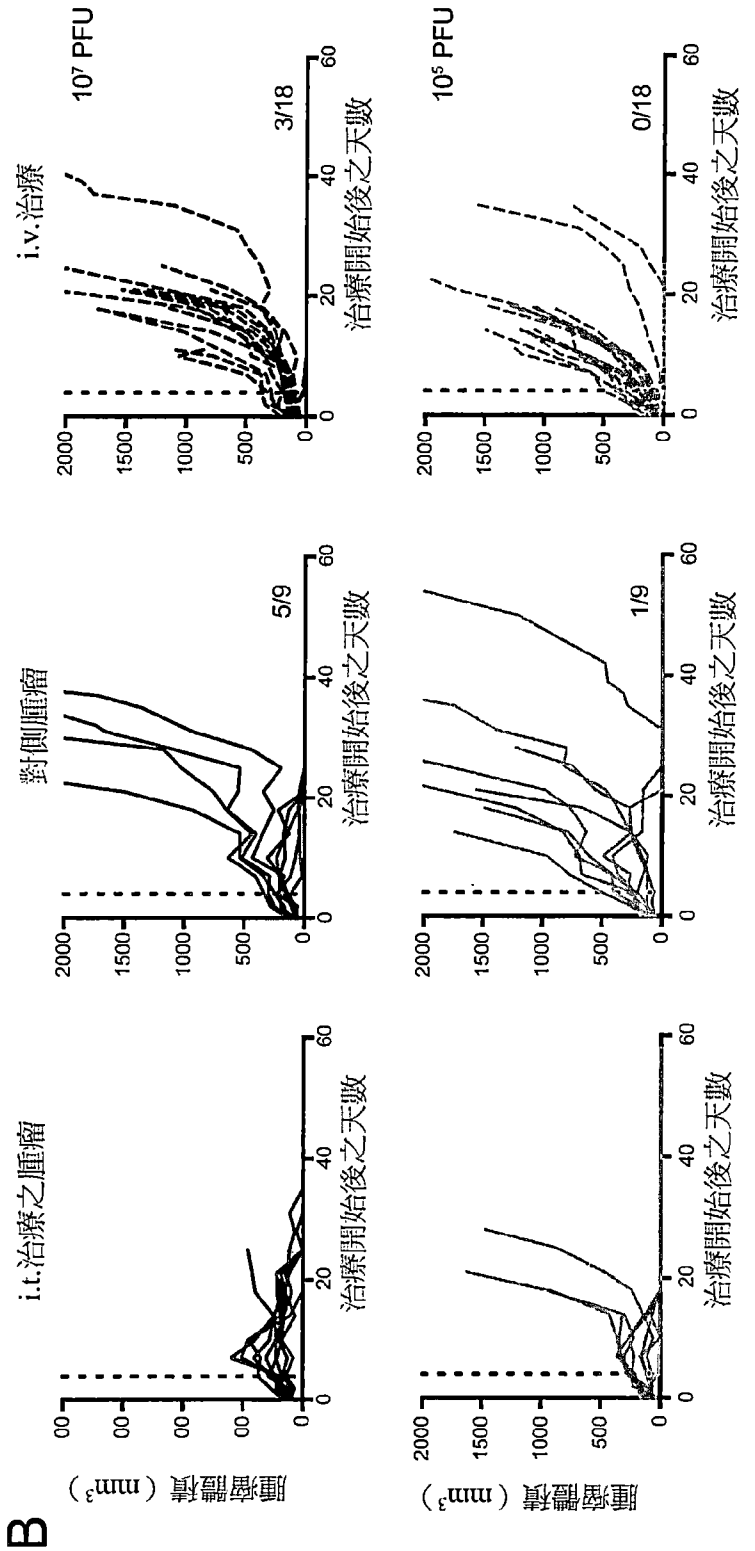

C
腫瘤
αhCTLA4 μg/g腫瘤
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0 1 3 6 10 20
病毒注射後之天數
全身性
αhCTLA4 μg/mL血清
■ VVGM αhCTLA4
□ αhCTLA4 i.p.

【圖10】（續）

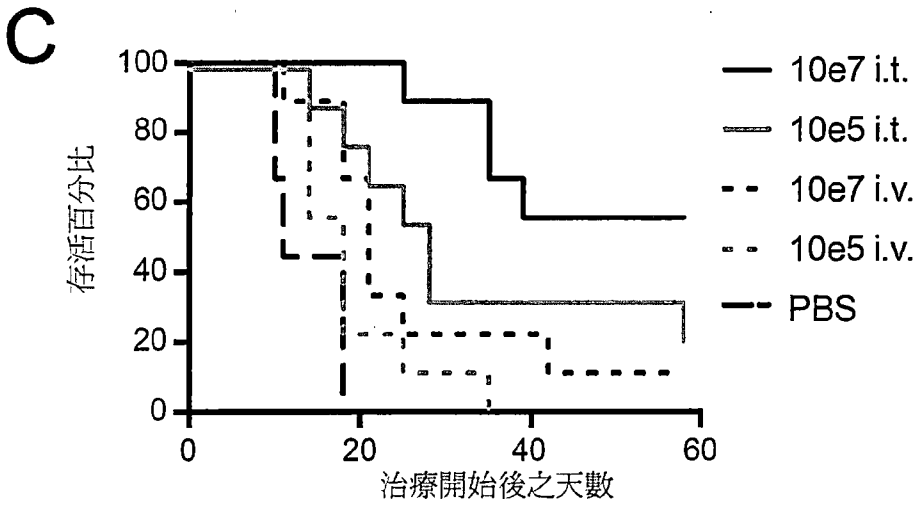

D
GMCSF μg/g腫瘤
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0 1 3 6 10 20
病毒注射後之天數
E
pfu/g腫瘤
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
0 1 3 6 10 20
病毒注射後之天數
VV_{GM} αhCTLA4
VV

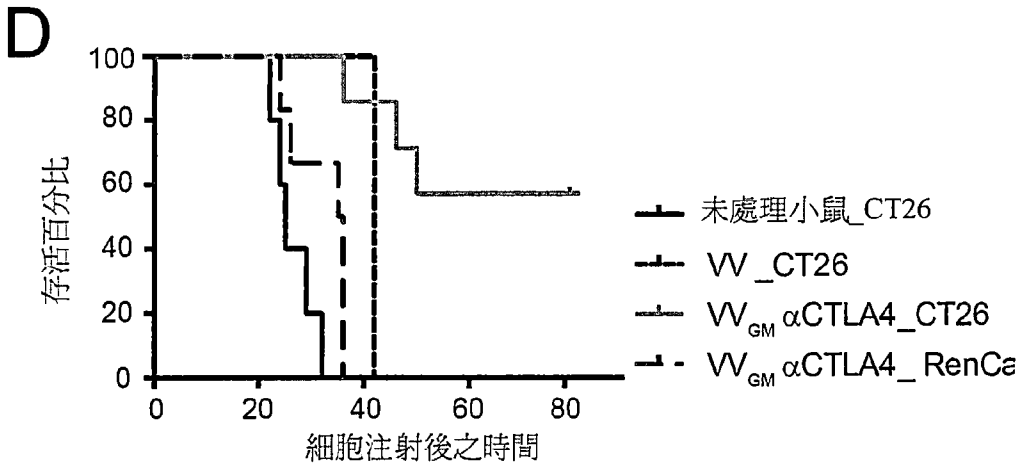
【圖10】（續）


A
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
N.D.
N.D.
N.D.
M1
M1
M2
M2
M3
M3

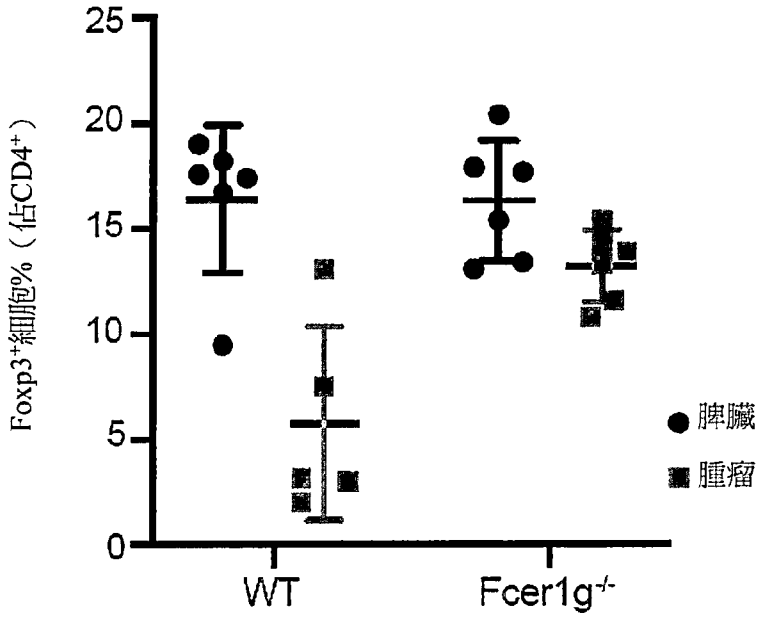

B
i.t.治療之腫瘤
對側腫瘤
i.v.治療
腫瘤體積（mm³）
治療開始後之天數
5/9
1/9
3/18
0/18
10⁷ PFU
10⁵ PFU

【圖11】（續）

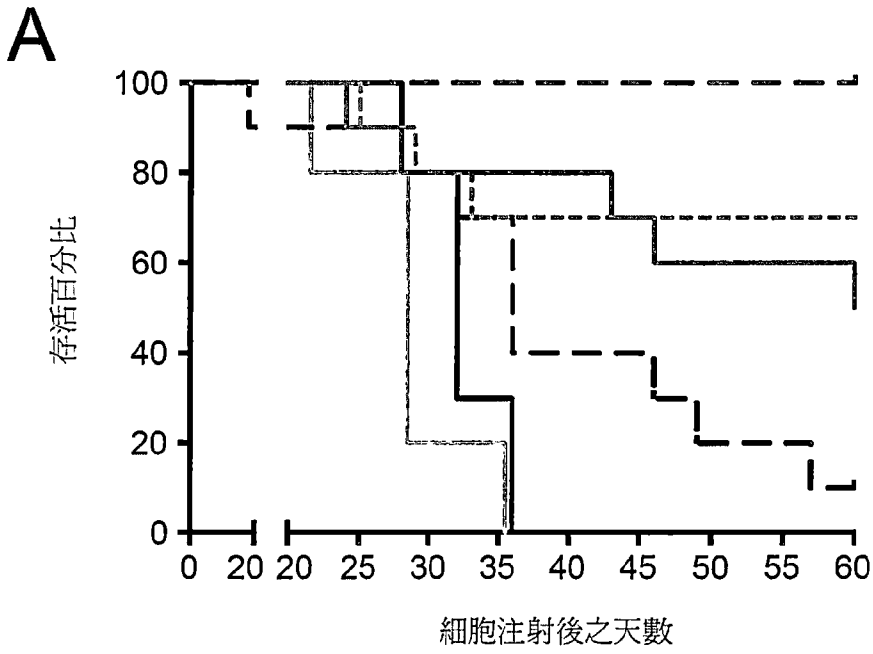

C
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
20
40
60
治療開始後之天數
10e7 i.t.
10e5 i.t.
10e7 i.v.
10e5 i.v.
PBS


D
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
20
40
60
80
細胞注射後之時間
未處理小鼠_CT26
VV _CT26
VVGM αCTLA4_CT26
VVGM αCTLA4_ RenCa

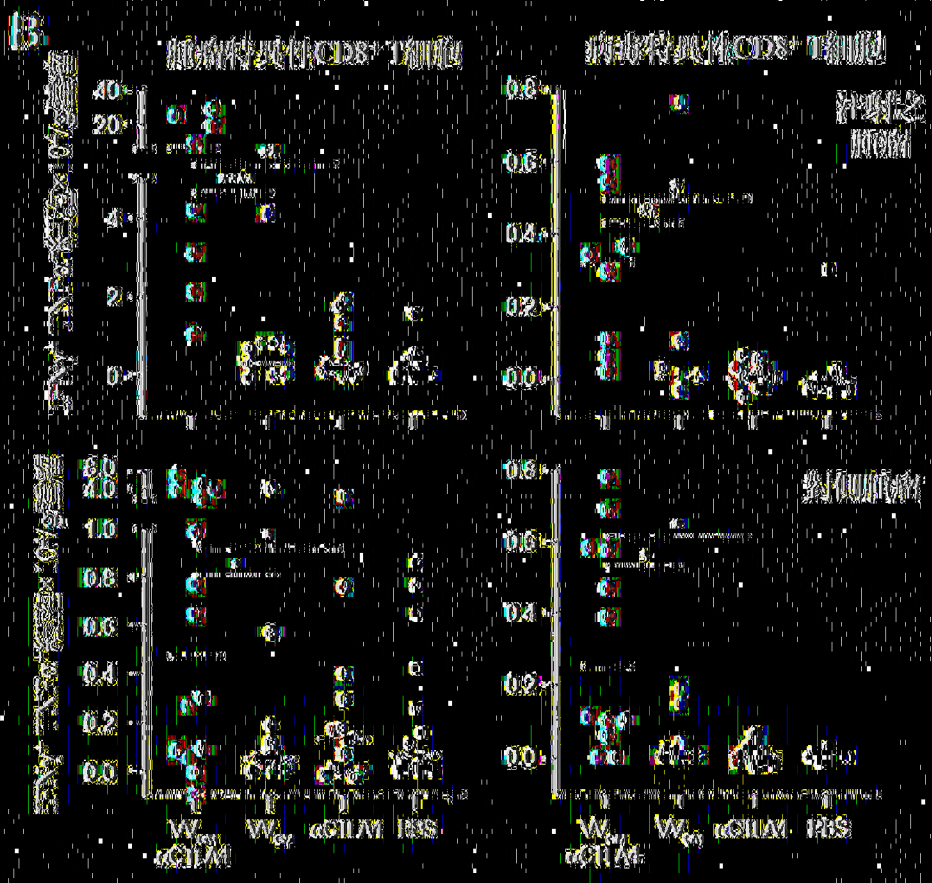
【圖11】（續）



【圖12】


A
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0 20 20 25 30 35 40 45 50 55 60
細胞注射後之天數
未注射
VV$_{GM}$αCTLA4
VV$_{GM}$αCTLA4 + αCD4
VV$_{GM}$αCTLA4 + αCD8
VV$_{GM}$αCTLA4 + 同型CD8
VV$_{GM}$αCTLA4 + 同型CD4

【圖13】

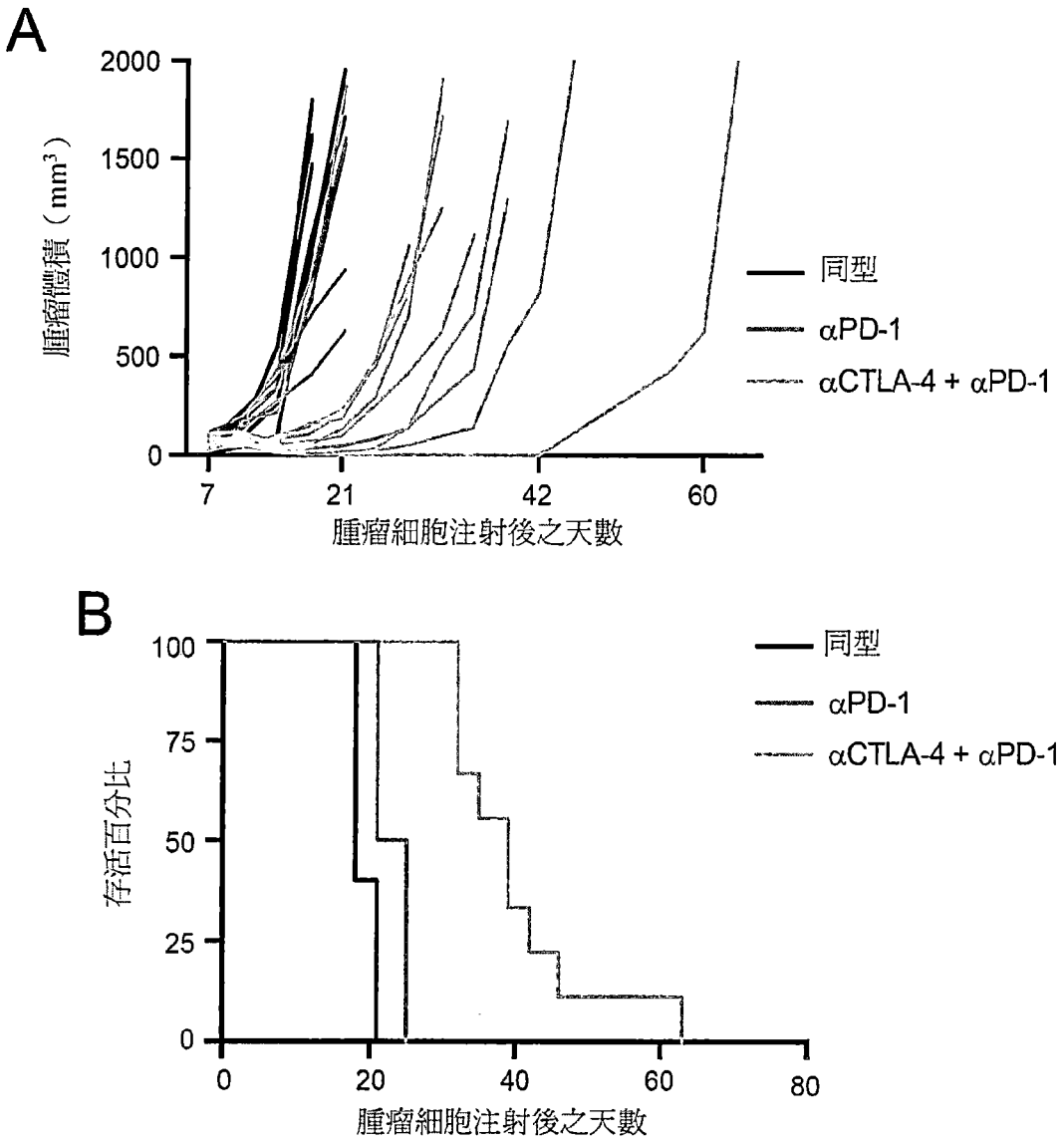


【図13】（続）

FIG. 3
CD8a
CD26
GZMA
ICOS
TIGIT
KLRG1
PDCD1
IL2RA
CCR8
KIR3DL1
CD4
FOXP3

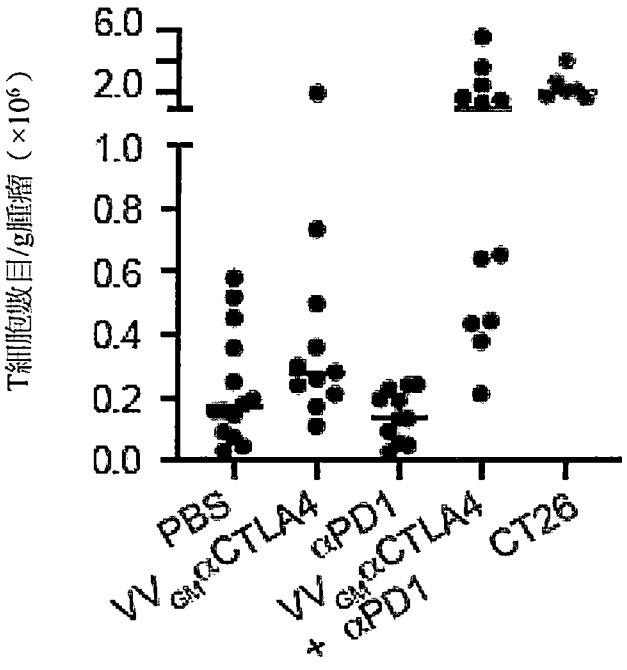
202321458

CDb92L
cQD2s
CjP1
ICOS
1fbd
IKI67
HD1
iFoXp3
GzmB
KIg1
TIM3
cD4N
GTIAN


A
2000
1500
1000
500
0
腫瘤體積（mm³）
7
21
42
60
腫瘤細胞注射後之天數
同型
αPD-1
αCTLA-4 + αPD-1
B
100
75
50
25
0
存活百分比
0
20
40
60
80
腫瘤細胞注射後之天數
同型
αPD-1
αCTLA-4 + αPD-1

【圖14】

C


T細胞數目/g腫瘤（×10⁶）
6.0
2.0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
VV GM-αCTLA4
αPD1
VV GM-αCTLA4 + αPD1
CT26

【圖14】（續）