202034951

(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 202034951 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：108144716　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 12 月 06 日

(51)Int. Cl.：　*A61K39/395 (2006.01)*　*A61P37/06 (2006.01)*

A61P37/08 (2006.01)　*C07K16/28 (2006.01)*

(30)優先權：2018/12/07　日本　2018-229774

(71)申請人：日商小野藥品工業股份有限公司 (日本) ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.　(JP)

日本

國立大學法人德島大學 (日本) TOKUSHIMA UNIVERSITY　(JP)

日本

(72)發明人：岡崎拓 OKAZAKI, TAKU (JP)；杉浦大祐 SUGIURA, DAISUKE (JP)；前田武雄 MAEDA, TAKEO (JP)；柴山史朗 SHIBAYAMA, SHIRO (JP)

(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：22 項　圖式數：53　共 131 頁

(54)名稱

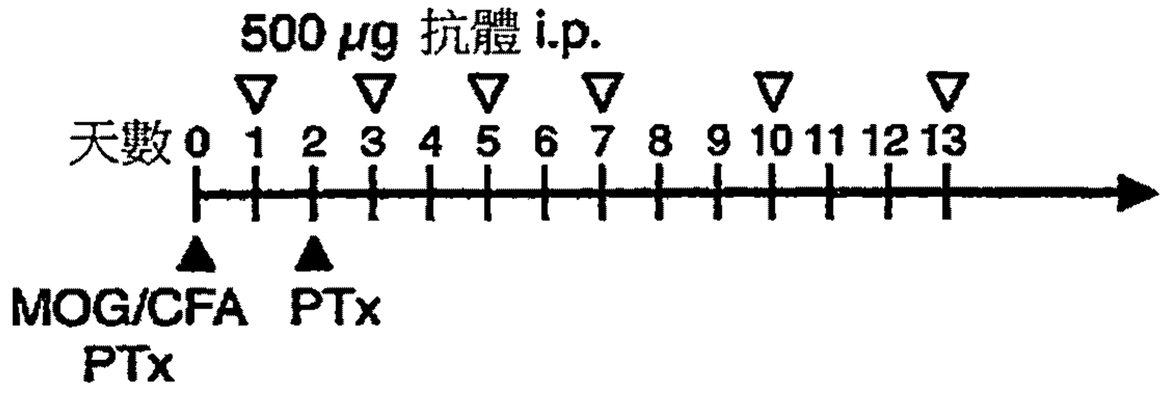
免疫抑制劑

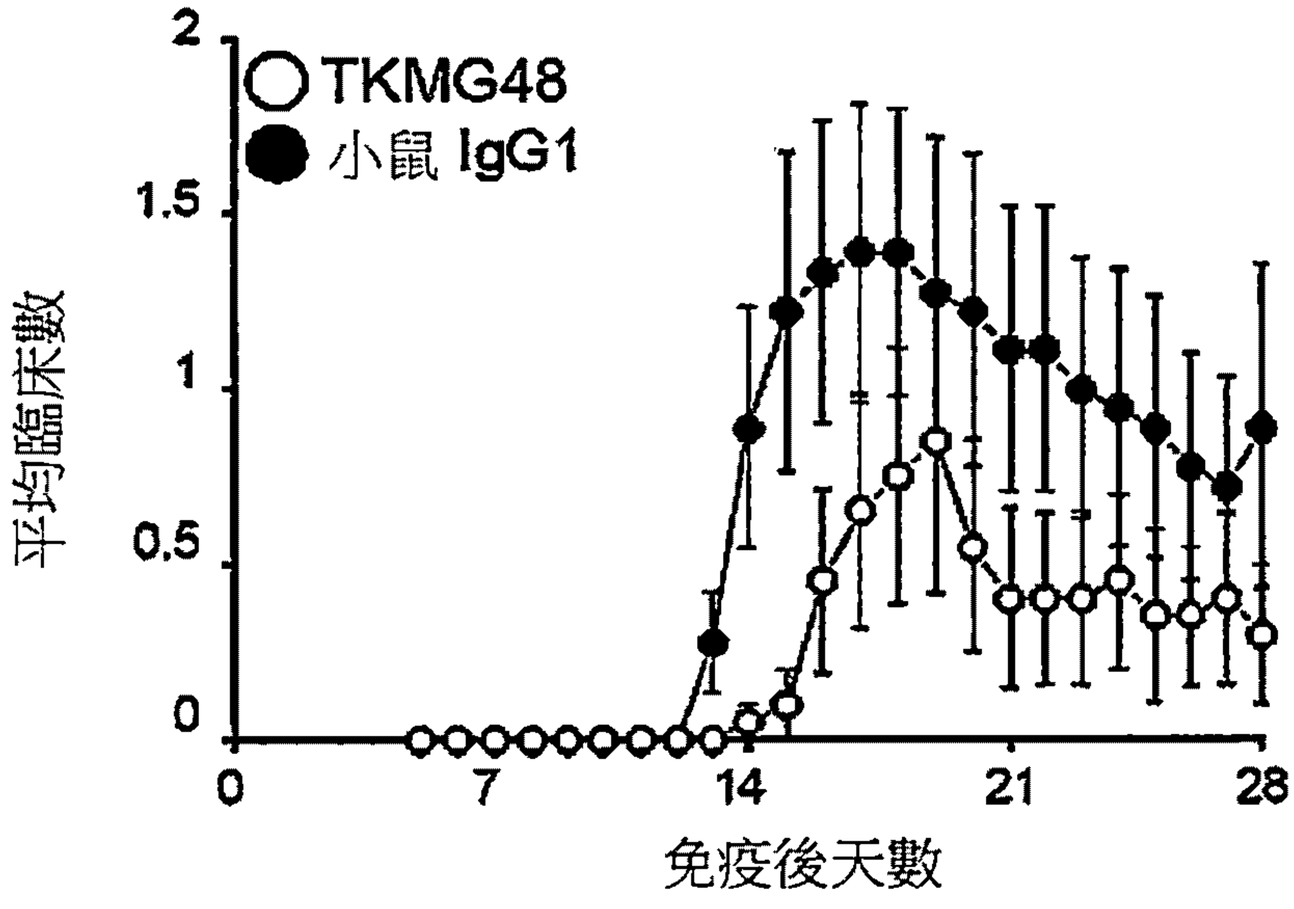
(57)摘要

本發明係提供一種免疫抑制劑，其係包含選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質。

The present invention provides an immunosuppressive agent which contains a substance selected from an anti-CD80 antibody and an anti-PD-L1 antibody and promoting the binding between PD-L1 and PD-1.

指定代表圖：


500 μg 抗體 i.p.
天數 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
MOG/CFA PTx
PTx


TKMG48
小鼠 IgG1
平均臨床數
免疫後天數
0
0.5
1
1.5
2
0
7
14
21
28

【第47圖】

202034951

【發明摘要】

【中文發明名稱】　免疫抑制劑

【英文發明名稱】　IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT

【中文】

本發明係提供一種免疫抑制劑，其係包含選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質。

【英文】

The present invention provides an immunosuppressive agent which contains a substance selected from an anti-CD80 antibody and an anti-PD-L1 antibody and promoting the binding between PD-L1 and PD-1.

【指定代表圖】　第47圖

【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】　免疫抑制劑

【英文發明名稱】　IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT

【技術領域】

【0001】本專利申請案係針對日本專利申請第 2018-229774 號主張優先權，在此藉由參照將其全部納入本說明書中。

本案係關於一種免疫抑制劑，其係包含選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質。

【先前技術】

【0002】免疫系統係在生體內識別病原體等非自身物質或癌細胞等異常細胞進而殺滅，藉此，保護生體免於疾病。免疫系統雖以攻擊病原體或異常細胞，而不攻擊正常之自身物質之方式被精密地控制，惟，若其控制機構有破綻，則會引起自體免疫疾病或慢性炎症性疾病等各種難治性疾病。

【0003】關於免疫系統之控制的各種分子為周知。程序性細胞死亡-1(Programmed death-1，PD-1)，係一種存在於 T 細胞表面之免疫檢查點受體，與程序性細胞死亡配體-1 (Programmed death ligand-1，PD-L1)及程序性細胞死亡配體-2 (Programmed death ligand-2，PD-L2)的兩種配體結合。CD80 係與 CD86 同為表現於 T 細胞之構造上很相似的 2 個分子，具有作為 CD28 及 CTLA-4 之配體的功能。CD28 活化 T 細胞，另一方面，CTLA-4 則抑制 T 細胞。已知 PD-1、PD-L1 及 CTLA-4 之標的化阻害，係可活化腫瘤特異性 T 細胞，在人類患者的腫瘤

處置上有效。又，阻害 CD80 與 CD28 之結合的抗 CD80 抗體，已被報導抑制 T 細胞活化(專利文獻 1)。

【0004】 很有趣地，已報導阻害 CD80/PD-L1 相互作用之抗 PD-L1 抗體，可活化腫瘤免疫，在癌症治療上有用(非專利文獻 1、專利文獻 2)。另一方面，有 CD80 與 PD-L1 於相同細胞上表現、結合的報導，亦有"以 CD80 所致之 T 細胞活性維持，係除了經由 CD28 中介之作用外，以 PD-1/PD-L1 系統所致之免疫抑制阻害亦參與其中"的報導(非專利文獻 2、3)。因此，CD80/PD-L1 相互作用之生理功能仍未解明。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】

[專利文獻 1]國際公開 1998/019706 號公報

[專利文獻 2]美國專利申請公開第 2011/0280877 號說明書

[非專利文獻]

【0006】

[非專利文獻 1] The Journal of Immunology, 2011, 187: 1113-1119

[非專利文獻 2] Cancer Immunol Res. 2014 July; 2(7): 610-615

[非專利文獻 3] Cancer Immunology Research, 2018 June 5, 6(8), 921-929

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0007】 本發明之 1 個目的係提供一種免疫抑制劑。

[用於解決課題之手段]

【0008】 在某態樣中，本揭示提供一種免疫抑制劑，其包含選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質。

在某態樣中，本揭示提供一種抗 CD80 抗體，其包含重鏈可變區域及輕鏈可變區域，該重鏈可變區域包含：包含序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、包含序列編號 10 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及包含序列編號 11 之胺基酸序列的重鏈 CDR3；該輕鏈可變區域包含：包含序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、包含序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及包含序列編號 14 之胺基酸序列的輕鏈 CDR3。

在某態樣中，本揭示提供一種抗 CD80 抗體，其包含重鏈可變區域及輕鏈可變區域，該重鏈可變區域包含：包含序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、包含序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及包含序列編號 19 之胺基酸序列的重鏈 CDR3；該輕鏈可變區域包含：包含序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、包含序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及包含序列編號 22 之胺基酸序列的輕鏈 CDR3。

在某態樣中，本揭示提供一種抗 CD80 抗體，其與上述抗體的任一種競合對 CD80 之結合。

在某態樣中，本揭示提供一種免疫抑制劑，其包含上述抗體的任一種作為有效成分。

在某態樣中，本揭示提供一種自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病的預防及/或治療劑，其包含上述抗體的任一種作為有效成分。

[發明之效果]

【0009】 藉由本揭示，可提供免疫抑制劑、或自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病的預防及/或治療劑，或可利用於此等之抗體。

【圖式簡單說明】

【0010】

第 1 圖展示 PD-1-EC(左)及圖中所示之標識抗體(右)之 PD-L1(上段)或 PD-L2(下段)與表現 CD80 或 CD86 之 IIAdL1 細胞的結合強度。

第 2 圖展示在與 IIAdL1-mock 細胞或 IIAdL1-CD80 細胞共培養之情況及未共培養之情況下，PD-1-EC 及抗 PD-L1 抗體與 IIAdL1-PD-L1 細胞之結合強度。

第 3 圖展示 IIAdL1 細胞中的 CD80 與 PD-L1 之共免疫沉降。WCL：未交聯之細胞溶解物全體。

第 4 圖展示將以圖中所示之量之抗原胜肽脈衝(pulse)後的抗原呈現細胞，與 PD-1 表現 DO11.10 T 細胞(PD-1(+))(左)或 PD-1 缺損 DO11.10 T 細胞(PD-1KO)(右)共培養時，源自 T 細胞之 IL-2 產生。圖中展示經由 PD-1 中介之 IL-2 產生之阻害比率。

第 5 圖展示 PD-L1 抗體(左)及 CD80 抗體(右)對於以各種濃度表現 PD-L1 及 CD80 之各 IIAdL1 細胞的結合強度。

第 6 圖展示 PD-1-EC 對於以最高濃度表現 PD-L1、以各種濃度表現 CD80 之各 IIAdL1 細胞的結合強度。

第 7 圖展示 PD-1-EC 對於以 25 種不同表現濃度表現 PD-L1 及 CD80 之各 IIAdL1 細胞的相對結合強度。

第 8 圖展示藉由以 25 種不同表現濃度表現 PD-L1 及 CD80 之各 IIAdL1 細

胞誘發源自 DO11.10 T 細胞之 IL-2 產生時，經由 PD-1 中介之 IL-2 產生的阻害比率。

【0011】 第 9 圖展示 PD-1-EC 及圖中所示之標識抗體，與 LPS 活化脾臟 $CD8\alpha^+$、$CD11b^+$DC 及 TG-MΦ 的結合強度。虛線直方圖為同型(isotype)對照染色。

第 10 圖展示 PD-1-EC 及圖中所示之抗體，與源自野生型小鼠或 C57BL/6-$Cd80^{-/-}$小鼠之 LPS 活性化脾臟 $CD8\alpha^+$、$CD11b^+$DC 及 TG-MΦ 的結合強度。

第 11 圖展示將圖中所示之量之抗原胜肽對 LPS 活化 TG-MΦ(上段)、脾臟 $CD8\alpha^+$(中段)及 $CD11b^+$(下段)進行 DC 脈衝，藉由此等細胞刺激 BW-OT-I 細胞(左)及 BW-OT-II 細胞(右)時，源自 T 細胞之 IL-2 產生。將 PD-L1 及 PD-L2 之功能阻害抗體及同型對照 IgG，如圖中所示之條件添加。

第 12 圖展示在圖中所示之條件下，經由 PD-1 中介之 IL-2 產生的阻害比率。伴隨鄧內特之事後檢定(Dunnet's post hoc test)的一元配置分散分析。**$p < 0.01$；***$p < 0.001$。

【0012】 第 13 圖為將 PD-L1、PD-L2、CD80 及 CD86 之 IgV 結構域及 IgC 結構域交換的嵌合分子之簡圖。

第 14 圖展示表現圖中所示之分子的 IIAdL1 細胞之 PD-1-EC 結合強度。

第 15 圖展示 IIAdL1-CD80 細胞之 PD-1-EC 結合能力，該 IIAdL1-CD80 細胞表現經單離之 PD-L1 變異體(上段)及 Y56 經胺基酸置換之 PD-L1(下段)。將細胞之 PD-1-EC 結合強度與不具有 CD80 之 IIAdL1-PD-L1 細胞之 PD-1-EC 結合強度比較並展示。

第 16 圖展示小鼠 PD-L1(左)及小鼠 CD80(右)的預測 3D 結構。展示對順式-

PD-L1/CD80 相互作用造成影響的胺基酸殘基。

第 17 圖展示 CD80 存在下的 PD-1-EC 與 PD-L1Y56A 之結合。展示 PD-1-EC(左)及抗 PD-L1 抗體(右)與表現圖中所示之分子之 IIAdL1 細胞的結合強度。

第 18 圖展示人類 CD80(左)及 CD86(右)之疏水性(灰色)。將此等分子之疏水性藉由 UCSF 嵌合軟體解析。圖中，以圓圍繞之區域表示在 CD80 之 DEB 表面中發現的特有疏水性區塊。

第 19 圖展示 CD80L107E 存在下的 PD-1-EC 與 PD-L1 之結合。展示 PD-1-EC、抗 CD80 抗體、CD28-EC 及 CTLA-4-EC，與表現圖中所示之分子的 IIAdL1 細胞之結合強度。

第 20 圖展示 IIAdL1-PD-L1 細胞的 PD-1-EC 結合能力，該 IIAdL1-PD-L1 細胞表現疏水性區塊中之疏水性殘基經胺基酸置換之 CD80。將細胞之 PD-1-EC 結合強度與不具有 CD80 之 IIAdL1-PD-L1 細胞之 PD-1-EC 結合強度比較並展示。

第 21 圖展示 PD-L1Y56A/CD80 及 PD-L1/ CD80L107E 之共免疫沉降的欠缺。WCL：未交聯之細胞溶解物全體。

第 22 圖展示將表現圖中所示之分子的抗原呈現細胞，與表現 PD-1 之 DO11.10 T 細胞(PD-1(+))(左)或 PD-1 缺損之 DO11.10 T 細胞(PD-1KO)(右)共培養時，源自 T 細胞之 IL-2 產生。使用圖中所示之量的抗原胜肽。

第 23 圖展示將第 22 圖上段所示之數據進一步分析的結果。展示經由 PD-L1 及 PDL1Y56A 中介的 PD-1 依存性阻害之比率。

第 24 圖展示將第 22 圖中段及下段所示之數據進一步分析的結果。展示經由圖中所示之分子中介的 PD-1 依存性阻害之比率(0.3μM 抗原胜肽)。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。***p<0.001。

【0013】第 25 圖展示人類 PD-1-EC 及圖中所示之抗體，與表現人類 PD-L1(上段)或人類 PD-L2(下段)及人類 CD80 或人類 CD86 之 IIAdL1 細胞的結合強度。

第 26 圖展示在與表現人類 CD80 之 IIAdL1 細胞共培養、及未共培養時，與表現人類 PD-1-EC 及人類 PD-L1 之 IIAdL1 細胞的結合強度。

第 27 圖展示 IIAdL1 細胞中之人類 CD80 及人類 PD-L1 的共免疫沉降。WCL：未交聯之細胞溶解物全體。

第 28 圖展示以圖中所示之量的抗原胜肽對圖中所示之抗原呈現細胞進行脈衝時，與包含人類 PD-1 之(hPD-1(+))(左) DO11.10 T 細胞、或不含人類 PD-1 之(PD-1KO)(右)DO11.10 T 細胞共培養時，源自 T 細胞之 IL-2 產生。將經由人類 PD-1 中介之 IL-2 產生的阻害比率示於圖中。

第 29 圖展示 PD-1-EC 對於表現人類 PD-L1N63D/G119S 變異體之 IIAdL1 細胞(上段)、及表現人類 CD80、CD80I92E 及 CD80L104E 之 IIAdL1 細胞(下段)的結合強度。

第 30 圖展示將表現圖中所示之分子的抗原呈現細胞，與人類 PD-1 表現之(hPD-1(+))(左) O11.10 T 細胞、或人類 PD-1 缺損之(PD-1KO)(右)DO11.10 T 細胞共培養時，源自 T 細胞之 IL-2 產生。使用圖中所示之量的抗原胜肽。

【0014】第 31 圖展示源自 C57BL/6N-$Cd80^{L107E}$ 小鼠及 C57BL/6N-$Cd274^{Y56A}$ 小鼠之 LPS 活化 BM-DC 以及脾臟 $CD8\alpha^{+}$及 $CD11b^{+}$DC 的 PD-1-EC 結合強度、PD-L1、PD-L2、CD80 表現濃度。

第 32 圖展示在藉由源自 C57BL/6N-$Cd80^{L107E}$ 小鼠及 C57BL/6N-$Cd274^{Y56A}$ 小鼠之 BM-DC 刺激後之 BW-OT-I 細胞(左)及 BW-OT-II 細胞(右)中，以 IL-2 之

濃度來表示經由 PD-1 中介之 IL-2 產生的阻害。

第 33 圖以相對值表示第 32 圖之結果。BW-OT-I 細胞使用 3 pM，BW-OT-II 細胞使用 0.1 μM 之抗原濃度的數據。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。***$p < 0.001$。

第 34 圖展示在藉由源自 C57BL/6N-$Cd80^{L107E}$ 小鼠及 C57BL/6N-$Cd274^{Y56A}$ 小鼠之脾臟 $CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$DC 刺激後之 BW-OT-I 細胞(左)及 BW-OT-II 細胞(右)中，經由 PD-1 中介之 IL-2 產生的阻害。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。*$p < 0.05$；**$p < 0.01$。

第 35 圖展示在不存在順式-PD-L1/CD80 相互作用下之免疫誘導實驗中，可產生 IFN-γ(上段)及 IL-2(下段)的 OVA 特異性 T 細胞未被誘導(n=9)。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。*$p < 0.05$；**$p < 0.01$；***$p < 0.001$。

第 36 圖展示藉由 OVA 及 poly(I:C)之疫苗接種的實驗計畫。

第 37 圖展示藉由 PBS(對照(Ctrl))或 OVA 及 poly(I:C)(Vac)免疫之野生型、$Cd80^{L107E}$、及 $Cd274^{Y56A}$ 小鼠的 E.G7 腫瘤之體積。非對應之學生氏(Student's)兩側 t 檢定。***$p < 0.001$。

第 38 圖展示藉由 PBS(對照)或 OVA 及 poly(I:C)(Vac)免疫之野生型、$Cd80^{L107E}$、及 $Cd274^{Y56A}$ 小鼠中的 E.G7 腫瘤之相對體積(第 15 日)(n≧8)。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。*$p < 0.05$；***$p < 0.001$。

第 39 圖展示藉由經 OVA 脈衝之 BM-DC 的疫苗接種之實驗計畫。

第 40 圖展示藉由源自野生型、$Cd274^{Y56A}$、及 $Cd80^{L107E}$ 小鼠之 BM-DC 免疫的野生型小鼠中之 E.G7 腫瘤的體積。非對應之學生氏的兩側 t 檢定。*$p<0.05$；**$p < 0.01$。

第 41 圖展示以源自野生型、$Cd274^{Y56A}$、及 $Cd80^{L107E}$ 小鼠之 BM-DC 進行免疫後的野生型小鼠中，E.G7 腫瘤的相對體積(第 14 日)(n=7)。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。*$p < 0.05$；**$p < 0.01$。

第 42 圖展示野生型、$Cd274^{Y56A}$、及 $Cd80^{L107E}$ 小鼠之實驗自體免疫性腦脊髓炎(EAE)的臨床分數(n=12)。伴隨 TukeyHSD 事後檢定之二元配置反覆測定分散分析。***$p < 0.001$。

第 43 圖展示 EAE 誘導時，於不存在順式-PD-L1/CD80 相互作用下，IL-17 產生細胞未被誘導(n=8)。伴隨鄧內特之事後檢定的一元配置分散分析。*$p < 0.05$；**$p < 0.01$。

【0015】 第 44 圖展示抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48 係將 mPD-L1 與 mCD80 分離，而使 mPD-L1 之 mPD-1 結合能力回復。

第 45 圖展示抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48 不阻害 mCD80 與 mCTLA-4 之結合，並且，微弱地阻害 mCD80 與 mCD28 之結合。

第 46 圖展示藉由添加抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48，即使於 mCD80 存在下，mPD-L1 亦與 mPD-1 結合，抑制 T 細胞之活性化。

第 47 圖展示藉由抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48 之投予，野生型小鼠之 EAE 症狀實質上減輕。

第 48 圖展示藉由抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48 之投予，野生型小鼠之 EAE 症狀實質上減輕，然而 PD-L1 基因剔除小鼠(圖中，PD-L1 K.O.)方面則未減輕。

第 49 圖展示藉由抗人類 CD80 抗體 TKMF5 之添加，即使於 hCD80 存在下，hPD-L1 亦與 hPD-1 結合，抑制 T 細胞之活化。

第 50 圖展示抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48 對於欠缺 PD-L1 結合能力的 CD80

變異體之結合性低。16-10A1 為市售之抗小鼠 CD80 抗體。

第 51 圖展示抗人類 CD80 抗體 TKMF5 對於欠缺 PD-L1 結合能力的 CD80 變異體之結合性低。2D10 為市售之抗人類 CD80 抗體。

第 52 圖展示抗人類 CD80 抗體 TKMF5 之重鏈可變區域及輕鏈可變區域的胺基酸序列。將各 CDR 以四角形框住表示。

第 53 圖展示抗小鼠 CD80 抗體 TKMG48 之重鏈可變區域及輕鏈可變區域的胺基酸序列。將各 CDR 以四角形框住表示。

【實施方式】

【0016】 在本揭示中，在伴隨數值為「約」之用語時，意指包含其值之±10%的範圍。例如，「約 20」為包含「18 至 22」者。數值之範圍包含兩端點之間的全部數值及兩端點之數值。關於範圍之「約」，適用於其範圍之兩端點。因此，例如「約 20 至 30」設為包含「18 至 33」者。

【0017】 在本揭示中，胺基酸殘基係由以下之簡稱表示。

Ala 或 A：丙胺酸

Arg 或 R：精胺酸

Asn 或 N：天冬醯胺酸

Asp 或 D：天冬胺酸

Cys 或 C：半胱胺酸

Gln 或 Q：麩醯胺

Glu 或 E：麩醯胺酸

Gly 或 G：甘胺酸

His 或 H：組胺酸

Ile 或 I：異白胺酸

Leu 或 L：白胺酸

Lys 或 K：離胺酸

Met 或 M：甲硫胺酸

Phe 或 F：苯丙胺酸

Pro 或 P：脯胺酸

Ser 或 S：絲胺酸

Thr 或 T：蘇胺酸

Trp 或 W：色胺酸

Tyr 或 Y：酪胺酸

Val 或 V：纈胺酸

【0018】 PD-L1(亦稱為 CD274)為 PD-1 之配體，表現於包含樹狀細胞及腫瘤細胞之多種細胞。PD-1 為 T 細胞表面中的代表性免疫檢查點受體，藉由 PD-L1 與 PD-1 結合，可抑制免疫反應。因此，可使用促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質作為免疫抑制劑。本案之發明人等，發現某種抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體可促進 PD-L1 與 PD-1 之結合。

【0019】 PD-L1 與 PD-1 之結合，例如，可藉由使表現 PD-L1 之細胞與包含具有可檢測之標識(例如，螢光標識、發光標識、放射性標識、磁標識等)之 PD-1 之細胞外區域的可溶性胜肽接觸，測定結合於細胞的標識之量而測定。亦可將無標識之可溶性胜肽與結合於該胜肽的具有標識之物質(例如，二次抗體)併用。具體而言，藉由本案之實施例所記載的方法，可測定 PD-L1 與 PD-1 之結合。

【0020】 CD80 係主要表現於樹狀細胞、活化 B 細胞及巨噬細胞之表面，作為存在於 T 細胞表面的 2 種不同蛋白質(CD28 及 CTLA-4)之配體，可控制 T 細胞之活化及生存。雖不受理論限定，然而本案之發明人等揭示藉由存在於相同細胞上之 CD80 與 PD-L1 結合(順式結合)，而阻害 PD-L1 與 T 細胞上的 PD-1 之結合。因此，CD80 與 PD-L1 之順式結合受到阻害時，可促進 PD-L1 與 PD-1 之結合。在某態樣中，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質，係與 CD80 存在於相同細胞上之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質。在某態樣中，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質，係阻害 CD80 與 PD-L1 順式結合的物質。在某態樣中，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質係抗 CD80 抗體。又，在某態樣中，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質係抗 PD-L1 抗體。

【0021】 在本揭示中，「順式(cis)」意指 2 個以上不同蛋白質等分子存在於相同細胞上。例如，順式-PD-L1/CD80 意指 PD-L1 及 CD80 存在於相同細胞上。

在本揭示中，「反式(trans)」意指 2 個以上不同蛋白質等分子存在於不同細胞上。例如，反式-PD-L1/CD80 意指 PD-L1 及 CD80 分別存在於不同細胞上。

【0022】 在本揭示中，「順式結合」意指表現於 1 個細胞表面的 2 個以上不同之膜蛋白質，於其細胞膜上結合、組合或相互作用。CD80 與 PD-L1 之順式結合可在任何細胞產生，例如，可在免疫系之細胞，尤其是抗原呈現細胞，例如，屬於抗原呈現細胞的樹狀細胞、巨噬細胞、B 細胞等之細胞產生。

【0023】 CD80 與 PD-L1 之順式結合，可藉由將表現 CD80 及 PD-L1 之細胞，利用將接近之蛋白質交聯的交聯劑(例如，雙(磺酸基琥珀醯亞胺基)辛二酸酯)處理後，藉由檢驗或測定被交聯之 CD80 與 PD-L1 而確認。經交聯之 CD80 與

PD-L1 可藉由在免疫沉降、ELISA、質量分析解析等之分析系統中，將藉由與 CD80 及 PD-L1 之一者結合之物質(例如抗體)所捕捉的分子，利用與另一者結合之物質(例如抗體)進行檢驗或測定。具體而言，藉由本案之實施例所記載之方法可測定 CD80 與 PD-L1 之順式結合。就與 CD80 結合之物質而言，可列舉 CD28、CTLA-4、抗 CD80 抗體、此等之斷片等。就與 PD-L1 結合之物質而言，可列舉 PD-1、抗 PD-L1 抗體、此等之斷片等。檢驗或測定用之物質，可具有可檢測之標識(例如，螢光標識、發光標識、放射性標識、磁標識等)。

【0024】 在本揭示中，「阻害順式結合」意指包含使順式結合之 CD80 與 PD-L1 解離、及/或防止未順式結合之 CD80 及 PD-L1 進行順式結合。在某實施態樣中，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質係競合阻害 CD80 與 PD-L1 之順式結合。

【0025】 在某實施態樣中，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質，係將高度表現 CD80 及 PD-L1 之培養細胞(例如，於缺損 PD-1 及 PD-L1 之基因的 DO11.10 T 細胞中，於 LTR 啟動子下使 CD80 及 PD-L1 表現的細胞(DOdKO 細胞))，於 10μg/ml 之該物質存在下進行培養時，促進 PD-L1 與 PD-1 之結合至少約 2 倍以上，例如，約 5 倍以上或約 10 倍以上。例如，在促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質為抗 CD80 抗體時，測定結合之例係記載於本案之實施例中。

【0026】 在本揭示中，CD80、PD-L1 及 PD-1 可為任何物種者，典型而言，可列舉哺乳動物(例如，人類、小鼠、大鼠、倉鼠、兔、貓、狗、牛、綿羊、猴等)。其中，以小鼠或人類為較佳，特佳為人類。源自各種生物種之 CD80、PD-L1 及 PD-1 的胺基酸序列，可利用周知之數據庫而容易地取得。人類及小鼠之 CD80 的代表性胺基酸序列，分別登錄為 GenBank 登錄編號 NP_005182(序列編

號 1)及 NP_033985(序列編號 2)。人類及小鼠之 PD-L1 之代表性胺基酸序列，分別登錄為 GenBank 登錄編號 NP_054862(序列編號 3)及 NP_068693(序列編號 4)。人類及小鼠之 PD-1 的代表性胺基酸序列，分別登錄為 GenBank 登錄編號 NP_005009(序列編號 5)及 NP_032824(序列編號 6)。在本揭示中，CD80、PD-L1 及 PD-1，包含彼等之天然存在的對偶基因之產物。

【0027】在某實施態樣中，CD80 與 PD-L1 之順式結合，係經由至少包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸的胺基酸之區域(較佳為包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及第 104 位之白胺酸的胺基酸之區域)，與包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸的胺基酸之區域(較佳為包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及第 119 位之甘胺酸的胺基酸之區域)的結合；或者是，經由至少包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域(較佳為包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及第 107 位之白胺酸的胺基酸之區域)與包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸的胺基酸之區域(較佳為包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及第 58 位之麩胺酸的胺基酸之區域)的結合。上述包含胺基酸之區域，係可由連續之胺基酸殘基構成，亦可由不連續之胺基酸殘基構成。

【0028】在某實施態樣中，抗 CD80 抗體係與包含相當於具有序列編號 1

之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸的胺基酸之區域結合。在較佳之實施態樣中，抗 CD80 抗體係與包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及第 104 位之白胺酸的胺基酸之區域結合。上述包含胺基酸之區域，係可由連續之胺基酸殘基構成，亦可由不連續之胺基酸殘基構成。

【0029】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體係與包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸的胺基酸之區域結合。在較佳實施態樣中，抗 CD80 抗體係與包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及第 107 位之白胺酸的胺基酸之區域結合。上述包含胺基酸之區域係可由連續之胺基酸殘基構成，亦可由不連續之胺基酸殘基構成。

【0030】 在某實施態樣中，抗 PD-L1 抗體係與包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸的胺基酸之區域結合。在較佳實施態樣中，抗 PD-L1 抗體係與包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及第 119 位之甘胺酸的胺基酸之區域結合。上述包含胺基酸之區域係可由連續之胺基酸殘基構成，亦可由不連續之胺基酸殘基構成。

【0031】 在某實施態樣中，抗 PD-L1 抗體係與包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸的胺基酸之區域結合。在較佳實施態樣中，抗 PD-L1 抗體係與包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及第 58 位之麩胺酸的胺基酸之區域結合。上述包含胺基酸之區域係可

由連續之胺基酸殘基構成，亦可由不連續之胺基酸殘基構成。

【0032】「相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸的胺基酸」，意指將某 CD80 之胺基酸序列與序列編號 1 之胺基酸序列以最佳狀態(胺基酸之一致成為最大的狀態)對齊時，與序列編號 1 之第 92 位之異白胺酸一致的該 CD80 中之胺基酸。「相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 104 位之白胺酸的胺基酸」、「相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸的胺基酸」、「相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸的胺基酸」、「相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸」亦同樣地定義。例如，具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 107 位之白胺酸，係分別相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 104 位之白胺酸。

【0033】在本揭示中，成為「抗體」之用語，係以包含單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、多重特異性抗體(例如，雙重特異性抗體)等各種抗體結構的意義使用。抗體之種類無特別限定，例如，可列舉源自小鼠、大鼠、兔、山羊、人類之抗體。就抗體而言，以人類化抗體、人類抗體(完全人類抗體)為較佳。又，就抗體而言，以單株抗體為較佳，更佳為單離之單株抗體。

【0034】在本揭示中，成為「單離之單株抗體」的用語，意指從融合瘤等宿主細胞或其培養上清液中萃取出的複數或無數之成分所含的雜質中，藉由鑑

定、分離及/或精製，成為實質上單一純粹成分之單株抗體。

【0035】 在本揭示中，「抗體」之用語中，亦包含含有抗體之一部分作為構成要素，並且保持與抗原之結合性的分子。例如，雖不被限定，惟，抗體之重鏈及輕鏈可變區域(V_H及 V_L)、$F(ab')_2$、Fab'、Fab、Fv、二硫鍵連結 FV(disulphide-linked FV，sdFv)、單鏈 FV(Single-Chain FV，scFV)、Fab3、雙鏈抗體(Diabody)、三鏈抗體(Triabody)、四鏈抗體(Tetrabody)、微抗體(Minibody)、Bis-scFv、$(scFv)_2$-Fc、完整 IgG(intact-IgG)及此等之聚合物，亦包含於本案之抗體中。

【0036】 抗體之免疫球蛋白類型可依據重鏈恆定區域而決定。就免疫球蛋白類型而言，可列舉 IgA、IgD、IgE、IgG、及 IgM，對應此等之重鏈，分別稱為 α 鏈、δ 鏈、ε 鏈、γ 鏈、及 μ 鏈。可將免疫球蛋白類型進一步分類為子類(同型)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。本說明書中的抗體之免疫球蛋白類型及子類無特別限定。在某實施態樣中，免疫球蛋白類型為 IgG。抗體之輕鏈依據其恆定區域可分為 κ 鏈及 λ 鏈，惟，本說明書中的抗體可具有 κ 鏈及 λ 鏈之任一者。

【0037】 抗體之可變區域，通常以 4 個框架區域(framework region)(亦記載為 FR)中夾著 3 個互補性決定區域(complementarity determining region)(亦記載為 CDR)而構成。此外，在本說明書中，抗體之可變區域之 CDR 與框架所分配的胺基酸位置，係依照 Kabat 而規定(參照 Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., (1987)及(1991))。

【0038】 抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體可分別藉由使用包含 CD80 或 PD-L1 之全體或一部分之胜肽，例如，CD80 或 PD-L1 之細胞外區域之全體或一部分作為免疫原，並且依照一般方法而取得。包含 CD80 或 PD-L1 之全體或一部

分之胜肽，係可依照通常之胜肽合成法，例如藉由基因工程手法或化學合成而製作。

【0039】 多株抗體可藉由「Antibodies: A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989」等所記載之一般方法而製作。具體而言，抗 CD80 多株抗體及抗 PD-L1 多株抗體可分別藉由包含 CD80 或 PD-L1 之全部或一部分之胜肽，將大鼠、小鼠、兔、山羊、馬等哺乳動物進行免疫而製作。

【0040】 單株抗體可藉由製作產生抗體之融合瘤的方法、使用基因工程手法製作包含抗體基因之表現載體，而在細胞表現的方法等周知之方法而取得。

【0041】 分泌單株抗體之融合瘤，可依據 Kohler et al., Nature 256:495, 1975 所記載之方法製作。首先，將免疫原與用以提生抗原性之適當物質(例如，鑰孔笠貝血藍蛋白(Keyhole limpet hemocyanin)或牛血清白蛋白等)、及因應所需添加之免疫賦活劑(弗氏之完全或不完全佐劑等)一起混合，對大鼠、小鼠、兔、山羊、馬等非人類哺乳動物實施免疫。通常，免疫動物以 3 至 10 日間隔進行複數次免疫，以 1 至 100μg 投予屬於免疫原之胜肽。繼而，從經過複數次免疫之免疫動物回收免疫擔當細胞(在免疫動物中具有抗體產生能力之細胞)，使其與沒有自身抗體產生能力之骨髓瘤細胞(例如，源自小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、兔或人類等哺乳動物的細胞)進行細胞融合。在細胞融合方面，使用聚乙二醇法、電融合法等。進一步，依據融合細胞所具有的選擇標記，選擇細胞融合成功之細胞，藉由 ELISA 法、放射免疫檢定、螢光抗體法等確認選擇之細胞所產生之抗體對免疫原的反應性，可得到產生目標單株抗體之融合瘤。將所得到之融合瘤於試管內培養，單株抗體可從培養上清液中單離。又，亦可在小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠或

兔等腹水中等進行生體(in-vivo)內培養，並從腹水中單離。

【0042】 又，單株抗體可藉由從所得到之融合瘤選殖抗體基因，如後述，組入適當表現載體，並於宿主細胞中表現而得到(P.J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY; P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J.W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS)。進一步，使用轉基因動物製作技術，製作於內在性基因組入有作為目標之抗體基因的轉基因動物(例如，牛、山羊、綿羊或豬)，例如，亦可從該轉基因動物之乳液中取得源自該抗體基因的單株抗體。

【0043】 所得到之單株抗體可藉由該領域中周知之方法，例如，藉由將以蛋白質 A 管柱進行之層析、離子交換層析、疏水層析、硫酸銨鹽析法、凝膠過濾、親和性層析等適當地組合而精製。

【0044】 嵌合抗體為包含彼此源自不同序列的抗體，例如，將彼此源自不同可變區域及恆定區域連結而成的抗體。在某實施態樣中，嵌合抗體係由源自人類以外之哺乳動物之抗體的可變區域、及源自人類抗體之恆定區域構成。嵌合抗體可藉由，例如，將編碼源自人類以外之哺乳動物抗體之可變區域的多核苷酸與編碼人類抗體之恆定區域的多核苷酸連結，將其組入表現載體，並將該表現載體導入至宿主使其表現而取得。

【0045】 CDR 為實質上決定抗體之結合特異性的區域，其胺基酸序列富含多樣性。另一方面，構成 FR 之胺基酸序列即使在具有不同結合特異性的抗體之間亦顯示高同源性。因此，藉由 CDR 之移植，可將某抗體之結合特異性移植至其他抗體。

【0046】 人類化抗體一般係由源自人類以外之動物的抗體之 CDR 與源自人類抗體之 FR 及源自人類抗體之恆定區域構成。人類化抗體可藉由將源自人類以外之動物抗體的 CDR 移植至人類抗體而得到。人類化抗體可藉由各種方法製作，惟，就一例而言，可列舉重疊延伸(Overlap Extension) PCR (Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008))。在本方法中，使用與源自人類以外之動物抗體(例如，小鼠抗體)的 CDR、及人類抗體之 FR 的末端具有重疊部分的寡核苷酸作為引子，進行 PCR，合成連結有源自人類以外之動物之抗體的 CDR 與人類抗體之 FR 的多核苷酸。繼而，將所得到之多核苷酸與編碼人類抗體之恆定區域的多核苷酸連結，組入表現載體，使該表現載體導入至宿主中並表現，藉此，可取得人類化抗體。

【0047】 人類化抗體之製作中較佳之 FR 的選擇方法為周知，例如，可使用藉由最佳擬合法(Stfit method)(Sims et al. J. Immunol. 151:2296(1993))選擇出之 FR、或源自人類抗體之輕鏈或重鏈可變區域之特定之亞群之一致序列(Consensus sequence)的 FR(Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285(1992); Presta et al. J. Immunol. 151:2623(1993))。

【0048】 人類抗體，例如，可藉由將人類淋巴球於試管內以期望之抗原進行致敏，繼而使致敏淋巴球與人類骨髓瘤細胞融合而取得(日本特公平 1-59878 號公報)。在屬於融合搭檔之人類骨髓瘤細胞中，可利用例如 U266 等。又，人類抗體亦可藉由將具有人類抗體基因之全部組庫(repertoire)的轉基因動物以期望之抗原免疫而取得(Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117-1125, 2005)。再者，亦已知有使用人類抗體資料庫，藉由平移(panning)而取得人類抗體的技術(Antibody Phage Display: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 178, 2001)。例如，

以人類抗體之可變區域作為單鏈抗體(scFv)，藉由噬菌體顯示法使其於噬菌體之表面表現，選擇與抗原結合之噬菌體，解析所選擇之噬菌體的基因，藉此，可決定編碼與抗原結合之人類抗體之可變區域的 DNA 序列。繼而，將此可變區域序列及人類抗體恆定區域之序列於框內連結，插入至適當之表現載體中，並將該表現載體導入至宿主使其表現，藉此，可取得人類抗體。

【0049】 多重特異性抗體為與至少 2 個不同部位結合之抗體。就多重特異性抗體而言，可列舉雙重特異性抗體、三重特異性抗體等。在某實施態樣中，多重特異性抗體係 CD80 或 PD-L1 與 1 個以上其他抗原結合。多重特異性抗體，例如，可藉由基因工程手法、或藉由識別抗原結合不同的 2 個以上抗體或抗體斷片而製作。

【0050】 抗體斷片，例如，可藉由使用木瓜酵素、胃蛋白酶等蛋白酶將抗體消化而得到。或者是，可藉由將包含編碼抗體斷片之多核苷酸的表現載體導入至宿主細胞，使其表現而得到(例如，Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137; Hudson et al., Nat. Med., (2003) 9, 129-134)。

【0051】 如前述，抗體可藉由將包含編碼其之多核苷酸的表現載體導入細胞中，使其表現而得到。具體而言，使編碼抗體之序列在增強子或啟動子等之表現控制區域下表現的方式構築表現載體，以該表現載體將宿主細胞轉形，使抗體表現。

【0052】 亦即，本揭示又提供編碼抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體之多核苷酸、包含該多核苷酸之表現載體、及包含該多核苷酸或表現載體之轉形細胞。

【0053】 就宿主細胞而言，可使用例如：動物細胞、植物細胞、真菌細胞等真核細胞。就動物細胞而言，可列舉：哺乳類動物細胞(例如，CHO、COS、NIH3T3、骨髓瘤、BHK(小倉鼠腎臟(baby hamster kidney))、HeLa、Vero)、兩棲類動物細胞(例如，非洲爪蟾卵母細胞)、或昆蟲細胞(例如，Sf9、Sf21、Tn5)。就真菌細胞而言，可列舉酵母(例如，酵母菌(Saccharomyces)屬，例如，釀酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae))；絲狀真菌(例如，麴菌(Aspergillus)屬，例如，黑色麴菌(Aspergillus niger))等。又，亦可使用大腸桿菌(E. coli)(例如，JM109、DH5α、HB101 等)、枯草桿菌等原核細胞作為宿主細胞。載體向宿主細胞之導入，例如，可依照磷酸鈣法、DEAE 聚葡萄醣法、電穿孔法、脂質轉染等方法而進行。

【0054】 所得到之抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體與 CD80 或 PD-L1 之結合，可藉由 ELISA 法、螢光抗體法、放射免疫檢定(RIA)、BIACORE(註冊商標)表面電漿共振檢定等而確認。

【0055】 所得到之抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體與 CD80 或 PD-L1 之結合，亦可藉由競合檢定而確認。例如，在對 CD80 的結合中所得到之抗 CD80 抗體是否與已知之抗 CD80 抗體競合，或者是，在對 PD-L1 之結合中所得到之抗 PD-L1 抗體是否與已知之抗 PD-L1 抗體競合，係可藉由使用 FACS 或 ELISA 等調查而確認。就已知之抗 CD80 抗體而言，例如，可使用具有後述之重鏈可變區域、輕鏈可變區域或 CDR 之序列的抗 CD80 抗體。

【0056】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體，以 10^{-7}M 以下或 10^{-8}M 以下，例如 10^{-7}M 至 10^{-15}M、10^{-7}M 至 10^{-13}M、10^{-7}M 至 10^{-9}M、10^{-8}M

至 10^{-15}M、10^{-8}M 至 10^{-13}M、10^{-8}M 至 10^{-9}M、10^{-9}M 至 10^{-12}M、或 10^{-9}M 至 10^{-11}M 之平衡解離常數(KD)與 CD80 或 PD-L1 結合。平衡解離常數可藉由例如生物層(Bio layer)干擾法測定。具體而言，藉由本案之實施例中所記載的方法，可測定平衡解離常數。

【0057】 較佳為抗 CD80 抗體實質上不阻害 CD80 與 CTLA-4 之結合。CD80 與 CTLA-4 之結合，例如，藉由使表現 CD80 之細胞與包含具有可檢測之標識(例如，螢光標識、發光標識、放射性標識、磁標識等)的 CTLA-4 之細胞外區域的可溶性胜肽接觸，並測定與細胞結合之標識之量而測得。亦可將無標識之可溶性胜肽與該胜肽結合，與具有標識之物質(例如，二次抗體)併用。將與細胞結合之標識之量，於抗 CD80 抗體存在下及不存在下比較，可確認 CD80 與 CTLA-4 之結合是否會受到阻害或其阻害程度。在此文中，「沒有實質上地阻害結合」意指對於細胞表面表現之 CD80，在充分量(例如，約 10μg/ml)之抗 CD80 抗體存在下，CD80 與 CTLA-4 之結合量分別為抗 CD80 抗體不存在下之結合量的約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%以上(亦可超過 100%)。

【0058】 又，可使用不強烈地阻害 CD80 與 CD28 之結合的抗 CD80 抗體。CD80 與 CD28 之結合，例如，藉由使表現 CD80 之細胞，與包含具有可檢測之標識(例如，螢光標識、發光標識、放射性標識、磁標識等)之 CD28 之細胞外區域的可溶性胜肽接觸，測定與細胞結合的標識之量而測得。也可將無標識之可溶性胜肽、及與該胜肽結合並且具有標識的物質(例如，二次抗體)併用。將與細胞結合之標識之量，於抗 CD80 抗體存在下及不存在下比較，可確認 CD80 與 CD28 之結合是否受到阻害或其阻害程度。此文中，「未強烈地阻害結合」意指對於細

胞表面表現之 CD80，在充分量(例如，約 10μg/ml)之抗 CD80 抗體存在下，CD80 與 CD28 之結合量分別為抗 CD80 抗體不存在下之結合量的約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%以上(亦可超過 100%)。

【0059】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，其係包含序列編號 7 之胺基酸序列中的 CDR1、CDR2、及 CDR3、或序列編號 7 之胺基酸序列；及/或

輕鏈可變區域，其係包含序列編號 8 之胺基酸序列中的 CDR1、CDR2、及 CDR3、或序列編號 8 之胺基酸序列。

【0060】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，其係包含序列編號 15 之胺基酸序列中的 CDR1、CDR2、及 CDR3、或序列編號 15 之胺基酸序列；及/或

輕鏈可變區域，其係包含序列編號 16 之胺基酸序列中的 CDR1、CDR2、及 CDR3、或序列編號 16 之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

【0061】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，其係含有：包含具有與序列編號 9 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR1，

包含具有與序列編號 10 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR2，及

包含具有與序列編號 11 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性的序列之 CDR3；及/或

輕鏈可變區域，其係含有：包含具有與序列編號 12 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上、進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR1，

包含具有與序列編號 13 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR2，及

包含具有與序列編號 14 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性的序列之 CDR3。

【0062】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，其係含有：包含具有與序列編號 17 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR1，

包含具有與序列編號 18 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR2，及

包含具有與序列編號 19 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性的序列之 CDR3；及/或

輕鏈可變區域，其係含有：包含具有與序列編號 20 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR1，

包含具有與序列編號 21 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的 CDR2，及

包含具有與序列編號 22 之序列 80%以上，較佳為 85%以上，更佳為 90%以上，進一步更佳為 95%以上之序列相同性的序列之 CDR3。

【0063】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，其係含有：包含在序列編號 9 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR1，

包含在序列編號 10 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR2，及

包含在序列編號 11 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列之 CDR3；及/或

輕鏈可變區域，其係含有：包含在序列編號 12 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR1，

包含在序列編號 13 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR2，及

包含在序列編號 14 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列之 CDR3。

【0064】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，其係含有：包含在序列編號 17 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR1，

包含在序列編號 18 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR2，及

包含在序列編號 19 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列之 CDR3 的重鏈可變區域；及/或

輕鏈可變區域，其係含有：包含在序列編號 20 之序列中包含 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR1，

包含在序列編號 21 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列的 CDR2，及

包含在序列編號 22 之序列中 0、1 或 2 個胺基酸經刪除、置換、或附加之序列之 CDR3。

【0065】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：重鏈可變區域，其係含有包含序列編號 9 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 10 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 11 之胺基酸序列之 CDR3；及/或輕鏈可變區域，其係含有包含序列編號 12 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 13 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 14 之胺基酸序列之 CDR3。在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：重鏈可變區域，其係含有序列編號 9 之胺基酸序列所構成的 CDR1、序列編號 10 之胺基酸序列所構成的 CDR2、及序列編號 11 之胺基酸序列所構成的 CDR3；及/或輕鏈可變區域，其係含有序列編號 12 之胺基酸序列所構成的 CDR1、序列編號 13 之胺基酸序列所構成的 CDR2、及序列編號 14 之胺基酸序列所構成的 CDR3 之輕鏈可變區域。

【0066】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：重鏈可變區域，其係含有包含序列編號 17 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 18 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 19 之胺基酸序列之 CDR3 的重鏈可變區域；及/或輕鏈可變區域，其係含有包含序列編號 20 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 21 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 22 之胺基酸序列之 CDR3 的輕鏈可變區域。在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：重鏈可變區域，其係含有序列編號 17 之胺基酸序列所構成的 CDR1、序列編號 18 之胺基酸序列所構成的 CDR2、及序列編號 19 之胺基酸序列所構成的 CDR3；及/或輕鏈可變區域，其係含有序

列編號 20 之胺基酸序列所構成的 CDR1、序列編號 21 之胺基酸序列所構成的 CDR2、及序列編號 22 之胺基酸序列所構成的 CDR3。

【0067】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：包含與序列編號 7 之胺基酸序列具有 80%以上、較佳為 85%以上、更佳為 90%以上、進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的重鏈可變區域，及/或包含與序列編號 8 之胺基酸序列具有 80%以上、較佳為 85%以上、更佳為 90%以上、進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的輕鏈可變區域。在進一步實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：包含在序列編號 7 之胺基酸序列中 0 至 5 個胺基酸經刪除、置換、或附加之胺基酸序列的重鏈可變區域；及/或包含在序列編號 8 之胺基酸序列中 0 至 5 個胺基酸經刪除、置換、或附加之胺基酸序列的輕鏈可變區域。此等實施態樣中，包含重鏈可變區域及/或輕鏈可變區域之 CDR 沒有發生改變的抗 CD80 抗體，具體而言，抗 CD80 抗體係包含：重鏈可變區域，其係含有包含序列編號 9 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 10 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 11 之胺基酸序列之 CDR3；及/或包含輕鏈可變區域，其係含有序列編號 12 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 13 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 14 之胺基酸序列的 CDR3。

【0068】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：含有與序列編號 15 之胺基酸序列具有 80%以上、較佳為 85%以上、更佳為 90%以上、進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的重鏈可變區域；及/或含有與序列編號 16 之胺基酸序列具有 80%以上、較佳為 85%以上、更佳為 90%以上、進一步更佳為 95%以上之序列相同性之序列的輕鏈可變區域。在進一步實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：包含在序列編號 15 之胺基酸序列中 0 至 5 個胺基酸經刪除、置換、或附加

之胺基酸序列的重鏈可變區域；及/或包含在序列編號 16 之胺基酸序列中 0 至 5 個胺基酸經刪除、置換、或附加之胺基酸序列的輕鏈可變區域。在此等實施態樣中，包含重鏈可變區域及/或輕鏈可變區域之 CDR 沒有發生改變的抗 CD80 抗體，具體而言，抗 CD80 抗體係包含：重鏈可變區域，其係含有包含序列編號 17 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 18 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 19 之胺基酸序列之 CDR3；及/或輕鏈可變區域，其係含有包含序列編號 20 之胺基酸序列的 CDR1、包含序列編號 21 之胺基酸序列的 CDR2、及包含序列編號 22 之胺基酸序列的 CDR3。

【0069】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：含有序列編號 7 之胺基酸序列的重鏈可變區域及/或含有序列編號 8 之胺基酸序列的輕鏈可變區域。在進一步實施態樣中，抗 CD80 抗體包含序列編號 7 之胺基酸序列所構成的重鏈可變區域及/或序列編號 8 之胺基酸序列所構成的輕鏈可變區域。

【0070】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：包含序列編號 15 之胺基酸序列的重鏈可變區域及/或包含序列編號 16 之胺基酸序列的輕鏈可變區域。在進一步實施態樣中，抗 CD80 抗體包含序列編號 15 之胺基酸序列所構成的重鏈可變區域及/或序列編號 16 之胺基酸序列所構成的輕鏈可變區域。

【0071】 在某實施態樣中，抗 CD80 抗體包含：包含上述輕鏈可變區域之 CDR1 至 3 的重鏈可變區域及/或包含上述重鏈可變區域之 CDR1 至 3 的輕鏈可變區域。

【0072】 在某實施態樣中，對於與 CD80 之結合，抗 CD80 抗體係與上述之序列所特定的抗 CD80 抗體之任一者競合的抗體。競合可藉由例如上述之競合檢定而確認。

【0073】「序列相同性」可藉由涵蓋比較對象之序列的全區域，比較以最佳狀態對齊之 2 個序列而決定。其中，比較對象之序列，可在 2 個序列之最佳對齊中，具有附加或刪除(例如，間隙等)。序列相同性可使用公共數據庫(例如，DDBJ(http://www.ddbj.nig.ac.jp))所提供的 FASTA、BLAST、CLUSTAL W 等之程式算出。或者亦可使用市售之序列解析軟體(例如，Vector NTI(註冊商標)軟體、GENETYX(註冊商標) ver. 12)而求得。

【0074】就改變胺基酸序列，而得到具有期望特性之抗體的方法而言，已知有各種方法。例如，結合親和性經改善之變異體，可藉由依據噬菌體顯示之方法而得到。在此方法中，例如，進行藉由丙胺酸掃描變異導入法鑑定影響抗體與抗原之相互作用的胺基酸殘基，或者是，解析抗原抗體複合體之結晶結構，鑑定抗體與抗原間之接觸點等，決定變異導入部位。該部位之胺基酸經改變的變異體藉由易錯 PCR(error pronePCR)或部位特異性變異導入等而製作，並藉由篩選所得到之變異體之資料庫，可得到具有期望特性的變異體。

【0075】抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體，可改變 Fc 區域之糖鏈。就糖鏈經改變之抗體而言，可列舉例如：缺失附加於糖鏈之岩藻糖的抗體(美國專利公開第 2003/0157108 號)、含有具有二等分 N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)之糖鏈的抗體(國際公開第 2003/011878 號)等。

【0076】為了例如抗體之半衰期延長、或安定性之改善等，抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體亦可與聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚環氧烷或聚乙二醇與聚丙二醇之共聚物等之聚合物結合。

【0077】促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質，若對對象投予有效量，則可抑制免疫。因此，可提供包含選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體之促進 PD-L1

與 PD-1 結合之物質作為有效成分的免疫抑制劑。

【0078】 由於本說明書所揭示的抗體或免疫抑制劑之毒性低，因此，可安全地使用為醫藥品。

【0079】 [醫藥品之適用]

本說明書所揭示之抗體或免疫抑制劑，可使用於以免疫亢進為特徵的疾病之預防及/或治療。因此，在某態樣中，提供一種以免疫之亢進為特徵之疾病之預防及/或治療劑，其係包含選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體的促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質作為有效成分。

【0080】 以免疫之亢進為特徵的疾病包含自體免疫疾病、過敏疾病及對移植物之宿主病。在自體免疫疾病方面，例如，包含白塞氏病(Behcet's disease)、全身性紅斑狼瘡、多發性硬化症(全身性硬皮症、進行性全身性硬化症)、硬皮症、多發性肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎(結節性多發動脈炎、顯微鏡性多發血管炎)、大動脈炎症候群(高安動脈炎)、惡性關節風濕症、關節風濕症、幼年性特發性關節炎、韋格納肉芽腫症、混合性結締組織病、薛格連症候群、成人絲蒂爾氏病、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、高根氏症候群、RS3PE、側頭動脈炎、風濕症性多發肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質抗體症候群、嗜酸性粒細胞性肌膜炎、IgG4 關連疾病(例如，原發性硬化性膽管炎、自體免疫性胰炎等)、格林巴利症候群(Guillain-Barre syndrome)、重症肌無力症、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、原發性膽汁性肝硬變、大動脈炎症候群、古德帕絲卻(Goodpasture)症候群、急速進行性絲球體腎炎、巨母紅血球性貧血、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性嗜中性粒細胞減少症、特發性血小板減少性紫斑病、巴塞杜氏病(甲狀腺功能亢進症)、橋本病、自體免疫性副腎功能不全、原發性甲狀腺功能降低

症、特發性艾迪生氏病(慢性副腎皮質功能降低症)、I 型糖尿病、緩慢進行性 I 型糖尿病(成人潛在性自體免疫性糖尿病)、慢性圓板狀紅斑狼瘡、局部性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、天皰瘡、類天皰瘡、妊娠性皰疹、線狀 IgA 水皰性皮膚症、後天性表皮水皰症、圓形脫毛症、白斑、尋常性白斑、異位性皮膚炎、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓性多發神經炎、類肉瘤病(sarcoidosis)、水皰性類天皰瘡、巨細胞性動脈炎、肌萎縮性側索硬化症、嗜酸性粒細胞性多發血管炎性肉芽腫症、原田病、自體免疫性視神經症、特發性無精子症、習慣性流產、炎症性腸疾病(例如，潰瘍性大腸炎、克羅恩氏病)及腹腔疾病等。在某實施態樣中，自體免疫疾病為 I 型糖尿病、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡或關節風濕症。在某實施態樣中，自體免疫疾病為多發性硬化症。在過敏疾病中，亦包含例如，哮喘、異位性皮膚炎、鼻炎、結膜炎及花粉症等。

【0081】 本說明書中所使用的「進行治療」或「治療」，意指在具有疾病之對象中，將疾病之原因減輕或除去，使其進展延遲或停止，將其症狀減輕、緩和、改善或除去，及/或抑制其症狀之惡化。

【0082】 本說明書所使用的「進行預防」或「預防」，意指在對象中，特別是疾病發病之可能性雖高，但仍未發病之對象中，防止疾病之發病或減低疾病發病之可能性，包含預防復發。有自體免疫疾病或過敏疾病發病之可能性，但尚未發病之對象包含例如：免疫亢進之對象、具有自體免疫疾病或過敏疾病之遺傳性因素的對象、過去罹患自體免疫疾病或過敏疾病後治癒之對象。有對移植物之宿主病發病的可能性，但尚未發病之對象包含接受臟器移植之對象。

【0083】 就以免疫抑制劑或免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療劑之投予對象而言，可列舉動物，典型而言，可舉處哺乳動物(例如，人類、小鼠、

大鼠、倉鼠、兔、貓、狗、牛、綿羊、猴等)，特佳為人類。再者，較佳對象係免疫抑制或上述預防及/或治療為必須的對象，蝶式上述治療為必須之對象。

【0084】 有效成分之投予量可依據投予方法、投予對象之年齡、體重、健康狀態等而適當地選擇。例如，成人每日，將 10μg/kg 至 100mg/kg、100μg/kg 至 10mg/kg 或 1mg/kg 至 10mg/kg，於 1 日 30 分鐘至 24 小時之範圍期間持續投予，或亦可以 1 日投予 1 次至數次，或 1 日或數日、1 週或數週投予 1 次至數次，例如 1 至 3 週投予 1 次，然而不以此為限。投予方法亦可隨投予對象之年齡、體重、健康狀態等而適當地選擇。投予方法可為經口投予，亦可為非經口投予，而以非經口投予為較佳。就非經口投予而言，可列舉皮下投予、皮內投予、腹腔內投予、肌肉內投予、靜脈內投予等，而以靜脈內投予為較佳。

【0085】 免疫抑制劑或以免疫之亢進為特徵之疾病的預防及/或治療劑，可依照常法而製劑化。製劑可包含製劑上因應所需添加的醫藥上可容許之各種製劑用物質。製劑用物質可依據製劑之劑型而適當地選擇，例如，可列舉：緩衝劑、界面活性劑、穩定化劑、防腐劑、賦形劑、稀釋劑、添加劑、崩散劑、結合劑、被覆劑、潤滑劑、滑澤劑、可溶化劑等。例如，免疫抑制劑可作為注射劑或輸液而製劑化。注射劑或輸液可為滅菌水溶液、懸浮液或乳化液等態樣，或者可為了於滅菌之液體溶解、懸浮或乳化使用的固體製劑或凍結乾燥劑之態樣。滅菌之液體，例如，可為注射用水、生理食鹽水、葡萄糖溶液或等張液等。又，可以有效成分持續釋放或控制釋放之方式，將免疫抑制劑製劑化。此等製劑之製造方法為本技術領域中所周知。

【0086】 製劑可包含藥學上可容許之載劑。在本揭示中，「藥學上可容許之載劑」包含在與有效成分組合之情況，可保持其成分之生物學活性而與對象之

免疫系統無反應性的任何物質。可列舉例如：穩定劑、溶解輔助劑、懸浮化劑、乳化劑、無痛化劑、緩衝劑、保存劑、pH 調整劑及抗氧化劑等。就安定劑而言，可使用例如：各種胺基酸、白蛋白、球蛋白、明膠、甘露醇、葡萄糖、聚葡萄醣、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、抗壞血酸、亞硫酸氫鈉、硫代硫酸鈉、乙底酸鈉、檸檬酸鈉、二丁基羥基甲苯等。就溶解輔助劑而言，可使用例如：醇(例如，乙醇等)、多元醇(例如，丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性界面活性劑(例如，Polysorbate 20(註冊商標)、Polysorbate 80(註冊商標)、HCO-50 等)等。就懸浮化劑而言，可使用例如：單硬脂酸甘油、單硬脂酸鋁、甲基纖維素、羧基甲基纖維素、羥基甲基纖維素、月桂基硫酸鈉等。就乳化劑而言，可使用例如：阿拉伯膠、海藻酸鈉、黃蓍膠等。就無痛化劑而言，可使用例如：苄醇、氯丁醇、山梨醇等。就緩衝劑而言，可使用例如：磷酸緩衝液、乙酸緩衝液、硼酸緩衝液、碳酸緩衝液、檸檬酸緩衝液、TRIS 緩衝液、麩胺酸緩衝液、ε 胺基己酸緩衝液等。就保存劑而言，可使用例如：對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、對羥基苯甲酸丁酯、氯丁醇、苄醇、苯札氯銨、去氫乙酸鈉、乙底酸鈉、硼酸、硼砂等。就防腐劑而言，可使用例如：苯札氯銨、對羥基苯甲酸、氯丁醇等。就 pH 調整劑而言，可使用例如：鹽酸、氫氧化鈉、磷酸、乙酸等。就抗氧化劑而言，可使用例如：(1)如抗壞血酸、半胱胺酸氫氯化物、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉等水溶性抗氧化劑；(2)如棕櫚酸抗壞血酯、丁基化羥基茴香醚、丁基化羥基甲苯、卵磷酯、沒食子酸丙酯、α-生育酚等油溶性抗氧化劑；及(3)如檸檬酸、伸乙基二胺四乙酸、山梨醇、酒石酸、磷酸等金屬螯合劑等。

【0087】 注射劑或用於點滴之輸液，可在其最後步驟中進行滅菌或藉由無菌操作法，例如，以過濾器等過濾而滅菌，繼而充填於無菌容器中而製造。又，

注射劑或用於點滴之輸液，亦可將真空乾燥及凍結乾燥得到之無菌粉末(可包含藥學上可容許之載劑的粉末)，於使用時溶解在適當溶劑中而使用。

【0088】 以免疫抑制劑或免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療劑，可單獨使用，或進一步與 1 種以上之進一步的有效成分，尤其是，用以抑制免疫之有效成分併用。將成分「併用」，意指不僅含有全部成分之投予劑型的使用及分別含有各成分之投予劑型之組合的使用，亦可在彼等用於免疫之抑制或治療及/或預防以免疫之亢進為特徵的疾病而使用的範圍，將各成分同時投予，或將任一種成分延遲投予。在將任一種成分延遲投予時，可為將各成分同時投予的期間。亦可將 2 種以上之有效成分進一步併用。藉由其併用，例如，可補足其他有效成分之預防及/或治療之效果，或者維持及/或減低投予量或投予次數。在適於併用之有效成分方面，例如，包含抗炎症劑、抗菌劑、抗真菌劑、抗病毒劑、免疫抑制劑、分子標靶藥等。

【0089】 例如，在將本發明之免疫抑制劑或以免疫之亢進為特徵之疾病的預防及/或治療劑適用於 I 型糖尿病之預防及/或治療時，可與選自胰島素製劑(例如，人類胰島素、甘精胰島素(insulin glargine)、賴脯胰島素(insulin lispro)、地特胰島素(insulin detemir)、門冬胰島素(insulin aspart)等)、磺醯基尿素劑(例如，格列本脲(glibenclamide)、格列齊特(gliclazide)、格列美脲(glimepiride)等)、速效型胰島素分泌促進藥(例如，那格列奈(nateglinide)等)、雙胍製劑(例如，二甲雙胍(metformin)等)、胰島素抵抗性改善藥(例如，吡格列酮(pioglitazone)等)、α-葡萄糖苷酶抑制藥(例如，阿卡波糖(acarbose)、伏格列波糖(voglibose)等)、糖尿病性神經症治療藥(例如，依帕司他(epalrestat)、美西律(mexiletine)、咪達普利(imidapril)等)、GLP-1 類似物製劑(例如，利拉魯胜肽(liraglutide)、艾塞那胜肽

(exenatide)、利西拉來(lixisenatide)等)及 DPP-4 阻害劑(例如，西他列汀(sitagliptin)、維格列汀(vildagliptin)、阿格列汀(alogliptin)等)等中之任一種以上之藥劑組合而使用。

【0090】 又，例如，在將本發明之免疫抑制劑或以免疫亢進為特徵的疾病之預防及/或治療劑適用於多發性硬化症之預防及/或治療時，可與選自類固醇藥(例如，乙酸可體松、氫化可體松、磷酸氫化可體松鈉、琥珀酸氫化可體松鈉、乙酸氟氫可體松、潑尼松龍(prednisolone)、乙酸潑尼松龍、琥珀酸潑尼松龍鈉、丁基乙酸潑尼松龍、磷酸潑尼松龍鈉、乙酸鹵潑尼松(halopredone)、甲基潑尼松龍、乙酸甲基潑尼松龍、琥珀酸甲基潑尼松龍鈉、曲安西龍(triamcinolone)、乙酸曲安西龍、曲安西龍丙酮化物、地塞米松(dexamethasone)、乙酸地塞米松、磷酸地塞米松鈉、棕櫚酸地塞米松、乙酸對甲米松、倍他米松(betamethasone)等)、干擾素 β-1a、干擾素 β-1b、乙酸格拉替雷(glatiramer)、米托蒽醌(mitoxantrone)、硫唑嘌呤(azathioprine)、環磷醯胺、環孢黴素(cyclosporine)、甲胺蝶呤(methotrexate)、克拉屈濱(cladribine)、副腎皮質刺激荷爾蒙(ACTH)、促腎上腺皮質激素(corticotropin)、咪唑啉鹼(mizoribine)、他克莫司(tacrolimus)、芬戈莫德(fingolimod)、阿來珠單抗(alemtuzumab)等之任一種以上藥劑組合使用。

【0091】 又，例如，在將本發明之免疫抑制劑或以免疫之亢進為特徵之疾病的預防及/或治療劑適用於全身性紅斑狼瘡之預防及/或治療時，可與選自類固醇藥(例如，上述記載之類固醇藥)、其他免疫抑制劑(例如，環孢菌素、他克莫司、芬戈莫德等)及貝利木單抗(belimumab)的任一種以上之藥劑組合使用。

【0092】 又，例如，在將本發明之免疫抑制劑或以免疫之亢進為特徵之疾病的預防及/或治療劑適用於關節風濕症之預防及/治療時，可將選自類固醇藥(例

如，上述記載之類固醇藥)、抗風濕症藥(例如，甲胺蝶呤、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、布西拉明(bucillamine)、來氟米特(leflunomide)、咪唑立濱，他克莫司等)或抗細胞激素藥(例如，英夫利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、托珠單抗(tocilizumab)、依那西普(etanercept)、戈利木單抗(golimumab)及塞妥珠單抗(certolizumab)等)及阿巴西普(abatacept)等的任一種以上之藥劑組合使用。

【0093】 在適用於其他自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病之預防及/或治療時，本發明之免疫抑制劑或以免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療劑與上述記載之其他藥劑的任一種以上組合使用。

【0094】 在某態樣中，提供一種免疫之抑制方法，其包含：將有效量之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質或包含該物質之免疫抑制劑投予至需要免疫抑制的對象，其中，該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

本說明書中的「有效量」，意指能在對象中發揮抑制免疫之效果的量。

在某態樣中，提供一種為了在免疫抑制中使用之促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質或包含該物質的免疫抑制劑，其中該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

在某態樣中，提供一種促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質或包含該物質之免疫抑制劑的用途，係用於抑制免疫之醫藥組成物之製造，該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

【0095】 在某態樣中，提供一種以免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療方法，其包含將有效量之促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質或包含該物質之免疫抑制劑投予至需要其之對象，其中該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

在某態樣中，提供一種促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質或包含該物質之免疫抑制劑，其係在以免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療中使用，其中該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

在某態樣中，提供一種促進 PD-L1 與 PD-1 之結合的物質的用途或包含該物質之免疫抑制劑，係用於以免疫之亢進為特徵之疾病的預防及/或治療劑的製造，其中該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

【0096】 本案提供例如下述之實施態樣。

[1-1]一種免疫抑制劑，其包含促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質，該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

[1-2]如前述[1-1]記載之免疫抑制劑，其中，該物質係促進與 CD80 存在於相同細胞上之 PD-L1 與 PD-1 的結合。

[1-3]如前述[1-1]或[1-2]記載之免疫抑制劑，其中，該物質促進約 2 倍以上的 PD-L1 與 PD-1 之結合。

[1-4]如前述[1-1]至[1-3]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，PD-1 為存在於 T 細胞上者。

[1-5]如前述[1-1]至[1-4]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該物質為抗 CD80 抗體。

[1-6]如前述[1-5]記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體為以 10^{-7}M 以下之平衡解離常數與 CD80 結合者。

[1-7]如前述[1-5]或[1-6]記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體阻害 CD80 與 PD-L1 之順式結合。

[1-8]如前述[1-7]記載之免疫抑制劑，其中，包含相當於具有序列編號 1 之胺

基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域，與包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸之胺基酸的區域中介而結合，或者是，

順式結合為至少經由包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域，與包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域中介而結合。

[1-9]如前述[1-5]至[1-8]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體係與下列區域結合：包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域、或包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域。

[1-10]如前述[1-5]至[1-9]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體實質上不阻害 CD80 與 CTLA-4 之結合。

[1-11]如前述[1-5]至[1-10]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體不強烈地阻害 CD80 與 CD28 之結合。

[1-12]一種免疫抑制劑，其包含抗 CD80 抗體，該抗 CD80 抗體促進與 CD80 存在於相同細胞上之 PD-L1 及 PD-1 之結合，且不強烈地阻害 CD80 與 CD28 之結合。

【0097】 [1-13]如前述[1-5]至[1-12]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：

(1)包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺

基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；

(2)包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；

(3)包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；或

(4)包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變

區域。

[1-14]如前述[1-5]至[1-13]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：

包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域。

[1-15]如前述[1-5]至[1-13]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：

包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 20 之胺基酸序列之輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列之輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域。

[1-16]如前述[1-5]至[1-14]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：包含具有與序列編號 7 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的重鏈可變區域、及包含具有與序列編號 8 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

[1-17]如前述[1-5]至[1-13]及[1-15]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗

CD80 抗體包含：包含具有與序列編號 15 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的重鏈可變區域、及包含具有與序列編號 16 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

[1-18]如前述[1-5]至[1-12]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，對於與 CD80 之結合，該抗 CD80 抗體係與前述[1-13]至[1-17]中任一項記載之抗體競合。

【0098】[1-19]如前述[1-1]至[1-4]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該物質為抗 PD-L1 抗體。

[1-20]如前述[1-19]記載之免疫抑制劑，其中，該抗 PD-L1 抗體為以 10^{-7}M 以下之平衡解離常數與 PD-L1 結合者。

[1-21]如前述[1-19]或[1-20]記載之免疫抑制劑，其中，該抗 PD-L1 抗體阻害 PD-L1 與 CD80 之順式結合。

[1-22]如前述[1-21]記載之免疫抑制劑，其中，順式結合係至少經由相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸的胺基酸、及相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸的胺基酸中介而結合，或者是，

順式結合係至少經由相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸的胺基酸、及相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸的胺基酸中介而結合。

[1-23]如前述[1-19]至[1-22]中任一項記載之免疫抑制劑，其中，該抗 PD-L1 抗體係經由下列胺基酸的區域中介而結合：包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸之胺基酸

的區域、或包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域。

【0099】 [1-24]如前述[1-1]至[1-23]中任一項記載之免疫抑制劑，其係用以預防及/或治療自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病。

[1-25]一種方法，其為預防及/或治療自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病的方法，其包含對需要其之對象投予有效量的前述[1-1]至[1-23]中任一項記載之免疫抑制劑。

[1-26]如前述[1-1]至[1-23]中任一項記載之免疫抑制劑，其係用於自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病之預防及/或治療中之使用。

[1-27]一種前述[1-1]至[1-23]中任一項記載之免疫抑制劑的用途，其係用以製造自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病之預防及/或治療劑。

【0100】 [2-1]一種抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體，其促進 PD-L1 與 PD-1 之結合。

[2-2]如前述[2-1]記載之抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體，其促進與 CD80 存在於相同的細胞上 PD-L1 與 PD-1 之結合。

[2-3]如前述[2-1]或[2-2]記載之抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體，其促進約 2 倍以上的 PD-L1 與 PD-1 之結合。

[2-4]如前述[2-1]至[2-3]中任一項記載之抗 CD80 抗體或抗 PD-L1 抗體，其中，PD-1 為存在於 T 細胞上者。

[2-5]如前述[2-1]至[2-4]中任一項記載之抗體，其為抗 CD80 抗體。

[2-6]如前述[2-5]記載之抗體，其係以 10^{-7}M 以下之平衡解離常數與 CD80 結合。

[2-7]如前述[2-5]或[2-6]記載之抗體，其阻害 CD80 與 PD-L1 之順式結合。

[2-8]如前述[2-7]記載之抗體，其中，順式結合係至少經由包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域、及包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺醯之胺基酸的區域中介而結合，或者是，

順式結合係至少經由包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域，及包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域中介而結合。

[2-9]如前述[2-5]至[2-8]中任一項記載之抗體，其與下列胺基酸的區域結合：包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域、或包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域。

[2-10]如前述[2-5]至[2-9]中任一項記載之抗體，其實質上不阻害 CD80 與 CTLA-4 之結合。

[2-11]如前述[2-5]至[2-10]中任一項記載之抗體，其不強烈地阻害 CD80 與 CD28 之結合。

[2-12]一種抗 CD80 抗體，其促進與 CD80 存在於相同細胞上之 PD-L1 與 PD-1 的結合，且不強烈地阻害 CD80 與 CD28 之結合。

【0101】 [2-13]如前述[2-5]至[2-12]中任一項記載之抗體，其包含：

(1)包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺

基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；

(2)包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；

(3)包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；或

(4)包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變

區域。

【0102】 [2-14]如前述[2-5]至[2-13]中任一項記載之抗體，其包含：包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域。

[2-15]如前述[2-5]至[2-13]中任一項記載之抗體，其包含：包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域。

[2-16]如前述[2-5]至[2-14]中任一項記載之抗體，其中，該抗 CD80 抗體包含：包含具有與序列編號 7 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的重鏈可變區域，及包含具有與序列編號 8 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

[2-17]如前述[2-5]至[2-13]及[2-15]中任一項記載之抗體，其中，該抗 CD80 抗體包含：包含具有與序列編號 15 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的重鏈可變區域及包含具有與序列編號 16 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

[2-18]如前述[2-1]至[2-12]中任一項記載之抗體，其對於與 CD80 之結合，係

與前述[2-13]至[2-17]中任一項記載之抗體競合。

【0103】 [2-19]如前述[2-1]至[2-4]中任一項記載之抗體，其為抗 PD-L1 抗體。

[2-20]如前述[2-19]記載之抗體，其係以 10^{-7}M 以下之平衡解離常數與 PD-L1 結合。

[2-21]如前述[2-19]或[2-20]記載之抗體，其阻害 PD-L1 與 CD80 之順式結合。

[2-22]如前述[2-21]記載之抗體，其中，順式結合係至少經由包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域，及包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸之胺基酸的區域中介而結合，或者是，

順式結合係至少經由包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域，及包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域中介而結合。

[2-23]如前述[2-19]至[2-22]中任一項記載之抗體，其係與下列胺基酸的區域中介而結合：包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸之胺基酸的區域、或包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域。

【0104】 [2-24]一種抗 CD80 抗體，其包含：

(1)包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺

基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；

(2)包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；

(3)包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域；或

(4)包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域、及

包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變

區域。

【0105】 [2-25]如前述[2-24]記載之抗體，其包含：包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域。

[2-26]如前述[2-24]記載之抗體，其包含：包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3 的重鏈可變區域；及

包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列之輕鏈 CDR3 的輕鏈可變區域。

[2-27]如前述[2-24]或[2-25]記載之抗體，其中，該抗 CD80 抗體包含：包含具有與序列編號 7 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的重鏈可變區域，及包含具有與序列編號 8 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

[2-28]如前述[2-24]或[2-26]記載之抗體，其中，該抗 CD80 抗體包含：包含具有與序列編號 15 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的重鏈可變區域，及包含具有與序列編號 16 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

[2-29]一種抗 CD80 抗體，其對於與 CD80 之結合，係與前述[2-24]至[2-28]

中任一項記載的抗體競合。

[2-30]一種抗 CD80 抗體，其係與下列胺基酸的區域結合：包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域、或包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域。

[2-31]如前述[2-24]至[2-30]中任一項記載之抗體，其係以 10^{-7}M 以下之平衡解離常數與 CD80 結合。

[2-32]一種抗 PD-L1 抗體，其與下列胺基酸的區域結合：包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸之胺基酸的區域、或包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域。

[2-33]如前述[2-32]記載之抗體，其係以 10^{-7}M 以下之平衡解離常數與 PD-L1 結合。

[2-34]如前述[2-1]至[2-33]中任一項記載之抗體，其為單株抗體。

[2-35]如前述[2-1]至[2-34]中任一項記載之抗體，其為經單離之單株抗體。

[2-36]一種醫藥組成物，其係含有前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體。

[2-37]如前述[2-36]記載之醫藥組成物，其係用於以免疫之抑制、或免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療。

【0106】 [2-38]一種免疫抑制劑，其包含前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體作為有效成分。

[2-39]如前述[2-38]記載之免疫抑制劑，其進一步包含藥學上可容許之載劑。

[2-40]一種方法，其為免疫之抑制方法，其包含對需要其之對象投予有效量的前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體。

[2-41]如前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體，其係用於免疫之抑制。

[2-42]如前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體之使用，其係用於免疫抑制劑之製造。

【0107】[2-43]一種以免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療劑，其係包含以前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體作為有效成分。

[2-44]如前述[2-43]記載之預防及/或治療劑，其進一步包含藥學上可容許之載劑。

[2-45]一種方法，其為以免疫之亢進為特徵的疾病之預防及/或治療方法，其包含對需要其之對象投予有效量的前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體。

[2-46]如前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體，其係用於以免疫之亢進為特徵之疾病的預防及/或治療。

[2-47]一種前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體之用途，其係用以製造以免疫之亢進為特徵之疾病之預防及/或治療劑。

[2-48]如前述[2-43]或[2-44]記載之預防及/或治療劑、前述[2-45]記載之方法、前述[2-46]記載之抗體、或前述[2-47]記載之用途，其中，以免疫之亢進為特徵的疾病為自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病。

[2-49]如前述[2-48]記載之預防及/或治療劑、方法、抗體或用途，其中，以免疫之亢進為特徵的疾病為自體免疫疾病。

[2-50]如前述[2-49]記載之預防及/或治療劑、方法、抗體或用途，其中，自體免疫疾病為選自白塞氏病、全身性紅斑狼瘡、多發性硬化症、硬皮症、多發性

肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎、大動脈炎症候群、惡性關節風濕症、關節風濕症、幼年特發性關節炎、韋格納肉芽腫症、混合性結締組織病、薛格連症候群、成人絲蒂爾氏病、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、高根氏症候群、RS3PE、側頭動脈炎、風濕症性多發肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質抗體症候群、嗜酸性粒細胞性肌膜炎、IgG4 關連疾病、格林巴利症候群、重症肌無力症、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、原發性膽汁性肝硬變、大動脈炎症候群、古德帕絲卻症候群、急速進行性絲球體腎炎、巨母紅血球性貧血、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性嗜中性粒細胞減少症、特發性血小板減少性紫斑病、巴塞杜氏病、橋本病、自體免疫性副腎功能不全、原發性甲狀腺功能降低症、特發性艾迪生氏病、I 型糖尿病、緩慢進行性 I 型糖尿病、慢性圓板狀紅斑狼瘡、局部性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、天皰瘡、類天皰瘡、妊娠性皰疹、線狀 IgA 水皰性皮膚症、後天性表皮水皰症、圓形脫毛症、白斑、尋常性白斑、異位性皮膚炎、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓性多發神經炎、類肉瘤病、水皰性類天皰瘡、巨細胞性動脈炎、肌萎縮性側索硬化症、嗜酸性粒細胞性多發血管炎性肉芽腫症、原田病、自體免疫性視神經症、特發性無精子症、習慣性流產、炎症性腸疾病及腹腔疾病所構成之群組。

[2-51]如前述[2-49]或[2-50]記載之預防及/或治療劑、方法、抗體或用途，其中，自體免疫疾病為 I 型糖尿病、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡或關節風濕症。

[2-52]如前述[2-49]至[2-51]中任一項記載之預防及/或治療劑、方法、抗體或用途，其中，自體免疫疾病為多發性硬化症。

[2-53]如前述[2-52]記載之預防及/或治療劑、方法、抗體或用途，其中，多發性硬化症為全身性硬皮症或進行性全身性硬化症。

[2-54]一種多核苷酸，其編碼前述[2-1]至[2-35]中任一項記載之抗體。

[2-55]一種載體，其包含前述[2-54]記載之多核苷酸。

[2-56]一種宿主細胞，其包含前述[2-54]記載之多核苷酸或前述[2-55]記載之載體。

【0108】 本說明書中所引用之全部文獻，係藉由說明出處而成為本說明書之一部分。

上述之說明全部為非限定性者，只要不超脫附加之申請專利範圍中所定義的本發明之範圍，可進行變更。再者，下述之實施例全部為非限定性實施例，僅提供用以說明本發明。

[實施例]

【0109】 [材料及方法]

細胞培養

將 DO11.10 細胞、TCRα/β 缺損 BW-1100.129.237 細胞(White, J. et al., J. Immunol. 143, 1822-5 (1989)) (由 Leszek Ignatowicz，Georgia Regents University 提供)、IIA1.6 細胞、及 E.G7 細胞，於添加 10%(v/v)牛胎兒血清(FBS，Biowest)、0.5mM 單硫甘油(Wako)、2mM L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸二肽(Gibco)、100U/mL 青黴素(Nacalai Tesque)、及 100μg/mL 鏈黴素(Nacalai tesque)的 RPMI1640 培養基(Gibco)中維持。將 Plat-E 細胞於添加了 10%(v/v)FBS、100U/mL 青黴素(Nacalai Tesque)及 100μg/mL 鏈黴素(Nacalai tesque)的杜白可(Dulbecco)改良伊格爾(Eagle)培養基(D'MEM，Invitrogen)中維持。

【0110】 質體及反轉錄病毒基因導入

將 cDNA 之斷片以 PCR 增幅，並選殖至從 pFB-ires-Neo(Agilent)修改後之反

轉錄病毒表現質體載體中。為了製作小鼠及人類 PD-L1 變異體之質體資料庫，將 PD-L1 之 IgV 結構域藉由包含 400μM $MnCl_2$之 Thermo-Start Taq DNA 聚合酶(Thermo Fisher Scientific)增幅，並選殖至 pFB-ires-Neo 中。藉由懸垂 PCR (overhang PCR)製作具有部位特異性變異的 PD-L1 變異體及 CD80 變異體。為了控制表現水平，將 cDNA 之斷片選殖至從 pSUPER.retro.puro (OligoEngine)修改之反轉錄病毒表現質體載體(將啟動子區域交換成 EF-1α(人類伸長因子-1α)、CAG、CMV 及 MC1 啟動子)中。使用 FuGENE(註冊商標) HD(Promega)將質體基因導入至在 D'MEM(高葡萄糖)(Gibco)培養的 Plat-E 細胞中，該 D'MEM(高葡萄糖)係添加有 20%(v/v)FBS、100U/ml 青黴素(Nacalai Tesque)及 100μg/ml 鏈黴素(Nacalai tesque)，使用包含病毒之上清液，將基因形質導入至標的細胞中。將感染的細胞使用 G418(Wako)、嘌呤黴素(Sigma-aldrich)、Zeocin(InvivoGen)或滅瘟素(Blasticidin)(InvivoGen)選擇。

【0111】 藉由 CRISPR/Cas9 製作標的基因剔除細胞株

使用 CRISPR/Cas9 系統製作出 PD-1 缺損之 IIA1.6 細胞；PD-1、PD-L1、CD28 缺損之 DO11.10 細胞；PD-1 缺損之 BW-1100.129.237。將引導(guide)RNA 序列示於下表。將引導RNA序列選殖至pEF-BOS-Cas9-U6-guide(此係在人類EF-1α-啟動子下表現具有或不具有 D10A 變異之人類化 cas9 cDNA(Addgene)，且以在逆方向之 U6 啟動子下表現引導 RNA 之方式，從 pEF-BOS(Mizushima, S. & Nagata, S. Nucleic Acids Res. 18, 5322(1990))修改者)。將質體藉由電穿孔(Nucleofector II(註冊商標)，Lonza)基因導入至細胞。使用細胞分選儀(MoFlo XDP，Beckman Coulter)分選出標的基因之表現消失的細胞。藉由極限稀釋法取得細胞之純系(clone)，將標的基因之功能缺失變異及其表現之缺失，分別藉由序列決定

法及流式細胞術確認。

【0112】 [表 1]

細胞	基因	Cas9	引導RNA
IIAdL1	*Cd274*	WT	GTATGGCAGCAACGTCACGA
DO11.10TKO	*Cd274*	WT	GTATGGCAGCAACGTCACGA
	Pdcd1	WT	GACAGTGGCATCTACCTCTG
	Cd28	WT	ACTCGGCATTCGAGCGAAAC*1
			GCTGTTCACGCCCTTGTACA*1
DO11.10-*Pdcd1*$^{-/-}$	*Pdcd1*	D10A	GTTCAGAAAAGATGTCAGAA*2
			GTGCTCTCAGACCCATTCCA*2
			AGACCCTCCACAGAGAGCAC*2
			ATGCTAATGGCTGAAGAATC*2
BW-*Pdcd1*$^{-/-}$	*Pdcd1*	D10A	GTTCAGAAAAGATGTCAGAA*2
			GTGCTCTCAGACCCATTCCA*2
			AGACCCTCCACAGAGAGCAC*2
			ATGCTAATGGCTGAAGAATC*2

*1：為了提高效率，同時使用 2 個引導 RNA。

*2：藉由錯開缺口進行導入，將外顯子 2、3 及 4 標的化。

【0113】 小鼠

從 SLC 購入 C57BL/6N 小鼠，在經環境控制之乾淨室中，於特定病原體除去條件下飼育。在各實驗中使用週齡及性別一致之小鼠。所有小鼠之規程(protocol)經德島大學之動物實驗委員會認可。

【0114】 標的基因基因剔除小鼠及基因敲入小鼠之製作

將 Cas9 mRNA、gRNA 及單鏈寡聚去氧核苷酸(ssODN)藉著電穿孔，如先前記述般導入至 C57BL/6N 接合體(Hashimoto, M. & Takemoto, T., Sci. Rep. 5, 11315(2015))，藉此，製作出 C57BL/6N-Cd274$^{-/-}$(PD-L1 基因剔除小鼠)、C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$、C57BL/6N-Cd274^{Y56A} 及 C57BL/6N-Cd80^{L107E} 小鼠。將 C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$、C57BL/6N-Cd274^{Y56A} 及 C57BL/6N-Cd80^{L107E} 小鼠之製作中所使用的引導 RNA 及 ssODN 之核苷酸序列示於下表。在 C57BL/6N-Cd274$^{-/-}$小鼠中插入 1 個核苷酸，此是獲得在 Y56 中生成未成熟終止密碼子。在 C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$小鼠中插入 1 個核苷酸，此是獲得在 G109 中之移框(frame shift)、20 個不相關之胺基酸的附加、及未成熟終止密碼子之生成。將第 1 世代之鑲嵌小鼠與 C57BL/6N 野生型小鼠交配，取得雜接合體小鼠，將雜接合體小鼠彼此交配，取得純接合體小鼠。將 CD80 用之 5'-GAGACACTATCTCTAAAAAT -3'及 5'-TTAGTAGAGGTCTCCACCTT-3'引子對、及 PD-L1 用之 5'-GTTCATGTGATTCCCTAAAT-3'及 5'-CTGAAGTTGCTGTGCTGAGG-3'引子對，使用於基因組斷片之增幅。將增幅之斷片進行定序(ABI Prism(註冊商標) 3700 DNA Analyzer，Thermo Fisher Scientific)或使用於限制長多型解析。

【0115】 [表 2]

小鼠	引導 RNA	ssODN
C57BL/6N-Cd274$^{-/-}$	5'-TTGCGTTAGTGGTGTACT-3'	-
C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$	5'-TCTGAAAGGACCAGGCCC-3'	-
C57BL/6N-Cd274^{Y56A}	5'-TTGCGTTAGTGGTGTACT-3'	5'-CCCTGTAGAACGGGAGCTGGACCTGCTTGCGTTAGTGGTGGCCTGGGAAAAGGAAGATGAGCAAGTGATTCAGTTTGTGGCA-3'
C57BL/6N-Cd80^{L107E}	5'-TCTGAAAGGACCAGGCCC-3'	5'-CCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCGAAGGCCTGGTCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCG-3'

【0116】 DO11.10 T 細胞及再構成 TCR 之細胞的刺激

將 DO11.10 T 細胞(5×10^4 細胞/孔)於 96 孔圓底培養盤(BD Bioscinences)中，藉由以預定量之 $OVA_{323-339}$ 胜肽(ISQAVHAAHAEINEAGR，>95%純度，Sigma-Aldrich Japan 或 eurofins genomics)脈衝的 IIAdL1 細胞(1×10^4 細胞/孔)刺激 12 至 14 小時。藉由將 BW-1100.129.237 細胞之 PD-1 基因使用 CRISPR/Cas9 系統，進行基因剔除，製作出 BW-Pdcd1$^{-/-}$細胞。將 BW-Pdcd1$^{-/-}$細胞與 CD8α/CD8β/OT-I TCR 或 CD4/OT-II TCR 一起，以 CD3δ、CD3ζ、CD28 及 PD-1 再構成，分別製作 BW-OT-I 細胞或 BW-OT-II 細胞。將 BW-OT-I 細胞及 BW-OT-II 細胞(2.5×10^4 細胞/孔)於 96 孔圓底培養盤中，藉由將預定量之 MHCI 拘束性 $OVA_{257-264}$ 胜肽(SIINFEKL，>98%純度，MBL)或 MHCII 拘束性 $OVA_{323-339}$ 胜肽脈衝的 BM-DC 或脾臟 DC(5×10^3 細胞/孔)刺激 12 至 14 小時。將 1μg/ml 之抗 PD-L1 抗體(1-

111A)、5μg/ml 之抗 PD-L2 抗體(TY25)或大鼠 IgG2a 同型對照(RTK2758，Biolegend)以其表記之情況添加。藉由 ELISA(Biolegend)確定培養基之上清液中的 IL-2 之濃度。藉由比較在 PD-1 之功能發動之條件下與未發動之條件下 IL-2 之量，計算經由 PD-1 中介之阻害。

【0117】 流式細胞術分析

將培養細胞及初代細胞以圖中所示之抗體或可溶性嵌合蛋白質染色。針對脾臟細胞，在將細胞染色前，以 LPS(1μg/ml，Escherichia coli O111:B4，Merck)或 poly(I:C)(20μg/ml，Merk)刺激 16 至 18 小時。從 Thermo Fisher Scientific 購入針對小鼠 CD8α(5H10)、CD28(37.51)、PD-L1(1-111A，MIH5)之抗體。從 Biolegend 購入針對小鼠 PD-1(RMP1-30)、MHCII (M5/114.15.2)、B220(RA3-6B2)、F4/80 (BM8)、CD80(16-10A1)、CD86(GL-1)、DYKDDDDK 標籤(L5)、CD19(6D5)、CD3e (17A2)、CD4(RM4-5)、CD8α(53-6.7)、CD11b(M1/70)、CD11c(N418)及 CD317(927)之抗體。從 Biolegend 購入鏈黴親和素-藻紅蛋白(PE)及鏈黴親和素-異藻藍蛋白(APC)。從 Biolegend 購入大鼠 IgG2a(RTK2758)、大鼠 IgG2b(RTK4530)、及倉鼠 IgG(HTK888)之同型對照抗體。除非另有說明，使用 30μg/ml 生物素化 1-111A 來檢測小鼠 PD-L1。為了調製可溶性嵌合蛋白質，將編碼小鼠 PD-1(胺基酸 1-167)、人類 PD-1(胺基酸 1-167)、小鼠 CD28(胺基酸 1-149)及小鼠 CTLA-4(胺基酸 1-162)之細胞外區域的 cDNA 斷片藉由 PCR 增幅。將包含 DYKDDDDK 標籤之軟骨寡聚物基質蛋白質的 5 股捲曲螺旋結構域(Terskikh, A. V et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 1663-8(1997))融合於各蛋白質之 C 末端，將嵌合 cDNA 選殖至從 pEBMulti-Neo(Wako)修改之表現載體。使用 Avalanche-Omni 轉染試藥(EZ Biosystems)將質體形質導入 293T 細胞或 Plat-E 細胞，於 48 及 96 小時後回收培

養上清液。將上清液稀釋，使用於染色。藉由抗 DYKDDDDK 標籤抗體(L5)檢測出細胞上之嵌合蛋白質的結合。使用 Gallios(Beckman Coulter)取得數據，並使用 FlowJo(Tree Star)分析。

【0118】 共免疫沉降

將 DYKDDDDK 標籤融合於 PD-L1 及 PD-L1Y56A 之 C 末端。將 SHSLQKYYITGEAEGFPATA 標籤(hER 標籤) 融合於 CD80、CD80L107E 及 CD86 之 C 末端，該 hER 標籤可藉由針對人類 ERα 蛋白質(HC-20，Santa Cruz Biotechnology)之兔多株抗體來識別。在預定之組合中將表現標籤化蛋白質的 IIAdL1 細胞用 PBS 廣泛地洗淨，並以 BS^3(1mM，Thermo Fisher Scientific)處理 30 分鐘，其中該 BS^3 為水溶性，非開裂型之膜不穿透性交聯劑。以 25mM Tris 使交聯反應停止後，將細胞以包含 1%NP-40 之溶解緩衝液溶解。將以 DYKDDDDK 標籤標識之蛋白質藉由抗 FLAG M2 瓊脂糖珠(Merk)免疫沉降，以還原條件之 SDS-PAGE 分離，並轉印至 PVDF 膜。將以 DYKDDDDK 標籤及 hER 標籤標識之蛋白質，用抗 DYKDDDDK 抗體(L5)及 HC-20 抗體，繼而用 IRDye800-抗大鼠 IgG(H+L)及 IRDye680-抗兔 IgG(H+L)(LI-COR Biosciences)抗體檢測。將膜上之螢光信號用 Odyssey 顯影系統(LI-COR Biosciences)檢測。

【0119】 BM-DC 之製作

從小鼠之大腿骨及脛骨回收 BM 細胞，在添加有 10%(v/v)FBS、0.5mM 單硫甘油、2mM L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸二肽、100U/ml 青黴素、100μg/ml 鏈黴素、及 20ng/ml 組換小鼠 GM-CSF(Biolegend)的 RPMI1640 培養基中培養。於第 4 日將培養基之三分之二以新鮮培養基交換。於第 6 日回收非接著性細胞，藉由 BD iMag Cell Separation System(BD Biosciences)，在小鼠之免疫實驗中，分取 $CD11c^+$

細胞，在試管內之共培養實驗中，分取 $CD86^+$細胞。將單離之細胞以 LPS(1μg/ml)刺激。於具有 E.G7 的小鼠之樹狀細胞疫苗療法中，添加 100μg/ml 之 OVA 蛋白質(低內毒素，Wako)。在 16 至 18 小時後回收非接著性細胞，使用於進一步之實驗。

【0120】 TG-MΦ 之調製

將 2ml 之 3% Brewer 巯基乙酸鹽培養基(BD Biosciences)經由腹腔內投予至幼年小鼠。4 日後回收腹腔滲出細胞，在組織培養之培養盤中，於 37℃播種 2 小時。將浮游細胞廣泛地洗滌，將強固接著之細胞以 LPS(1μg/ml)刺激 16 至 18 小時，然後用於流式細胞術分析。為了進行試管內(in-vitro)之共培養檢定，將 $F4/80^+$細胞藉由細胞分選儀精製(>95%純度)。

【0121】 脾臟 DC 之單離

將脾臟以膠原酶(1mg/ml，Wako)於 37℃處理 20 分鐘並粉碎，調製出單一細胞懸浮液。紅血球溶解後，將脾臟細胞全體以 LPS(1μg/ml)刺激 16 至 18 小時。回收細胞，藉由 bio-CD11c 抗體及隨後以 PE-鏈黴親和素染色，並將 $CD11c^+$細胞以抗 PE 磁粒子及 BD iMag 細胞分離系統(BD iMag Cell Separation System)濃縮。將 $B220^-F4/80^-CD3^-CD11c^+CD8\alpha^+CD11b^-$細胞($CD8\alpha^+$DC)或 $B220^-F4/80^-CD3^-CD11c^+CD8\alpha^-CD11b^+$細胞($CD11b^+$DC)藉由細胞分選儀分取(分別為 $CD8\alpha^+$DC：>85%純度及 $CD11b^+$DC：>90%純度)，使用作為試管內之共培養檢定的抗原呈現細胞。

【0122】 蛋白質結構

將小鼠 PD-L1 及 CD80 之結構，分別根據人類 PD-L1(PDB ID: 4Z18)及小鼠 CD80 之 IgV 結構域(PDB ID: 4RWH)的已報導結構，藉由 SWISS-MODEL

(https://swissmodel.expasy.org/)進行預測。將人類 CD80(PDB ID: 1DR9)及 CD86 (PDB ID: 1NCN)之結構藉由 UCSF 嵌合軟體解析。

【0123】 針對 OVA 之 T 細胞回應的誘導

將於弗氏完全佐劑(BD Biosciences)中乳化之 OVA 蛋白質(100μg)作為抗原，接種於幼年小鼠之足蹠。接種抗原 1 週後，將源自膝窩淋巴節之 5×10^5 個細胞藉由 OVA 蛋白質(100μg/ml)、$OVA_{257-264}$ 胜肽(100nM)及 $OVA_{323-339}$ 胜肽(3μM)刺激 48 小時。以 ELISA(Biolegend)確定培養上清液中的 IL-2 及 IFN-γ 之濃度。

【0124】 腫瘤免疫療法

於第 0 日，將 5×10^5 個 E.G7 淋巴腫瘤細胞皮下投予至小鼠之經剪毛的左側腹部。於第 5 日及第 12 日，將在 PBS 中將與 poly(I:C)(50μg)混合後之 OVA 蛋白質(100μg) 皮下投予於腫瘤附近。或者是，於第 3 日及第 10 日，將以 OVA 蛋白質脈衝之 4.5×10^5 個 LPS 活化 BM-DC 皮下接種於腫瘤附近。每 3 日藉由卡尺測定腫瘤之大小。使用下述公式計算腫瘤之體積：$1/2\times(\text{短徑})^2\times(\text{長徑})$。

【0125】 實驗姓自體免疫性腦脊髓炎(EAE)

將 EAE 之誘導依照既有之規程(Stromnes, I. M. & Goverman, Nat. Protoc. 1, 1810-1819(2006))進行誘導。簡潔而言，在第 0 日，以在添加有結核分枝桿菌(Mycobacterium Tuberculosis) H37RA(200μg，BD Biosciences)之弗氏不完全佐劑(BD Biosciences)中乳化的 MOG_{35-55} 胜肽(200μg，MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK，>95%純度，Eurofins)作為抗原，將其經由皮下接種於小鼠。在第 0 及 2 日，經由腹腔內投予 200ng 之百日咳毒素(List Biological Laboratories)。將臨床分數依照盲測原則，如以下方式進行每日評估：0:無臨床症狀；1:足部拖曳狀；2:後肢無力；3:後肢麻痺；4:後肢及前肢麻痺；5:瀕死狀態。為了評估試管內之回憶(recall)反

應，於接種抗原 7 日後，將 1×10^6個小鼠之脾臟細胞以 5 或 50μg/ml 之 MOG_{35-55} 胜肽刺激 66 小時。藉由 ELISA(Thermo Fisher Scientific)確定培養上清液中的 IL-17A 之濃度。

【0126】 統計

將非對應之學生氏的兩側 t 檢定用於 2 群間之比較。將伴隨事後檢定之一元配置分散分析或二元配置分散分析使用於多重比較。將 $p<0.05$ 視為統計上顯著。圖中，誤差線(error bar)表示 s.e.m。第 1 至 12、17、19、21 至 28 及 30 至 34 圖展示 3 次以上之獨立實驗的代表性數據。

【0127】 [結果]

試驗 1：藉由順式-PD-L1/CD80 之相互作用所致之 PD-L1/PD-1 結合及其後經由 PD-1 中介之阻害的妨害

在表現 PD-L1 且不表現 PD-L2 之 IIA1.6 細胞中，使用 CRISPR/Cas9 系統剔除 PD-L1 基因，得到 IIAdL1 細胞。藉由在 IIAdL1 細胞中使 PD-L1、PD-L2、CD80 及 CD86 以各種組合過度地表現，並以可溶性之小鼠 PD-1 細胞外區域(PD-1-EC)蛋白質染色，評估 PD-1 結合能力(第 1 圖)。PD-1-EC 與 PD-L1 之結合，在 IIAdL1-PD-L1 細胞中，藉由 CD80 之同時表現而被強力地遮斷，CD86 之同時表現未被實施(第 1 圖上段)。此結果，顯示 CD80 與在相同抗原呈現細胞上之 PD-L1 相互作用，該順式-PD-L1/CD80 相互作用妨礙 PD-L1/PD-1 結合。另一方面，PD-1-EC 與 PD-L2 之結合，在 IIAdL1-PD-L2 細胞中，未因 CD80 及 CD86 之同時表現而受影響(第 1 圖下段)。IIAdL1-CD80 細胞添加至 IIAdL1-PD-L1 細胞中(此非順式-PD-L1/CD80 相互作用，而可能是反式-PD-L1/CD80 相互作用)，未影響 PD-1-EC 與 IIAdL1-PD-L1 細胞之結合(第 2 圖)。此結果，顯示為了妨礙 PD-

L1/PD-1 結合，CD80 必須與 PD-L1 在相同細胞上表現。值得注意的是，順式-PD-L1/CD80 相互作用並未妨礙 CD80/CD28 結合及 CD80/CTLA-4 結合(未顯示數據)。若將細胞表面上所鄰接之蛋白質藉由細胞不穿透性交聯劑交聯，則 CD80 與 PD-L1 產生共免疫沉降，CD86 則無(第 3 圖)。此結果，進一步支持 PD-L1 與 CD80 之順式相互作用。

【0128】 為了調查功能上之意義，將使 PD-L1、PD-L2、CD80 及 CD86 以各種組合過度表現之 IIAdL1 細胞作為抗原呈現細胞，使用其刺激 DO11.10 T 細胞。由抗原刺激所致之從 DO11.10 T 細胞之 IL-2 產生，在 PD-L1 或 PD-L2 於抗原呈現細胞上表現時，將被強烈阻害(第 4 圖上段)。由於 IL-2 產生之抑制在 PD-1 基因剔除 DO11.10(DO11.10-Pdcd1$^{-/-}$)T 細胞中未被觀察到，可知經由 PD-L1 或 PD-L2 中介之阻害依存於 PD-1。CD80 之同時表現，係強力地抑制 IIAdL1-PD-L1 細胞所誘發之經由 PD-1 中介的阻害效果，未抑制由 IIAdL1-PD-L2 細胞所引起之阻害效果(第 4 圖中段)。CD86 之同時表現，未抑制藉由 IIAdL1-PD-L1 細胞及 IIAdL1-PD-L2 細胞所誘發之經由 PD-1 中介的阻害效果(第 4 圖下段)。因此，顯示 CD80 係與 PD-L1 以順式相互作用，在 T 細胞活化中，妨礙由 PD-L1 所致之 PD-1 之功能的誘發。

【0129】 繼而，調查順式-PD-L1/CD80 相互作用之用量依存效果。使 CD80 及 PD-L1 單獨或同時地，以 4 種不同表現水平於 IIAdL1 細胞上表現(全部 25 種組合)(第 5 圖)。如預期般，若使相當量之 CD80 與 PD-L1 同時表現，因應 CD80 之表現量增加，PD-1-EC 與對 PD-L1 之結合減少(第 6 圖及第 7 圖)。具有 PD-1-EC 結合能力之抗原呈現細胞可誘發 PD-1 之功能，故而可誘發由 DO11.10 T 細胞之活化所導致之 IL-2 產生(第 8 圖)。此等結果顯示藉由 PD-L1 與 CD80 之相

對量，確定抗原呈現細胞與 T 細胞上之 PD-1 結合並誘發其功能的能力。

【0130】 試驗 2：在由初代培養 DC 所致之 T 細胞活化中，經由 PD-1 中介之阻害的妨害

為了調查生體中的順式-PD-L1/CD80 相互作用，分析活化 $CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$脾臟 DC 及巰基乙酸誘導性腹腔 MΦ(TG-MΦ)(第 9 圖)。有趣的是，儘管 PD-L1 表現水平均同樣高(第 9 圖，第 2 段)，3 種細胞集團之 PD-1-EC 結合強度有大幅的差異，TG-MΦ 與 PD-1-EC 強烈地結合，而 $CD8\alpha^+$DC 與 PD-1-EC 則微弱地結合，$CD11b^+$DC 與 PD-1-EC 幾乎不結合(第 9 圖，最上段)。值得注意的是，$CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$DC 上之 CD80 的表現水平，遠高於 TG-MΦ 上之 CD80 的表現水平(第 9 圖，最下段)。

【0131】 繼而，製作 CD80 基因剔除(C57BL/6N-$Cd80^{-/-}$)小鼠，分析與上述相同之細胞集團(第 10 圖)。值得注意的是，源自 C57BL/6N-$Cd80^{-/-}$小鼠之 $CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$DC，以與 TG-MΦ 相同程度之強度與 PD-1-EC 結合(第 10 圖，最上段)。此結果，顯示在野生型小鼠中，為了強烈地表現 CD80，$CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$DC 與 PD-1-EC 之結合不完全。源自野生型小鼠之 TG-MΦ 上的 CD80 之表現水平係妨礙 PD-L1/PD-1 結合則越不高，TG-MΦ 與 PD-1-EC 之結合強度不因 CD80 缺損而變化。

【0132】 繼而，使用 $CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$DC 及 TG-MΦ 作為抗原呈現細胞，刺激對 $pOVA_{257-264}$/H2-K^b 回應之 T 淋巴腫瘤細胞(BW-OT-I 細胞)或對 $pOVA_{323-339}$/I-A^b 回應之 T 淋巴腫瘤細胞(BW-OT-II 細胞)(第 11 圖)。TG-MΦ 在 BW-OT-I 細胞及 BW-OT-II 細胞兩者中，與其強力的 PD-1-EC 結合能力一致，可誘發 PD-1 之阻害功能(第 11 圖，上段)。另一方面，對於 BW-OT-I 細胞及 BW-OT-II 細胞之

活化，$CD8\alpha^+$及 $CD11b^+$DC 無法誘發經由 PD-1 中介之阻害效果(第 11 圖，中段及下段)。第 12 圖為將第 11 圖所示之數據進一步分析的結果。此等結果，顯示在藉由 T-DC 相互作用之 T 細胞活化中，DC 表現足以妨害 PD-L1/PD-1 結合之量的 CD80，而使 PD-1 之功能受到限制。

【0133】 試驗 3：未具有順式-PD-L1/CD80 相互作用之 PD-L1 變異體及 CD80 變異體

嘗試單離雖然保持其他功能，但無法與 CD80 結合的 PD-L1 變異體、及無法與 PD-L1 結合的 CD80 變異體。將 PD-L1、PD-L2、CD80 及 CD86 各個 IgV 結構域及 IgC 結構域交換的嵌合分子的結合特徵，藉由解析釐清 PD-L1 及 CD80 之 IgV 結構域在彼等之相互作用上的參與方式 (第 13 圖、第 14 圖)。使用易錯 PCR 在 PD-L1 之 IgV 結構域中導入隨機變異，在 IIAdL1-CD80 細胞中使此等變異體過度表現，藉由細胞分選，分取獲得 PD-1-EC 結合能力之細胞。從此等細胞單離之 PD-L1 變異體，於 V54、Y56 及 E58 具有高變異率(第 15 圖上段)。若預測小鼠 PD-L1 之 3D 結構，顯示此等胺基酸殘基位於 PD-L1 之 C 鏈。該 C 鏈接近 PD-1 相互作用之表面(Lin, D. Y.-W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3011-6(2008))(第 16 圖左)。此等結果，暗示 PD-L1/CD80 之相互作用表面，與 PD-L1/PD-1 之相互作用表面部分地重疊。調查於 Y56 之一連串點變異時(第 15 圖下段)，Y56A 變異體於 CD80 存在下及不存在下同等地與 PD-1-EC 結合(第 17 圖左)，由於在 IIAdL1 細胞中顯示與野生型 PD-L1 相同程度之表現水平(第 17 圖右)，將 PD-L1Y56A 使用於後續之分析。

【0134】 由於 CD28 係與 CD80 之 AGFCC'C"表面結合(Ikemizu, S. et al., Immunity 12, 51-60 (2000)；Stamper, C. C. et al. Nature 410, 608-11(2001)；Evans,

E. J. et al. Nat. Immunol. 6, 271-279(2005))，CD80 係於 PD-L1 存在下可與 CD28 結合(未顯示數據)，故著眼於 CD80 之 DEB 表面。藉由比較 CD80(Ikemizu, S. et al.，已記載)與 CD86(Zhang, X., Schwartz, J.-C. D., Almo, S. C. & Nathenson, S. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 2586-91(2003))之疏水性，發現 CD80 之 DEB 表面中特有的疏水性區塊(第 18 圖)。因此，在該疏水性區塊中，使胺基酸殘基變異。具有 L96E 或 L107E 變異之 CD80，不會妨礙 PD-L1/PD-1 結合(第 19 圖上段及第 20 圖)。由於 CD80L107E 變異體不妨礙 PD-L1/PD-1 結合，對 CD28 及 CTLA-4 以與野生型 CD80 相同之程度結合，在 IIAdL1 細胞中顯示與野生型 CD80 相同程度的表現水平(第 19 圖)，故將 CD80L107E 使用於後續分析。又，與使用了 PD-L1Y56A 之 CD80 之共免疫沉降顯著地減少，與使用了 CD80L107E 之 CD80 之共免疫沉降幾乎消失(第 21 圖)。

【0135】 繼而，調查此等變異體之功能。使用表現 PD-L1Y56A 之 IIAdL1 細胞作為抗原呈現細胞，若刺激 DO11.10 T 細胞時，則 PD-L1Y56A 於 CD80 不存在下，誘發與野生型 PD-L1 相同程度之經由 PD-1 中介的阻害效果(第 22 圖上段及第 23 圖)。再者，PD-L1Y56A 即使在 CD80 存在下，亦誘發 PD-1 之功能(第 22 圖中段及第 24 圖)。此結果顯示 PD-L1Y56A 可迴避 CD80 之作用，而誘發 PD-1 之功能。若使 CD80L107E 在 PD-L1 不存在下於 IIAdL1 細胞上表現時，則 CD80L107E 係與野生型 CD80 相同程度地增強由抗原刺激所導致之來自 DO11.10 T 細胞的 IL-2 產生。再者，PD-L1 可於 CD80L107E 存在下誘發 PD-1 之功能(第 22 圖下段及第 24 圖)。此結果顯示 CD80L107E 無法阻害由 PD-L1 所誘發的 PD-1 功能。

【0136】 試驗 4：在人類中藉由順式-PD-L1/CD80 相互作用而減弱經由 PD-

1 中介之阻害

為了調查經由 PD-1 中介之阻害效果被順式-PD-L1/CD80 相互作用所致之減弱是否在人類中同樣地發生，使用人類直系同源體(ortholog)進行同樣之實驗。與小鼠分子同樣地，人類 CD80 與人類 PD-L1 結合，而減弱人類 PD-L1 與人類 PD-1 之結合，然而人類 CD86 並未產生此等作用(第 25 及 26 圖)。人類 CD80 雖與人類 PD-L1 共免疫沉降，然而人類 CD86 並未如此(第 27 圖)。進一步，人類 CD80 與人類 PD-L1 之順式相互作用，妨礙人類 PD-L1 誘發人類 PD-1 之阻害功能(第 28 圖)。欠缺順式-PD-L1/CD80 相互作用，則無法限制 PD-1 之功能，在人類 CD80 變異體及人類 PD-L1 變異體之單離上亦成功(第 29 及 30 圖)。人類 PD-L1N63D/G119S 變異體，在人類 CD80 不存在下，與野生型人類 PD-L1 相同程度地誘發經由 PD-1 中介之阻害(第 30 圖上段)，即使於人類 CD80 存在下，亦誘發經由 PD-1 中介之阻害(第 30 圖中段)。又，人類 CD80L104E 變異體無法妨害藉由 PD-L1 所誘發之經由 PD-1 中介的阻害(第 30 圖下段)。

【0137】 試驗 5：不存在順式-PD-L1/CD80 相互作用下，T 細胞回應對免疫原、腫瘤細胞及自身組織之減弱

為了調查生體(in vivo)中順式-PD-L1/CD80 相互作用之生物學上意義，使用 CRISPR/Cas9 系統製作 PD-L1Y56A 及 CD80L107E 之基因敲入小鼠(C57BL/6N-$Cd274^{Y56A}$ 小鼠及 C57BL/6N-$Cd80^{L107E}$ 小鼠)。C57BL/6N-$Cd274^{Y56A}$ 小鼠及 C57BL/6N-$Cd80^{L107E}$ 小鼠正常出生，未出現明顯之障礙，健康地發育。源自此等基因敲入小鼠之活化 $CD8\alpha^{+}$DC、$CD11b^{+}$DC 及源自 GM-CSF 誘導性骨髓之樹狀細胞(BM-DC)，與源自野生型小鼠之此等細胞比較，雖 CD80、PD-L1 及 PD-L2 之表現水平為同等，仍顯示非常強烈的 PD-1-EC 結合能力(第 31 圖)。又，此等

細胞上之 CD86 及 MHCII 之表現水平亦為相同程度。源自野生型小鼠之活化 DC，對於 BW-OT-I 及 BW-OT-II 細胞之活化，幾乎不會誘發 PD-1 之阻害效果，然而源自 C57BL/6N-Cd274^{Y56A} 小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E} 小鼠之活化 DC 則誘發阻害效果(第 32 圖至第 34 圖)。

【0138】 繼而，調查生體中之順式-PD-L1/CD80 相互作用對於對外來性抗原產生之免疫回應之效果。對 C57BL/6N-Cd274^{Y56A} 小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E} 小鼠，接種乳化於弗氏完全佐劑(CFA)中之 OVA 蛋白質作為抗原，1 週後，再刺激所屬淋巴節中之 T 細胞。藉由 OVA 蛋白質及 MHCI 及 MHCII 拘束性 OVA 胜肽之刺激導致的來自 T 細胞之 IFN-γ 產生及 IL-2 產生，相較於野生型小鼠，在兩者之基因敲入小鼠中係顯著較低(第 35 圖)。此等結果，顯示野生型小鼠方面，在對於外來性抗原產生免疫回應之誘導中，藉由順式-PD-L1/CD80 相互作用而限制 PD-1 之功能。

【0139】 繼而，調查在癌免疫療法中順式-PD-L1/CD80 相互作用之參與。將表現 OVA 之 E.G7 淋巴腫瘤細胞(Moore, M. W., Carbone, F. R. & Bevan, M. J., Cell 54, 777-85(1988))移植至小鼠，以 OVA 蛋白質及 poly(I:C)作為疫苗，進行接種(第 36 圖)。在野生型小鼠方面，腫瘤增殖藉由疫苗接種而被強烈地抑制，然而在 C57BL/6N-Cd274^{Y56A} 小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E} 小鼠方面，未見到顯著之治療效果(第 37 及 38 圖)。進一步，為了直接調查抗原呈現細胞上之順式-PD-L1/CD80 相互作用的角色，使用樹狀細胞疫苗。在源自野生型小鼠及基因敲入小鼠之 BM-DC 將 OVA 脈衝並投予至移植有 E.G7 細胞之野生型小鼠中，而誘導免疫回應(第 39 圖)。與蛋白質疫苗接種之效果一致，使用源自野生型小鼠之 BM-DC 的樹狀細胞疫苗療法係誘發強烈的抗腫瘤免疫回應，然而使用源自

C57BL/6N-Cd274^{Y56A}小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E}小鼠之 BM-DC 時，未誘發抗腫瘤免疫回應(第 40 及 41 圖)。此等結果顯示雖然藉由順式-PD-L1/CD80 相互作用，PD-1 之功能受到限制，然而在抗腫瘤免疫回應之誘發上非常重要。

【0140】再者，使用屬於多發性硬化症小鼠模型的實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)，調查順式-PD-L1/CD80 相互作用在自體免疫中的角色。以 MOG 胜肽作為抗原之免疫誘導所引起的 EAE 症狀，相較於野生型小鼠，C57BL/6N-Cd274^{Y56A}小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E}小鼠顯然為輕度(第 42 圖)。同樣地，藉由 MOG 胜肽再刺激時，在以 MOG 胜肽免疫之源自 C57BL/6N-Cd274^{Y56A}小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E}小鼠之脾臟細胞中，IL-17 產生大幅度地減少(第 43 圖)。此等見識顯示，EAE 發病時，在野生型小鼠方面，PD-1 之抑制效果由於順式-PD-L1/CD80 相互作用而被妨礙，另一方面，在 C57BL/6N-Cd274^{Y56A}小鼠及 C57BL/6N-Cd80^{L107E}小鼠方面，由於 PD-L1 從 CD80 解放，因此與 PD-1 結合，發揮抑制效果，EAE 之症狀受到抑制。

【0141】使用抗 CD80 抗體之試驗

[材料及方法]

可溶性蛋白質

將編碼小鼠 CD80 之細胞外區域的 cDNA 斷片以 PCR 增幅，與人類 IgG1 之 Fc 區域(hIgG1Fc)融合。將嵌合 cDNA 選殖至修改自 pEFBOSneo 之表現載體中。使用 Avalanche-Omni 轉染試劑(EZ Biosystems)，將質體導入至 Plat-E 細胞中，於 48 小時後回收培養上清液。將小鼠 CD80-hIgG1Fc 以蛋白質 G(GE Healthcare)精製。

【0142】小鼠

將 C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$小鼠於環境經控制之乾淨室中，在除去特定病原體之條件下飼育。所有小鼠之規程經德島大學之動物實驗委員會認可。

【0143】 抗小鼠 CD80 單株抗體(mAb)之生成

對 C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$小鼠接種作為抗原之小鼠 CD80-hIgG1Fc 蛋白質作進而誘導免疫回應，將該 C57BL/6N-Cd80$^{-/-}$小鼠之淋巴節細胞，與 SP2/o 細胞藉由電式細胞融合(LF301, BEX)進行融合。測試融合瘤純系之培養上清液使順式-PD-L1/CD80 相互作用解離的能力。

【0144】 抗人類 CD80mAb 之生成

對 BALB/c 小鼠接種作為抗原之人類 CD80-hIgG1Fc 蛋白質(R&D Systems)進而誘導免疫回應，將該 BALB/c 小鼠之淋巴節細胞使用 SP2/o 細胞及仙台病毒外套(GenomONE-CF, Ishihara Sangyo Kaisha)進行融合。測試融合瘤純系之培養上清液使順式-PD-L1/CD80 相互作用解離的能力。

【0145】 DO11.10 T 細胞及再構成 TCR 之細胞之刺激

以 IIAdL1 細胞(1×10^4 個/孔)刺激 DO11.10 T 細胞(5×10^4 個/孔)12 至 14 小時，其中該 IIAdL1 細胞經圖中所示之量之 OVA323-339 胜肽(ISQAVHAAHAEINEAGR, ＞95% 純度, Sigma-Aldrich Japan 或 eurofins genomics)脈衝。將 5μg/ml 之抗小鼠 CD80 抗體(TKMG48、1G10(BD bioscience)、RM80(Biorad))、小鼠 IgG1 同型對照(MOPC-21, Biolegend)、抗人類 CD80 抗體(TKMF5)及小鼠 IgG2a 同型對照(MOPC-173, Biolegend)以如後述之方式添加。藉由 ELISA(Biolegend)測定培養上清液中之 IL-2 之濃度。

【0146】 EAE

藉由皮下接種 MOG_{35-55} 胜肽(200μg，MEVGWYRSPF SRVVHLYRNGK，

>95% 純度，Eurofins)使小鼠免疫(第 0 日)，其中該 MOG_{35-55} 胜肽以包含結核菌 H37RA(200μg，BD Biosciences)之弗氏不完全佐劑(BD Biosciences)乳化。於第 0 日及第 2 日，投予百日咳毒素(200ng, List Biological Laboratories)至腹腔內。如第 47 圖及第 48 圖中所示，腹腔內投予 500μg 之抗小鼠 CD80 抗體(TKMG48)或同型對照小鼠 IgG1(MOPC21, Bio X cell)。將臨床分數依照盲測原則，如下述方式進行每日評估：0:無臨床症狀；1:足部拖曳狀；2:後肢無力感；3:後肢麻痺；4:後肢及前肢麻痺；5:瀕死狀態。

【0147】 抗體對於 CD80 分子之結合性

藉由流式細胞術評估 TKMG48 及 16-10A1 對於 DOdKO 細胞之結合性，其中該 DOdKO 細胞導入有小鼠 CD80、CD80 及 CD86 之 IgV 結構域及 IgC 結構域交換之嵌合分子(第 13 圖參照)、或欠缺與小鼠 PD-L1 之結合能力的小鼠 CD80 變異體(具有 L96E 及/或 L107E 變異)。藉由流式細胞術評估 TKMF5 及 2D10 對於 DOdKO 細胞之結合性，其中該 DOdKO 細胞導入有人類 CD80、或欠缺與人類 PD-L1 之結合能力的人類 CD80 變異體(具有 I92E 及 L104E 變異)。

【0148】 抗小鼠 CD80 抗體(TKMG48)及抗人類 CD80 抗體(TKMF5)之結合性評估

對於小鼠 CD80 可溶性蛋白質之抗小鼠 CD80 抗體(TKMG48)及對於人類 CD80 可溶性蛋白質之抗人類 CD80 抗體(TKMF5)的結合親和性，係藉由生物層干擾法來測定。簡言之，將編碼小鼠或人類 CD80 之細胞外區域的 cDNA 斷片，藉由 PCR 增幅。將 strep 標籤附加於 CD80 之 C 末端。將嵌合 cDNA 選殖至從 pEBMulti-Neo (Wako)修改而成之表現載體。使用 Avalanche-Omni Transfection Reagent(EZ Biosystems)將質體導入至 Plat-E 細胞中，於 48 小時後回收培養上清

液。將單體之 CD80(附 strep 標籤)固定於鏈黴親和素被覆生物感測器晶片(Pall ForteBio)，藉由 BLItz(Pall ForteBio)監測各種濃度之抗 CD80 抗體之結合。將晶片用 PBS 洗淨，分析解離速度。藉由 BLItz Pro 軟體算出結合速度常數(ka)、解離速度常數(kd)及解離常數(KD)。

【0149】 [結果]

由抗 CD80 抗體所致之免疫抑制

調查在相同之抗原呈現細胞上存在小鼠 CD80 及小鼠 PD-L1 時，藉由抗小鼠 CD80 抗體，小鼠 PD-1-EC 是否能與小鼠 PD-L1 結合。將小鼠 PD-L1 及 CD80 導入至 PD-1 及 PD-L1 之基因缺損的 DO11.10 T 細胞(DOdKO 細胞)中，得到 DOdKO-mPD-L1/mCD80 細胞。將 DOdKO-mPD-L1/mCD80 細胞，藉由 10μg/ml 之各抗小鼠 CD80 抗體，於 37℃進行 20 分鐘前處理，繼而以小鼠 PD-1-EC 染色。小鼠 PD-1-EC 雖與經 TKMG48 前處理之 DOdKO-mPD-L1/mCD80 細胞結合，然而未與以其他抗體前處理者結合(第 44 圖)。使用小鼠 PD-1-EC 之結合平均螢光強度，藉由下述計算式評估 TKMG48 前處理之效果。

(TKMG48 處置群-對照群)/(對照 IgG 群-對照群)

相較於以對照 IgG 前處理之情況，小鼠 PD-1-EC 相對於經 TKMG48 前處理之 DOdKO-mPD-L1/mCD80 細胞的結合量為約 10.1 倍。此等結果，顯示相同之抗原呈現細胞上存在小鼠 CD80 及小鼠 PD-L1 時，TKMG48 使小鼠 PD-1-EC 與小鼠 PD-L1 結合。

【0150】 調查抗小鼠 CD80 抗體對於 CD80 與 CD28、CD80 與 CTLA-4、及 CD80 與 PD-L1 之相互作用的效果。將 DOdKO-CD80 細胞藉由 10μg/ml 之第 45 圖中所示的各抗小鼠 CD80 抗體於 4℃進行 20 分鐘前處理，繼而，藉由小鼠

CD28-EC、CTLA-4-EC 或 PD-L1-EC 染色。將結果示於第 45 圖。TKMG48 強烈地阻害 PD-L1-EC 與 CD80 之結合。CD28-EC 對 CD80 之結合雖藉由 TKMG48 而被微弱地阻害，然而 CTLA-4-EC 對 CD80 之結合則未因 TKMG48 而被阻害。16-10A1 強烈阻害 CD80 與 CD28-EC 以及 CD80 與 PD-L1-EC 之相互作用，部分地阻害 CD80 與 CTLA-4-EC 之相互作用。1G10 雖強烈阻害 CD80 與 CD28-EC 及 CD80 與 PD-L1-EC 之相互作用，然而並未阻害 CD80 與 CTLA-4-EC 之相互作用。RM80 未阻害 CD28-EC、CTLA-4-EC 及 PD-L1-EC 對 CD80 之結合。

【0151】調查在相同之抗原呈現細胞上存在 CD80 及 PD-L1 時，藉由 TKMG48，是否可使 PD-L1 誘發 PD-1 之阻害效果。將表現 PD-1、或者缺損 PD-1 之 DO11.10 T 細胞，以經 $OVA_{323-339}$ 脈衝的 IIAdL1-CD80/CD86 或 IIAdL1-CD80/CD86/PD-L1 細胞刺激。將抗小鼠 CD80 抗體或對照 IgG(5μg/ml)以如第 46 圖中所示之方式添加。將結果示於第 46 圖。藉由抗原刺激之 DO11.10 T 細胞的 IL-2 產生，在添加 TKMG48 之情況雖受 PD-1 阻害，然而在添加 16-10A1 或 IG10 之情況則未受阻害。此等結果，顯示 TKMG48 使順式-PD-L1 與 CD80 之相互作用解離，而可誘發由 PD-L1 所致之 PD-1 之阻害效果。

【0152】評估 TKMG48 對於實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)之治療效果。對 C57BL/6N 小鼠接種作為抗原之經 CFA 乳化之 MOG_{35-55} 胜肽(第 0 日)。於第 1、3、5、7、10 及 13 日，將 500μg 之 TKMG48 或同型對照(小鼠 IgG1)對小鼠進行腹腔內投予。將結果示於第 47 圖。TKMG48 處置大幅度地減輕 EAE 之症狀。同樣地，對 C57BL/6N 小鼠及 C57BL/6N-Cd274$^{-/-}$小鼠(PD-L1 基因剔除小鼠) 接種作為抗原之驚 CFA 乳化之 MOG_{35-55} 胜肽作為抗原 (第 0 日)。於第 1、3、5、7、10、13 及 16 日，將 500μg 之 TKMG48 或同型對照(小鼠 IgG1)對小鼠進行

腹腔內投予。將結果示於第 48 圖。TKMG48 處置以依存於 PD-L1 之方式，大幅度地減輕 EAE 之症狀。此等結果，顯示藉由解離順式-PD-L1 與 CD80 之相互作用，使得 PD-1 信號之活化，在自體免疫疾病之處置上有效。

【0153】 調查相同之抗原呈現細胞上存在人類 CD80 及人類 PD-L1 時，藉由屬於抗人類 CD80 抗體之 TKMF5，是否可使人類 PD-1-EC 與人類 PD-L1 結合。將 DOdKO-hPD-L1/hCD80 細胞以 TKMF5 於 37℃進行 20 分鐘前處理，繼而以人類 PD-1-EC 染色。PD-1-EC 對 DOdKO-hPD-L1/hCD80 細胞之結合，以依存於 TKMF5 之濃度的方式增加，例如，於 30μg/mL 之 TKMF5 存在下，與 PD-1-EC 結合之細胞的比率為約 50%。此結果顯示，相同之抗原呈現細胞上存在人類 CD80 及人類 PD-L1 時，TKMF5 使人類 PD-1-EC 與人類 PD-L1 結合。

【0154】 調查 TKMF5 對於 CD80 與 CD28、CD80 與 CTLA-4、及 CD80 與 PD-L1 之相互作用的效果。將人類 CD80 導入至 PD-1 之基因缺損之 DO11.10 T 細胞(DOdPD 細胞)，而得到 DOdPD-hCD80 細胞。將 DOdPD-hCD80 細胞藉由 10μg/ml 之 TKMF5，於 4℃進行 20 分鐘之前處理，繼而藉由人類 CD28-EC、人類 CTLA-4-EC 或人類 PD-L1-EC 染色。在經 TKMF5 前處理之 DOdPD-hCD80 細胞中，人類 CD80 與人類 CD28-EC 及人類 CTLA-4-EC 之結合強度，顯示為無處理對照之 80%以上，相對地人類 CD80 與人類 PD-1-EC 之結合強度為無處理對照之 10%以下。此結果顯示 TKMF5 阻害人類 PD-L1-EC 與人類 CD80 之結合，然而不阻害人類 CD28-EC 及人類 CTLA-4-EC 與人類 CD80 之結合。

【0155】 調查在相同之抗原呈現細胞上存在 CD80 及 PD-L1 時，藉由 TKMF5，是否可使 PD-L1 誘發 PD-1 之阻害效果。將以 OVA 胜肽脈衝之 IIAdL1-hCD80/hCD86 或 IIAdL1-hCD80/hCD86/hPD-L1 細胞，與表現 PD-1 或缺損其之

DO11.10 細胞一起於 TKMF5 或同型對照 IgG(10μg/ml)之存在下培養。將結果示於第 49 圖。TKMF5 之添加，雖在表現 PD-1 之 DO11.10 T 細胞中，誘導了被 TCR 誘導之 IL-2 產生之阻害，然而在缺損 PD-1 之細胞中則無。此等結果，顯示 TKMF5 使抗原呈現細胞上之順式-hPD-L1 與 hCD80 之相互作用解離，而可誘發由 PD-L1 所致之 PD-1 之阻害效果。

【0156】第 50 圖展示藉由流式細胞術評估 TKMG48(左)及 16-10A1(右)對於 DOdKO 細胞之結合性的結果，其中該 DOdKO 細胞導入有小鼠 CD80、CD80 及 CD86 之 IgV 結構域及 IgC 結構域交換的嵌合分子(參照第 13 圖)(上段)、或者欠缺與小鼠 PD-L1 之結合能力的小鼠 CD80 變異體(具有 L96E 及/或 L107E 變異)(下段)。TKMG48 及 16-10A1 識別 CD80 之 IgV 區域(上段)。TKMG48 對於欠缺與 PD-L1 之結合能力的 CD80 變異體之結合性低(左)。另一方面，16-10A1 對於欠缺與 PD-L1 之結合能力的 CD80 變異體，顯示與野生型 CD80 相同程度之結合性(右)。

【0157】第 51 圖展示藉由流式細胞術評估 TKMF5(左)及 2D10(右)對於 DOdKO 細胞之結合性的結果，其中該 DOdKO 細胞導入有人類 CD80、或者欠缺與人類 PD-L1 之結合能力的人類 CD80 變異體(具有 I92E 及 L104E 變異)。TKMF5 對於欠缺與人類 PD-L1 之結合能力的人類 CD80 變異體之結合性明顯較低(左)。另一方面，2D10 對於欠缺與人類 PD-L1 之結合能力的人類 CD80 變異體，顯示與野生型人類 CD80 相同程度之結合性(右)。

【0158】評估抗小鼠 CD80 抗體(TKMG48)及抗人類 CD80 抗體(TKMF5)對於小鼠 CD80 或人類 CD80 之結合親和性。其結果，TKMG48 之平衡解離常數(KD 值)為 1.232nmol/L、TKMF5 之平衡解離常數(KD 值)為 11.44nmol/L。

[產業上之可利用性]

【0159】本發明之選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體的促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質，係作為免疫抑制劑，在自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病之預防及/或治療上有用。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 日商小野藥品工業股份有限公司
國立大學法人德島大學

<120> 免疫抑制劑

<130> 675204

<150> 2018-229774
<151> 2018-12-07

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225 230 235 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
275 280 285

<210> 2
<211> 306
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe
1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser
20 25 30

Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp
35 40 45

Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser
50 55 60

Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val
65 70 75 80

Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu
85 90 95

Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser
100 105 110

Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr
115 120 125

Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp
130 135 140

Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr
145 150 155 160

Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
165 170 175

Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile
180 185 190

Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp
195 200 205

Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly
210 215 220

Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp
225 230 235 240

Pro Pro Asp Ser Lys Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Phe Gly
245 250 255

Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys
260 265 270

Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn

275 280 285

Asn Ser Leu Thr Phe Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala Glu Gln Thr Val
290 295 300

Phe Leu
305

<210> 3
<211> 290
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 4
<211> 290
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
1 5 10 15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
35 40 45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val

50 55 60

Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

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

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
145 150 155 160

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
180 185 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
195 200 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp
225 230 235 240

Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val
245 250 255

Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys
260 265 270

Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 5
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 6
<211> 288
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp
20 25 30

Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met
50 55 60

Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala
65 70 75 80

Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln
85 90 95

Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp
100 105 110

Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val
130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala
165 170 175

Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val
180 185 190

Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp
195 200 205

Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala
210 215 220

Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro
225 230 235 240

Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly
245 250 255

Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln
260 265 270

Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 7
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Tyr Gly Asn Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn Val Arg Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Tyr Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Ser Tyr Gly Asn Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Lys Ala Gly Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Leu Ala Ser Asn Arg His Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 15
<211> 122
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

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

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

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

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

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Thr
85 90 95

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

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

Ser Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Thr
1 5

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 23
gtatggcagc aacgtcacga 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 24
gacagtggca tctacctctg 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 25
actcggcatt cgagcgaaac 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 26
gctgttcacg cccttgtaca 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 27
gttcagaaaa gatgtcagaa 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 28
gtgctctcag acccattcca 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 29
agaccctcca cagagagcac 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 30
atgctaatgg ctgaagaatc 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 31
gagacactat ctctaaaaat 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 32
ttagtagagg tctccacctt 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 33
gttcatgtga ttccctaaat 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 34
ctgaagttgc tgtgctgagg 20

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 35
tctgaaagga ccaggccc 18

<210> 36

<211> 18
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 36
ttgcgttagt ggtgtact 18

<210> 37
<211> 82
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 37
ccctgtagaa cgggagctgg acctgcttgc gttagtggtg gcctgggaaa aggaagatga 60

gcaagtgatt cagtttgtgg ca 82

<210> 38
<211> 83
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 38
ccggacttta tatgacaaca ctacctactc tcttatcatc gaaggcctgg tcctttcaga 60

ccggggcaca tacagctgtg tcg 83

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 39

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 40

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 41

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FLAG tag

<400> 41

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe
1 5 10 15

Pro Ala Thr Ala
20

<210> 43
<211> 21
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 43

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys
20

<210> 44
<211> 18
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 44
ttgcgttagt ggtgtact 18

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種免疫抑制劑，係包含促進 PD-L1 與 PD-1 結合的物質，該物質係選自抗 CD80 抗體及抗 PD-L1 抗體。

【第2項】 如申請專利範圍第 1 項所述之免疫抑制劑，其中，該物質促進與 CD80 存在於相同細胞上之 PD-L1 與 PD-1 的結合。

【第3項】 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之免疫抑制劑，其中，該物質為抗 CD80 抗體。

【第4項】 如申請專利範圍第 3 項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體阻害 CD80 與 PD-L1 之順式結合。

【第5項】 如申請專利範圍第 3 或 4 項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體與下列區域結合：包含相當於具有序列編號 1 之胺基酸序列的人類 CD80 之第 92 位之異白胺酸及/或第 104 位之白胺酸之胺基酸的區域，或包含相當於具有序列編號 2 之胺基酸序列的小鼠 CD80 之第 96 位之白胺酸及/或第 107 位之白胺酸之胺基酸的區域。

【第6項】 如申請專利範圍第 3 至 5 項中任一項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體實質上不阻害 CD80 與 CTLA-4 之結合。

【第7項】 如申請專利範圍第 3 至 6 項中任一項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，係包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列的重鏈 CDR3；及

輕鏈可變區域，係包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有

序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列的輕鏈 CDR3。

【第8項】 如申請專利範圍第 3 至 6 項中任一項所述之免疫抑制劑，其中該抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，係包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列之重鏈 CDR3；及

輕鏈可變區域，係包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列的輕鏈 CDR3。

【第9項】 如申請專利範圍第 7 項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，係包含具有與序列編號 7 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列；及

輕鏈可變區域，係包含具有與序列編號 8 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列。

【第10項】 如申請專利範圍第 8 項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 CD80 抗體包含：

重鏈可變區域，係包含具有與序列編號 15 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列；及

輕鏈可變區域，係包含具有與序列編號 16 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列。

【第11項】 如申請專利範圍第 3 項所述之免疫抑制劑，其中，對於與 CD80 之結合，該抗 CD80 抗體係與申請專利範圍第 7 至 10 項中任一項所述之抗體競合。

【第12項】 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之免疫抑制劑，其中，該物質為抗 PD-L1 抗體。

【第13項】 如申請專利範圍第 12 項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 PD-L1 抗體阻害 PD-L1 與 CD80 之順式結合。

【第14項】 如申請專利範圍第 12 或 13 項所述之免疫抑制劑，其中，該抗 PD-L1 抗體係與下列區域結合：包含相當於具有序列編號 3 之胺基酸序列的人類 PD-L1 之第 63 位之天冬醯胺酸及/或第 119 位之甘胺酸之胺基酸的區域、或包含相當於具有序列編號 4 之胺基酸序列的小鼠 PD-L1 之第 54 位之纈胺酸、第 56 位之酪胺酸及/或第 58 位之麩胺酸之胺基酸的區域。

【第15項】 如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項所述之免疫抑制劑，係為了自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病的預防及/或治療中的使用。

【第16項】 一種抗 CD80 抗體，係包含：

重鏈可變區域，係包含含有序列編號 9 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有序列編號 10 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 11 之胺基酸序列的重鏈 CDR3；及

輕鏈可變區域，係包含含有序列編號 12 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 13 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 14 之胺基酸序列的輕鏈 CDR3。

【第17項】 一種抗 CD80 抗體，係包含：

重鏈可變區域，係包含含有序列編號 17 之胺基酸序列的重鏈 CDR1、含有

序列編號 18 之胺基酸序列的重鏈 CDR2 及含有序列編號 19 之胺基酸序列的重鏈 CDR3；及

輕鏈可變區域，係包含含有序列編號 20 之胺基酸序列的輕鏈 CDR1、含有序列編號 21 之胺基酸序列的輕鏈 CDR2 及含有序列編號 22 之胺基酸序列的輕鏈 CDR3。

【第18項】 如申請專利範圍第 16 項所述之抗 CD80 抗體，係包含：

重鏈可變區域，係包含具有與序列編號 7 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列；及

輕鏈可變區域，係包含具有與序列編號 8 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列。

【第19項】 如申請專利範圍第 17 項所述之抗 CD80 抗體，係包含：

重鏈可變區域，係包含具有與序列編號 15 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列；及

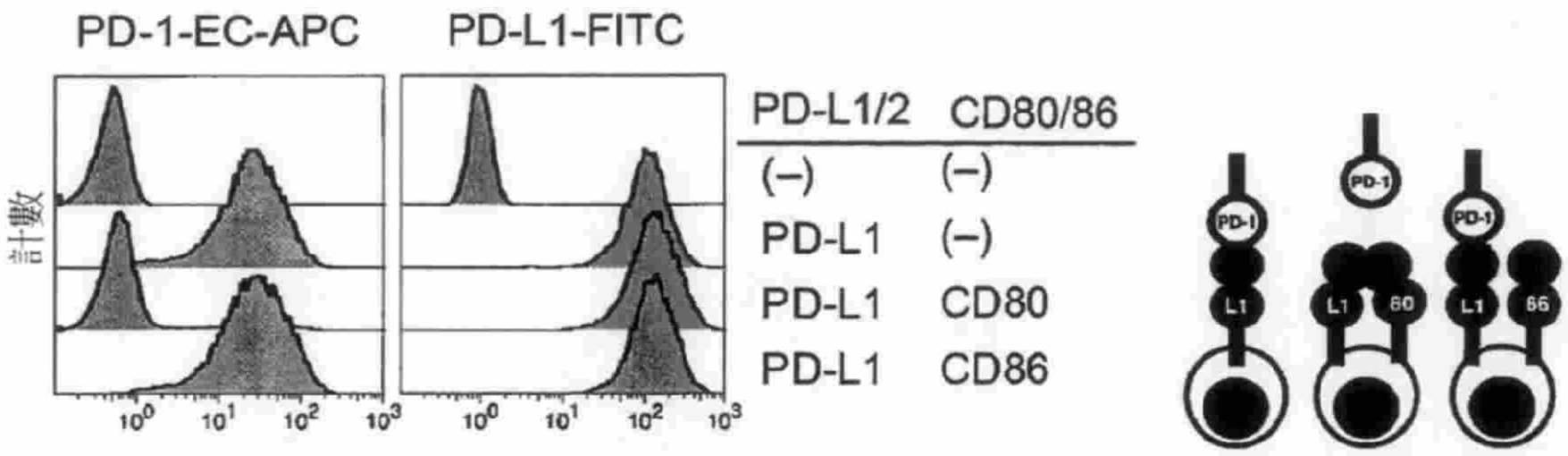
輕鏈可變區域，係包含具有與序列編號 16 之胺基酸序列 90%以上相同性之胺基酸序列。

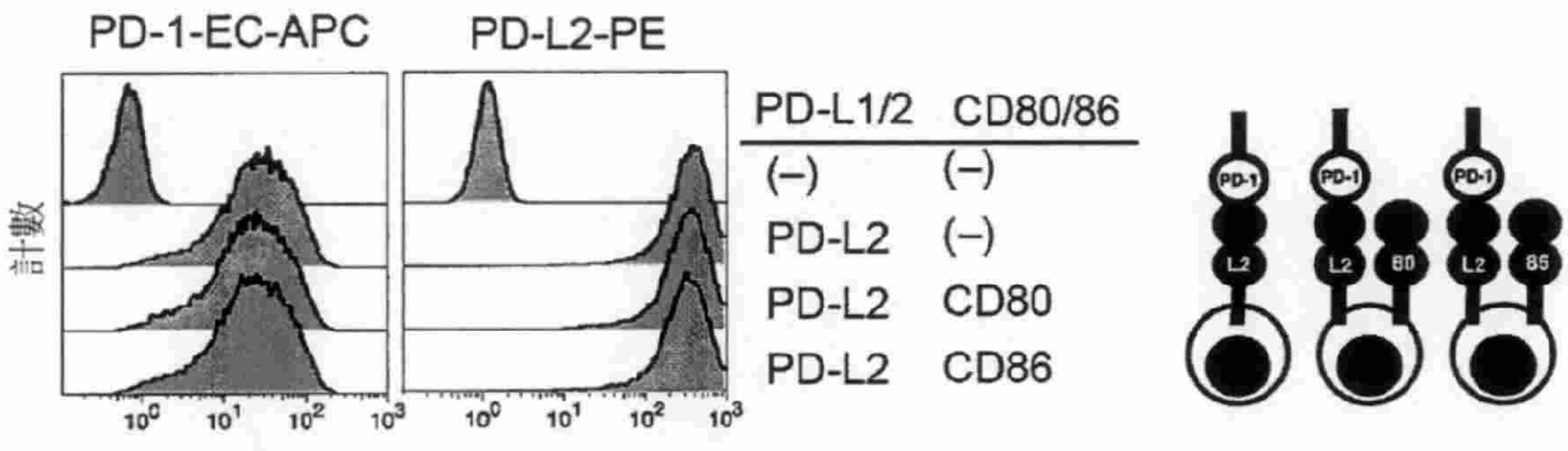
【第20項】 一種抗 CD80 抗體，對於與 CD80 之結合，該抗 CD80 抗體係與申請專利範圍第 16 至 19 項中任一項所述之抗 CD80 抗體競合。

【第21項】 一種免疫抑制劑，係包含申請專利範圍第 16 至 20 項中任一項所述之抗 CD80 抗體作為有效成分。

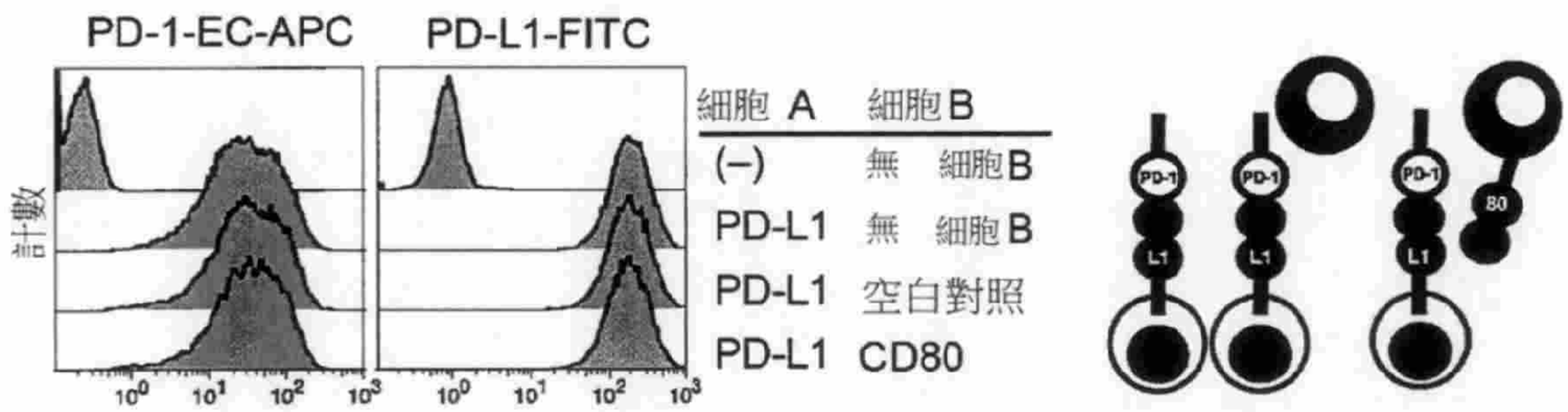
【第22項】 一種自體免疫疾病、過敏疾病或對移植物之宿主病之預防及/或治療劑，係包含申請專利範圍第16至20項中任一項所述之抗CD80抗體作為有效成分。

【發明圖式】

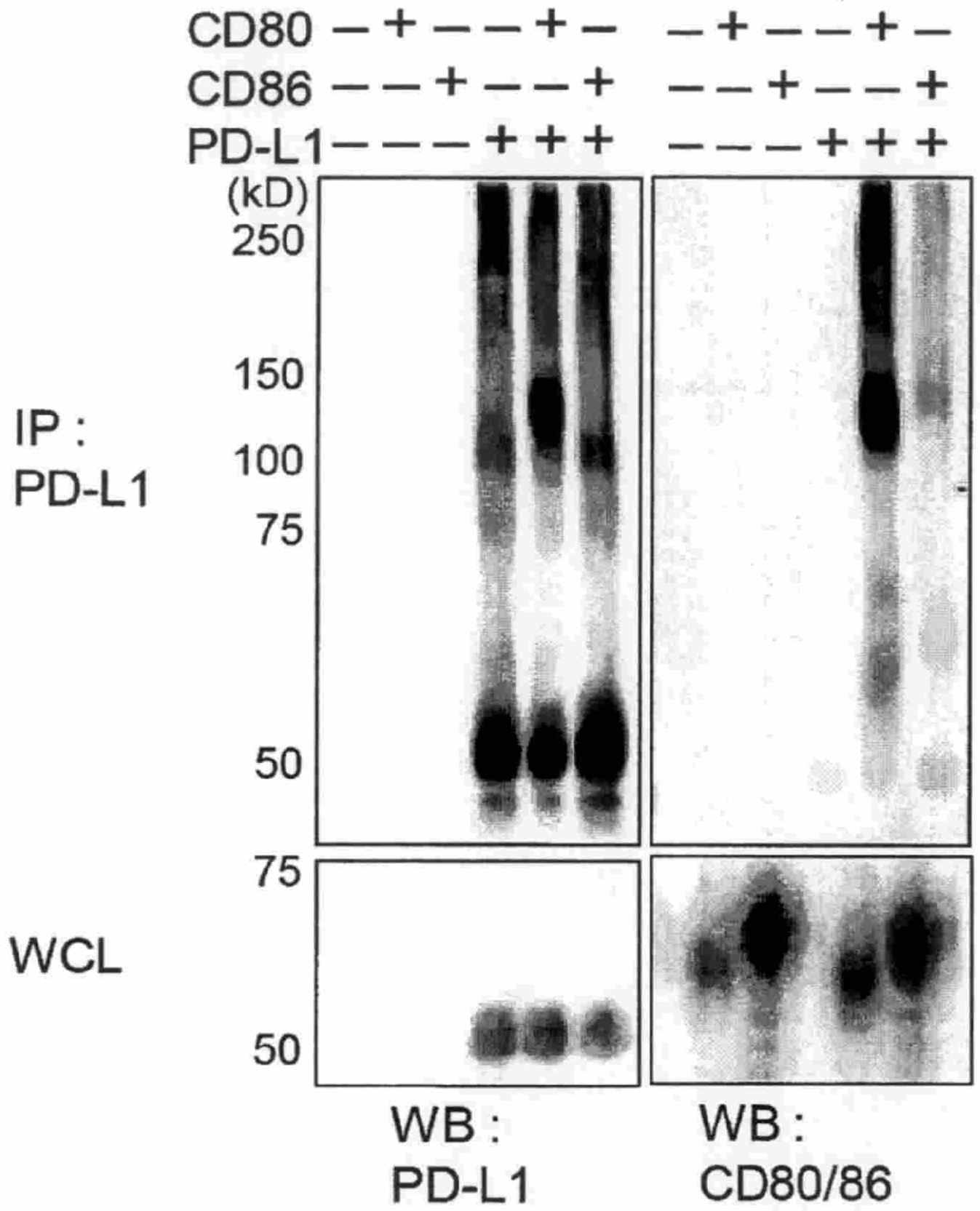

PD-1-EC-APC
PD-L1-FITC
計數
PD-L1/2 CD80/86
(–) (–)
PD-L1 (–)
PD-L1 CD80
PD-L1 CD86
PD-1
L1
80
86


PD-1-EC-APC
PD-L2-PE
計數
PD-L1/2 CD80/86
(–) (–)
PD-L2 (–)
PD-L2 CD80
PD-L2 CD86
PD-1
L2
80
85

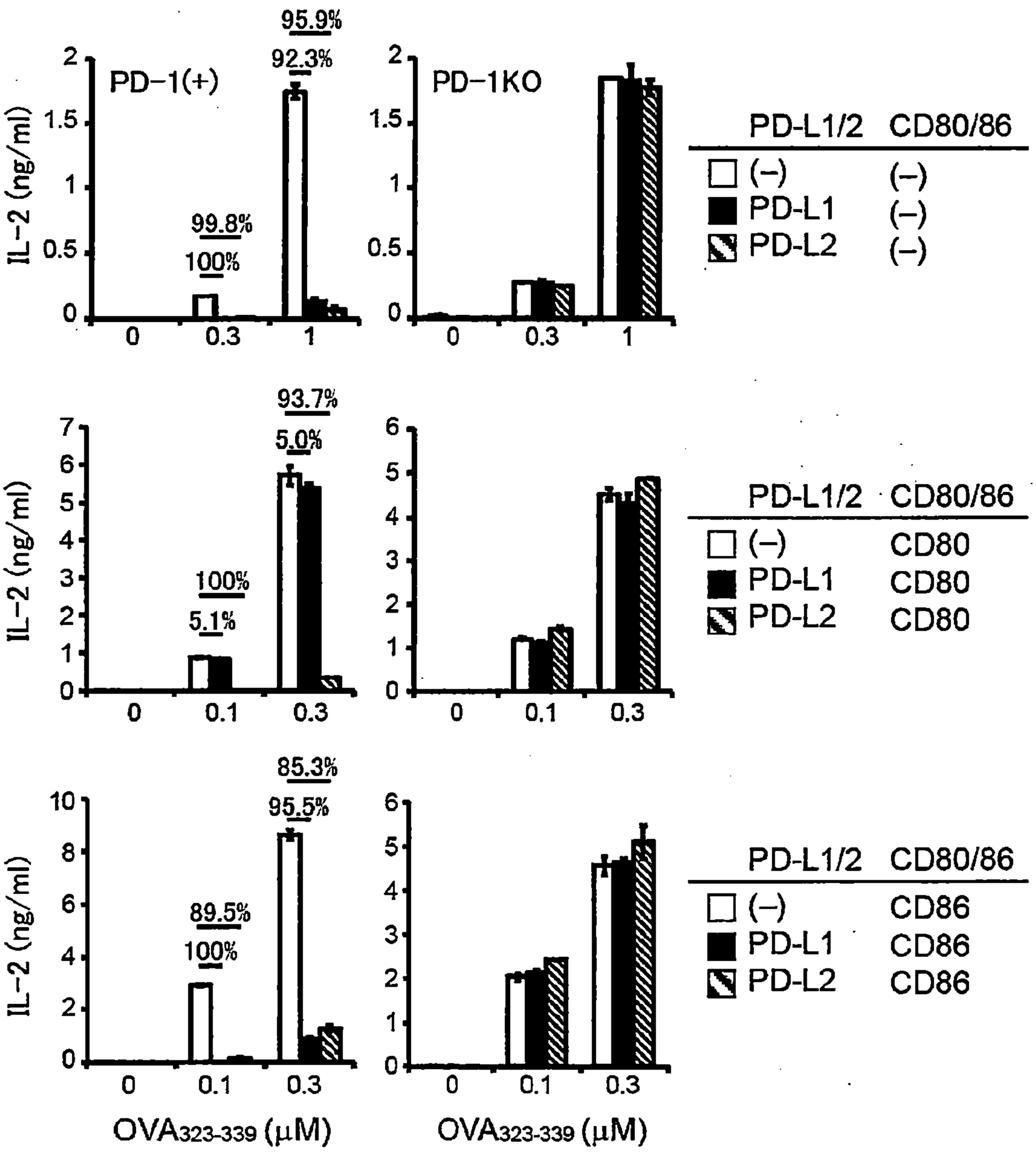
【第1圖】


PD-1-EC-APC
PD-L1-FITC
計數
細胞 A 細胞B
(–) 無 細胞B
PD-L1 無 細胞B
PD-L1 空白對照
PD-L1 CD80
PD-1
L1
80

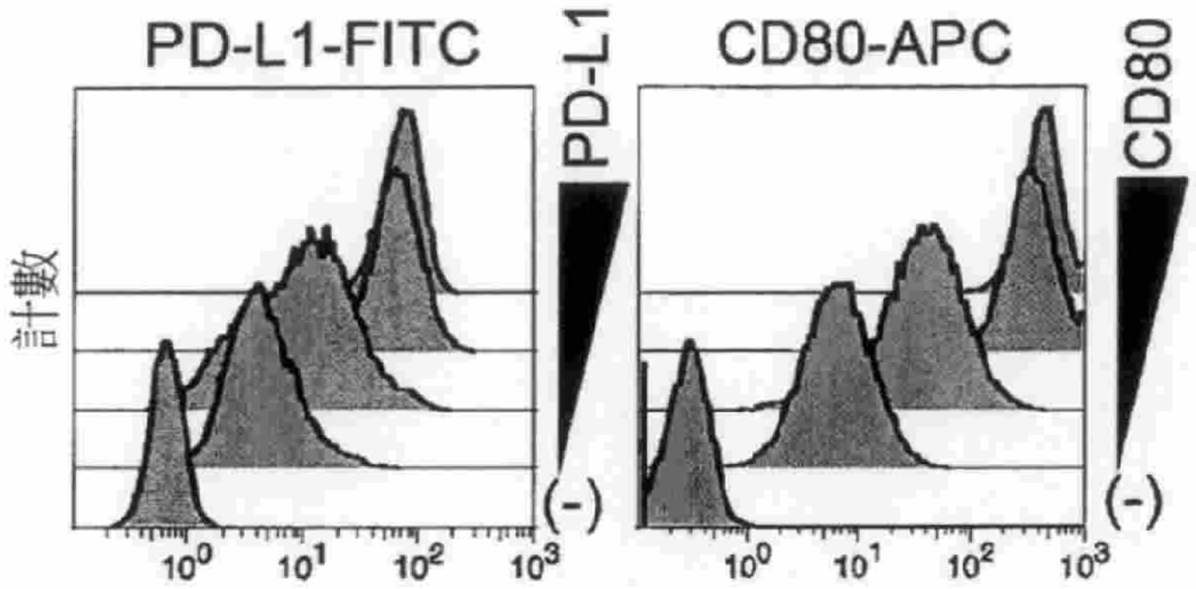
【第2圖】


CD80 – + – – + –
CD86 – – + – – +
PD-L1 – – – + + +
(kD)
250
150
100
75
50
IP :
PD-L1
75
50
WCL
WB :
PD-L1
WB :
CD80/86

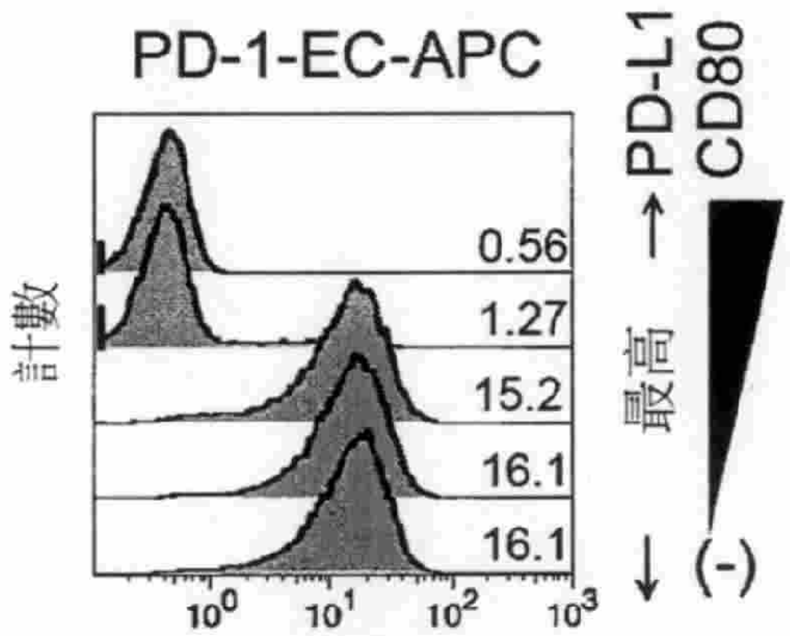
【第3圖】


PD-1(+)
PD-1KO
IL-2 (ng/ml)
95.9%
92.3%
99.8%
100%
93.7%
5.0%
100%
5.1%
85.3%
95.5%
89.5%
100%
OVA323-339 (μM)
PD-L1/2 CD80/86
(–) (–)
PD-L1 (–)
PD-L2 (–)
(–) CD80
PD-L1 CD80
PD-L2 CD80
(–) CD86
PD-L1 CD86
PD-L2 CD86

【第4圖】



【第5圖】



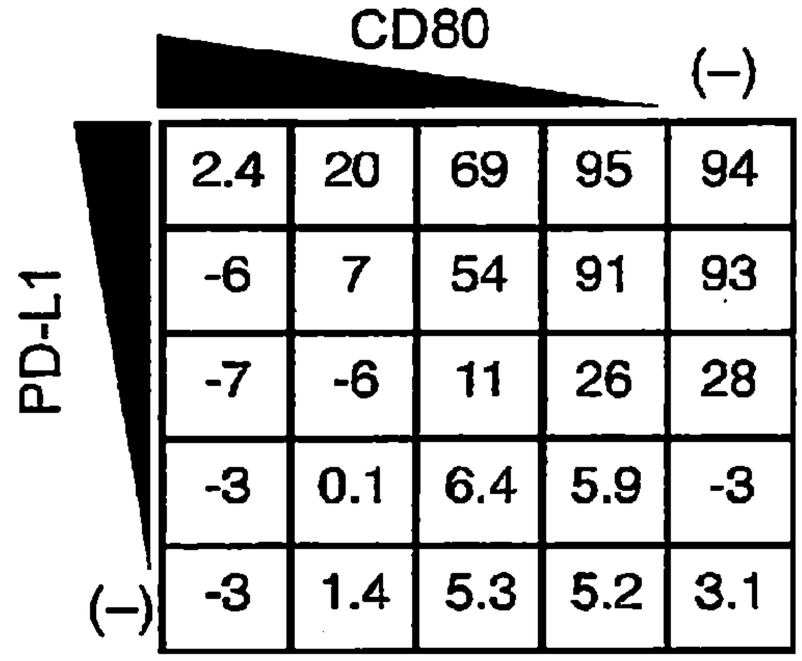
【第6圖】

CD80 (–)

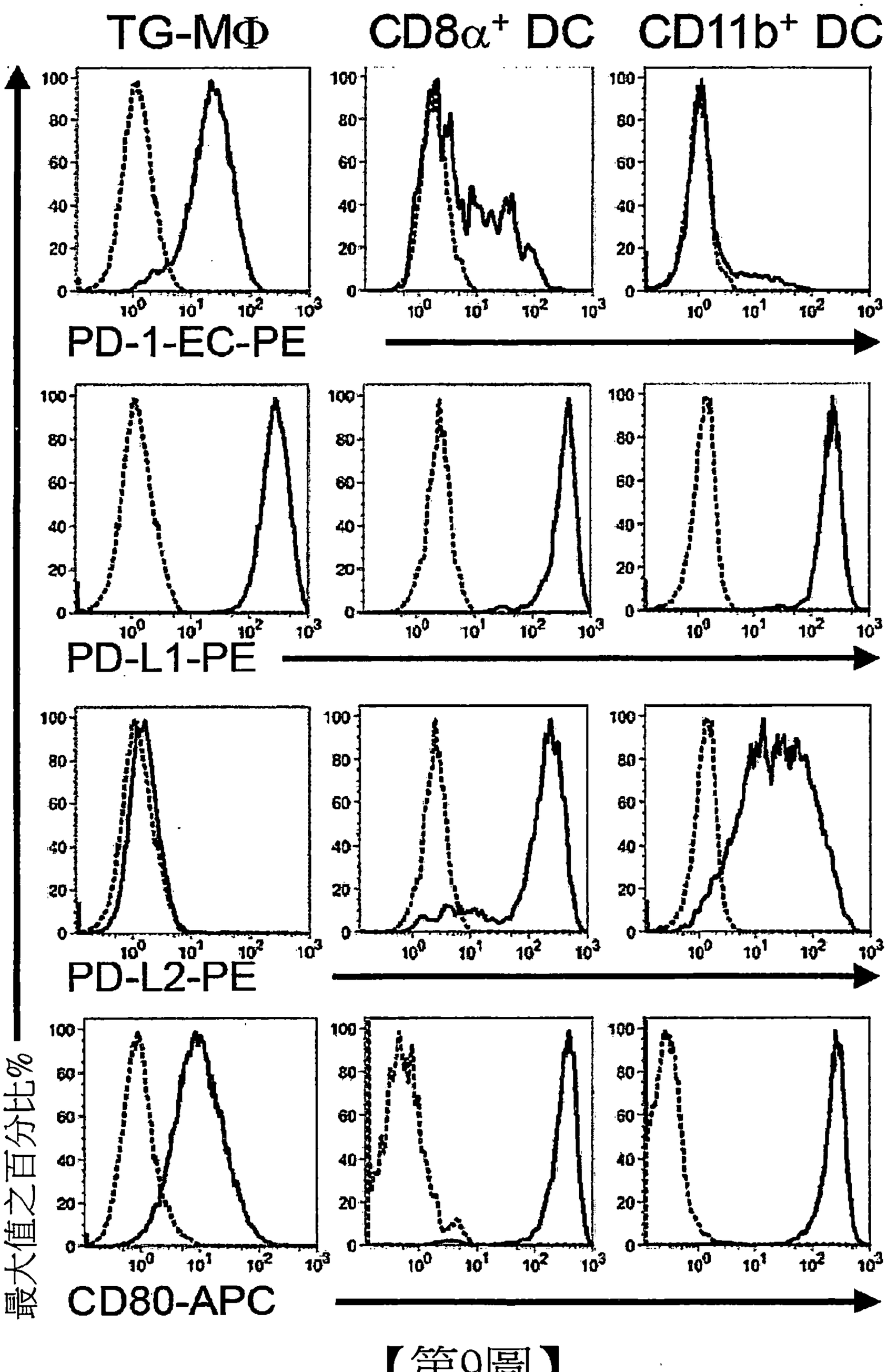
PD-L1					
	3.3	7.6	89	97	92
	5.4	11	87	100	95
	2.6	3.2	7.7	13	13
	2.5	2.4	2.9	3.7	4.1
(–)	2.5	2.5	2.4	2.4	2.4

PD-1-EC 結合 (%)

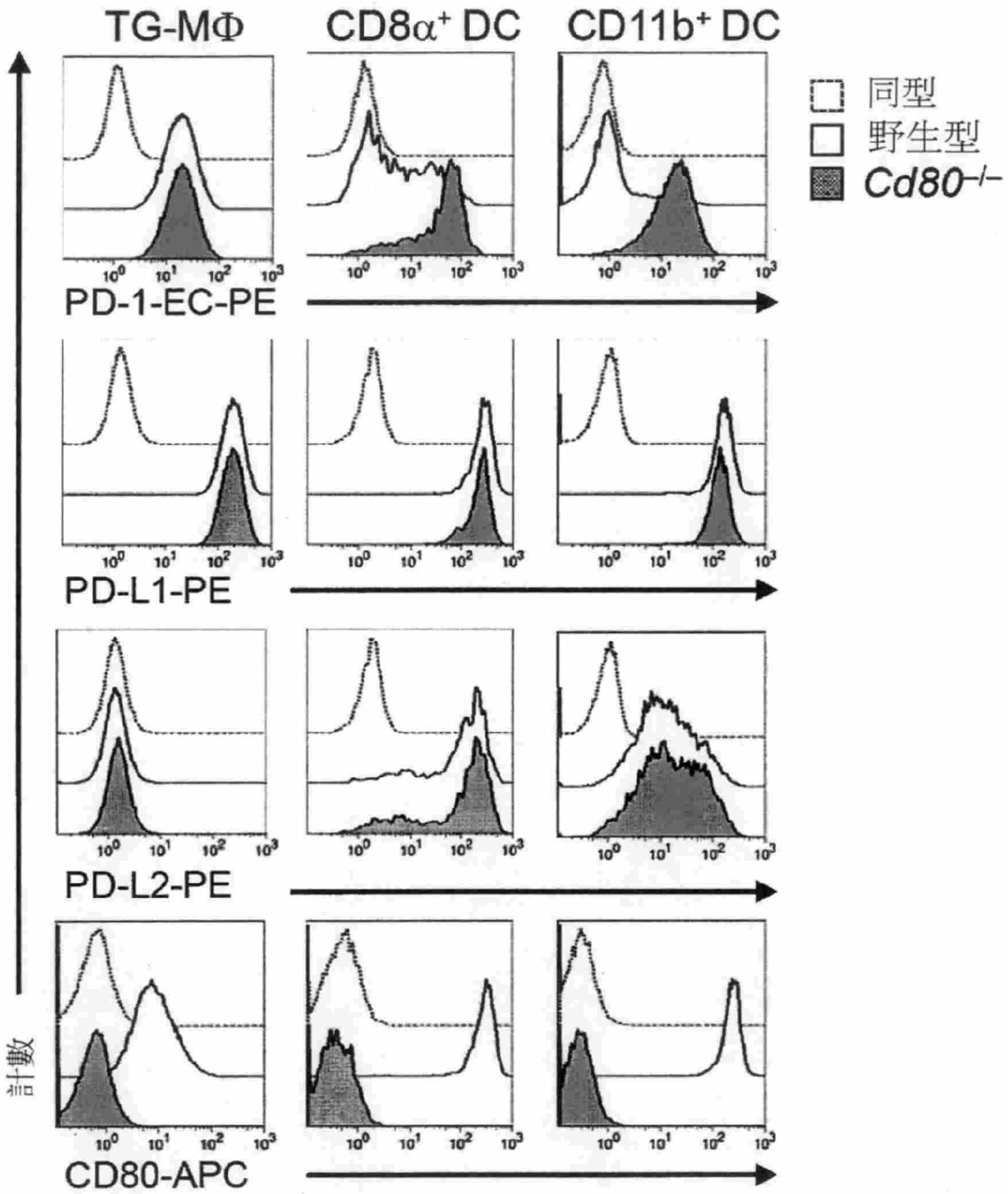
【第7圖】


CD80
(–)
PD-L1
(–)
2.4 20 69 95 94
-6 7 54 91 93
-7 -6 11 26 28
-3 0.1 6.4 5.9 -3
-3 1.4 5.3 5.2 3.1
IL-2之降低 (%)

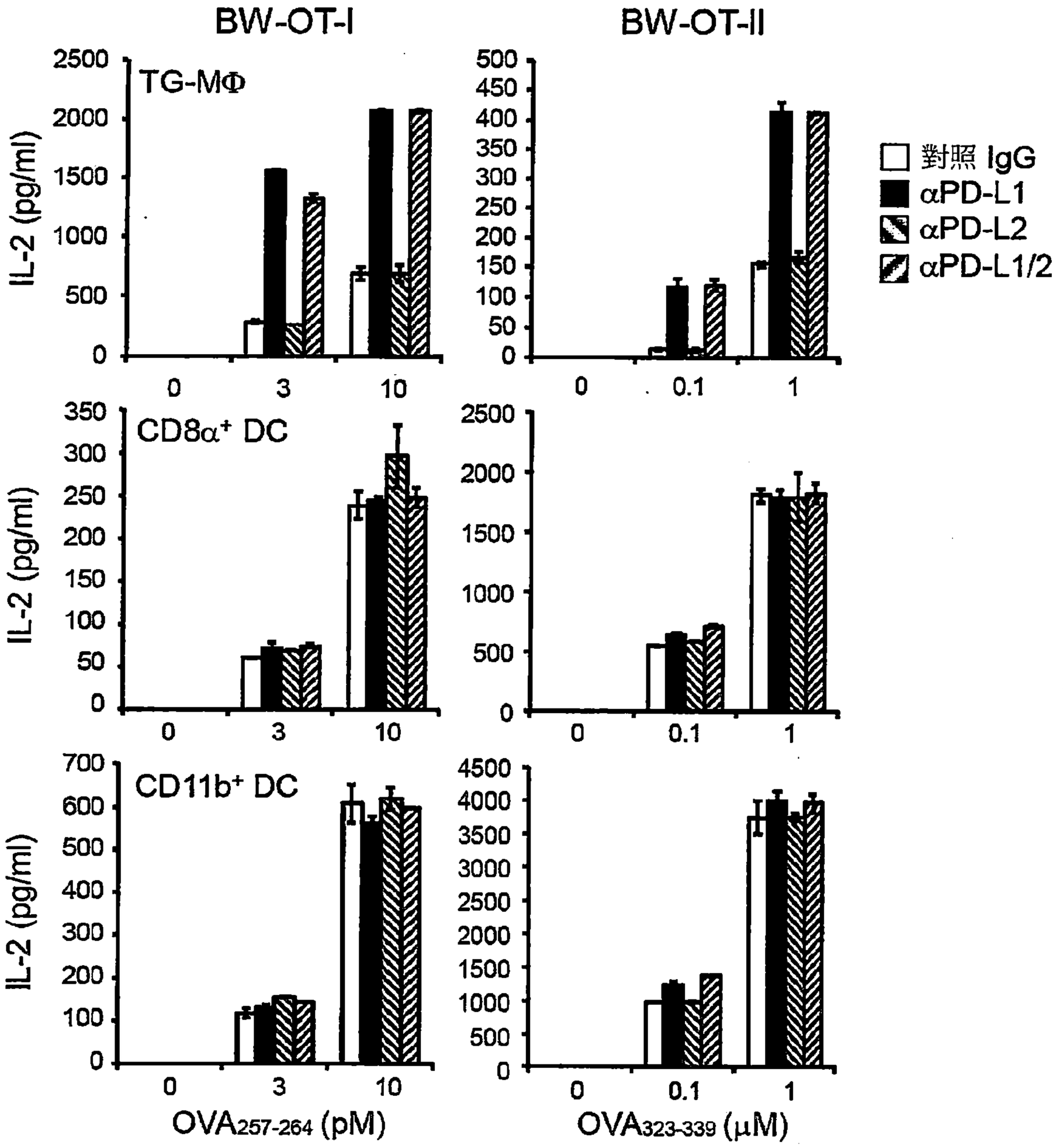
【第8圖】


TG-MΦ
CD8α+ DC
CD11b+ DC
PD-1-EC-PE
PD-L1-PE
PD-L2-PE
CD80-APC
大值之百分比%
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3

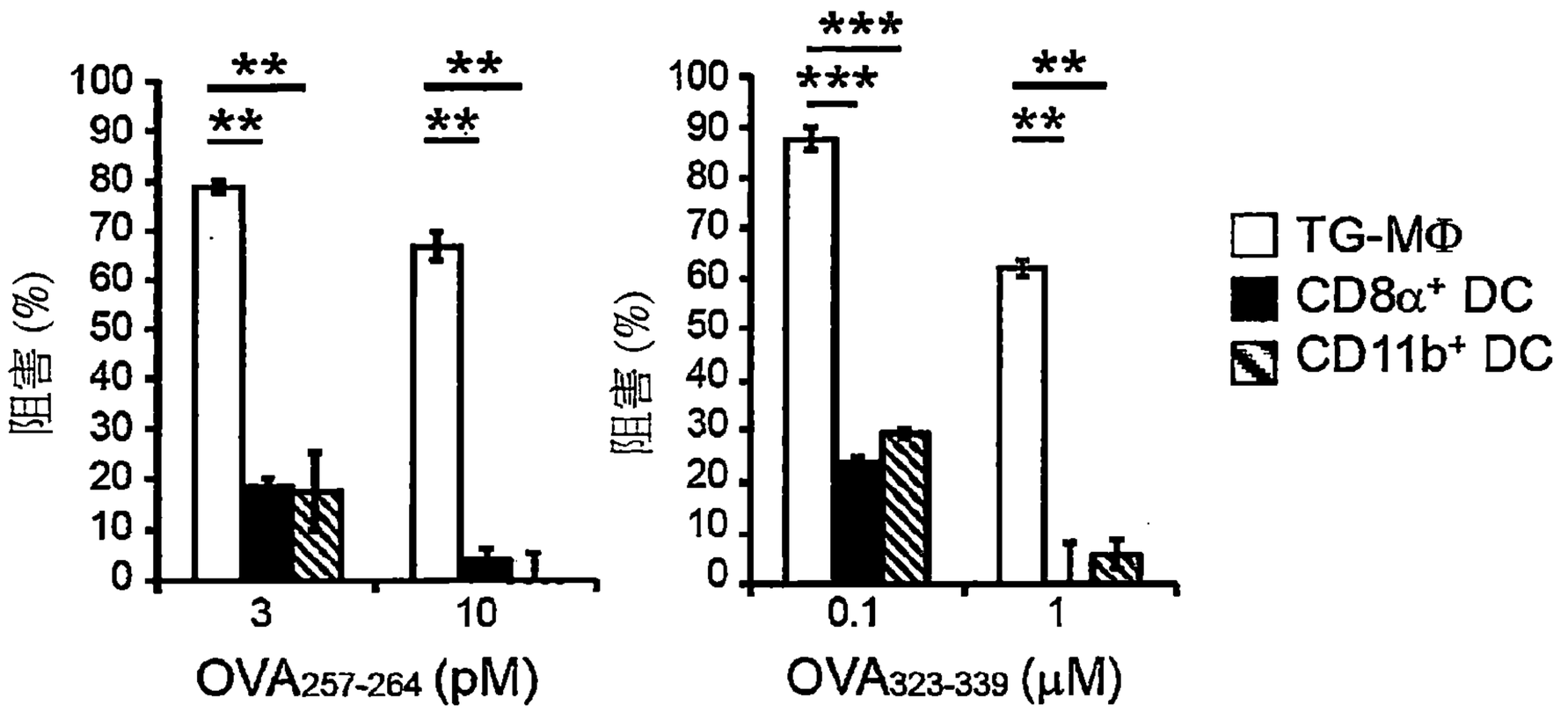
【第9圖】


TG-MΦ
CD8α+ DC
CD11b+ DC
同型
野生型
Cd80−/−
PD-1-EC-PE
PD-L1-PE
PD-L2-PE
CD80-APC
細胞數
10^0
10^1
10^2
10^3

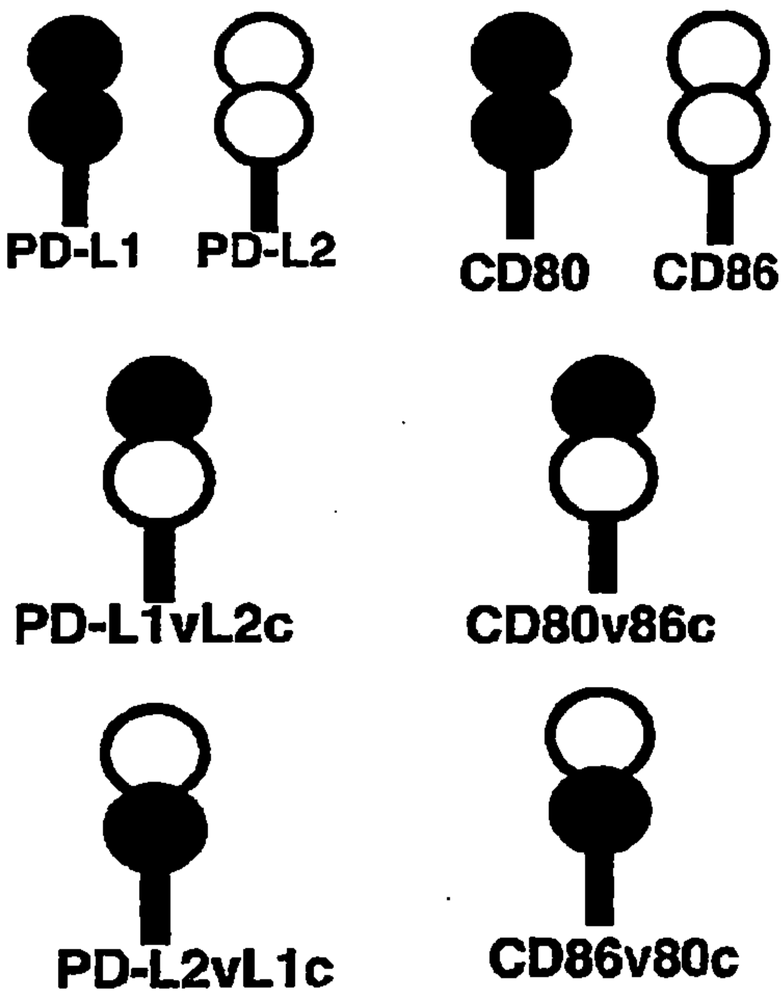
【第10圖】


BW-OT-I
BW-OT-II
TG-MΦ
CD8α+ DC
CD11b+ DC
IL-2 (pg/ml)
OVA257-264 (pM)
OVA323-339 (μM)
對照 IgG
αPD-L1
αPD-L2
αPD-L1/2

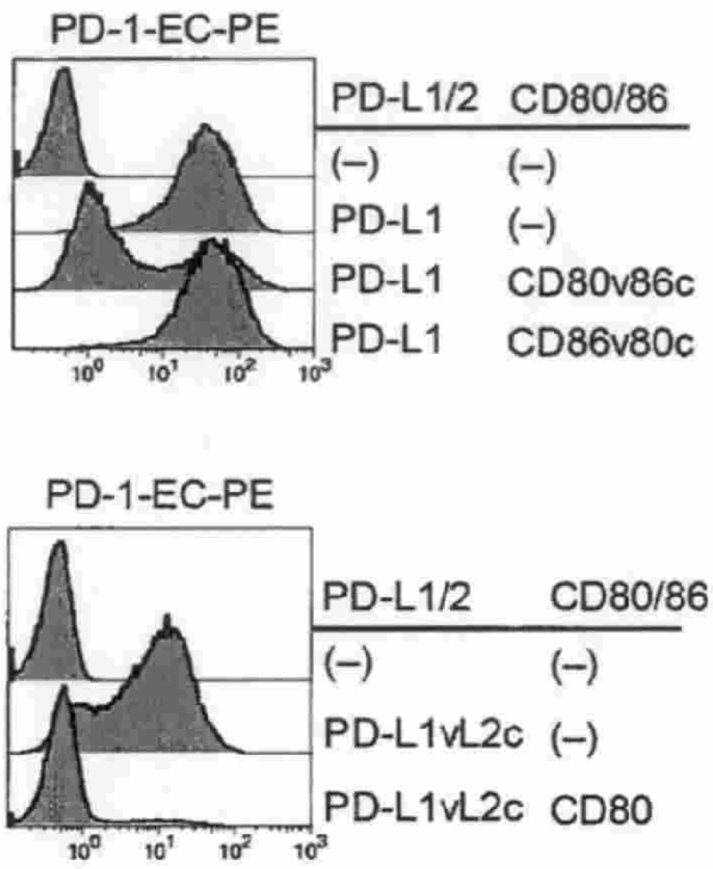
【第11圖】

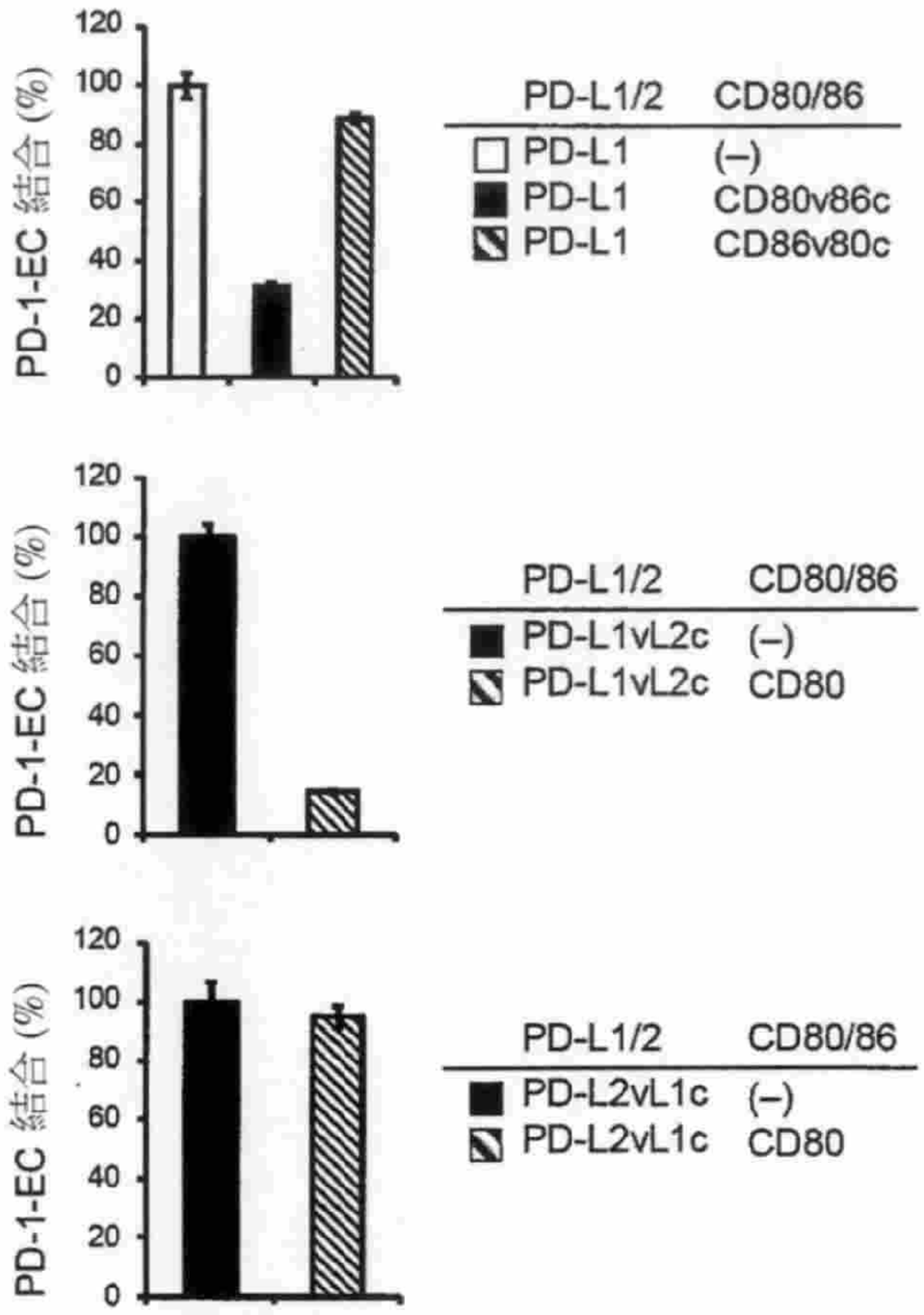

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
阻害 (%)
**
**
**
**
3
10
OVA257-264 (pM)
***
***
**
**
0.1
1
OVA323-339 (μM)
TG-MΦ
CD8α+ DC
CD11b+ DC

【第12圖】

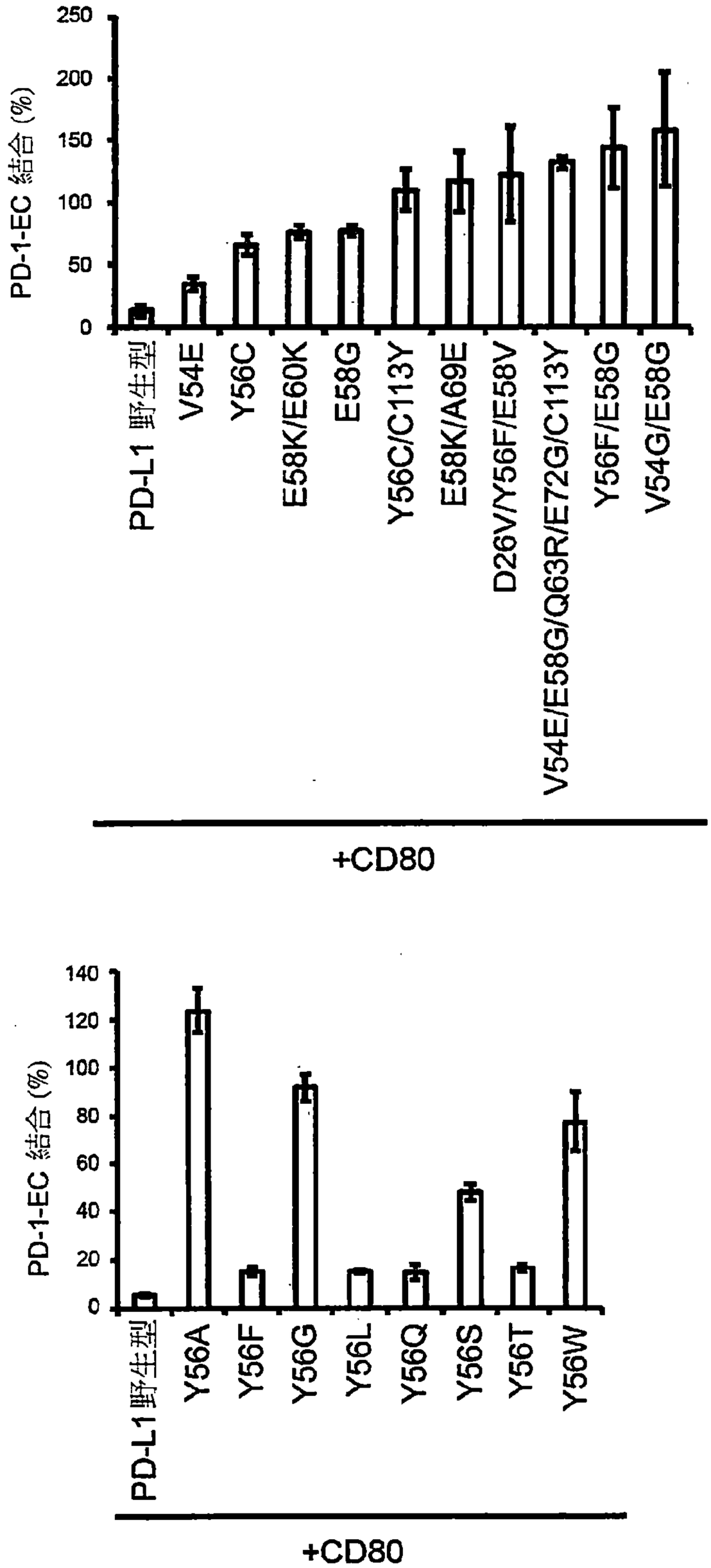

PD-L1
PD-L2
CD80
CD86
PD-L1vL2c
CD80v86c
PD-L2vL1c
CD86v80c

【第13圖】

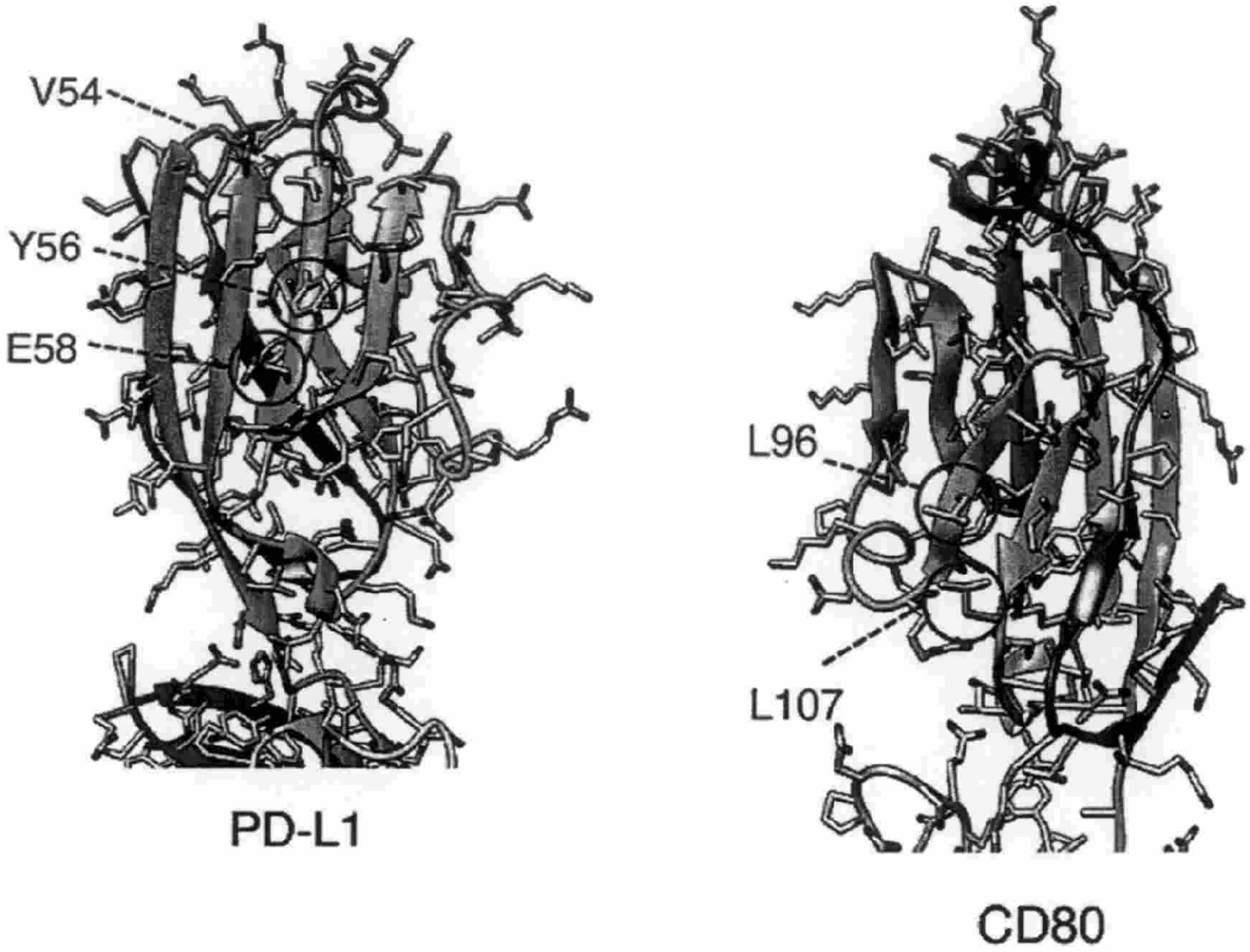

PD-1-EC-PE
PD-L1/2 CD80/86
(–) (–)
PD-L1 (–)
PD-L1 CD80v86c
PD-L1 CD86v80c
PD-1-EC-PE
PD-L1/2 CD80/86
(–) (–)
PD-L1vL2c (–)
PD-L1vL2c CD80
PD-1-EC-PE
PD-L1/2 CD80/86
(–) (–)
PD-L2vL1c (–)
PD-L2vL1c CD80
10^0 10^1 10^2 10^3


PD-1-EC 結合 (%)
120
100
80
60
40
20
0
PD-L1/2 CD80/86
PD-L1 (–)
PD-L1 CD80v86c
PD-L1 CD86v80c
PD-L1/2 CD80/86
PD-L1vL2c (–)
PD-L1vL2c CD80
PD-L1/2 CD80/86
PD-L2vL1c (–)
PD-L2vL1c CD80

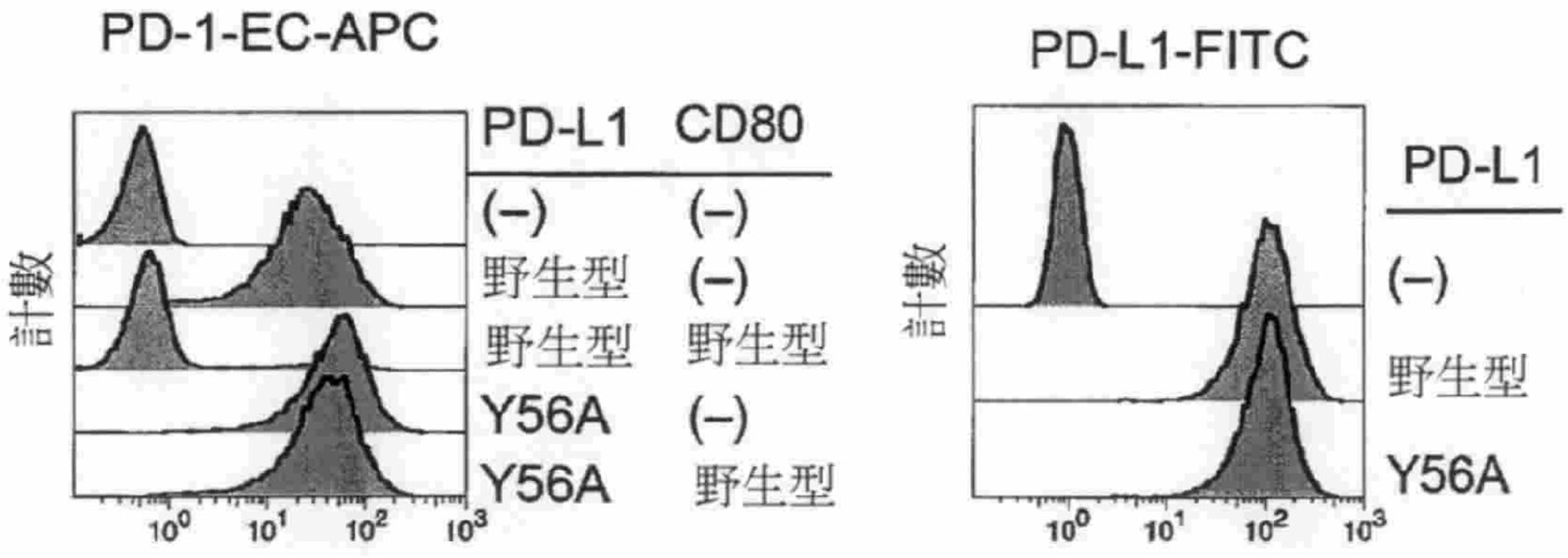
【第14圖】


PD-1-EC 結合 (%)
250
200
150
100
50
0
PD-L1 野生型
V54E
Y56C
E58K/E60K
E58G
Y56C/C113Y
E58K/A69E
D26V/Y56F/E58V
V54E/E58G/Q63R/E72G/C113Y
Y56F/E58G
V54G/E58G
+CD80
PD-1-EC 結合 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
PD-L1 野生型
Y56A
Y56F
Y56G
Y56L
Y56Q
Y56S
Y56T
Y56W
+CD80

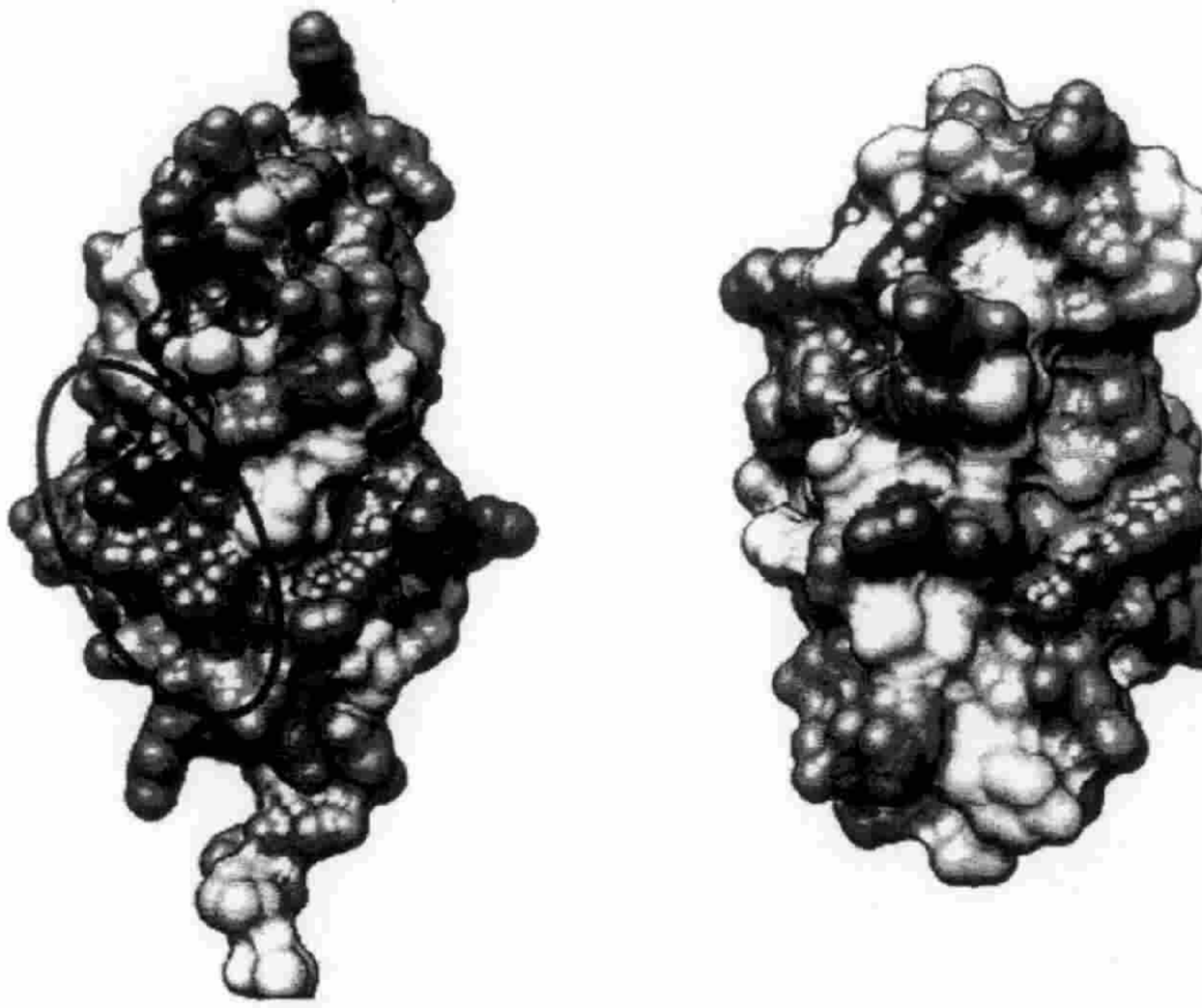
【第15圖】


V54
Y56
E58
PD-L1
L96
L107
CD80

【第16圖】


PD-1-EC-APC
PD-L1 CD80
(–) (–)
野生型 (–)
野生型 野生型
Y56A (–)
Y56A 野生型
計數
PD-L1-FITC
PD-L1
(–)
野生型
Y56A
計數

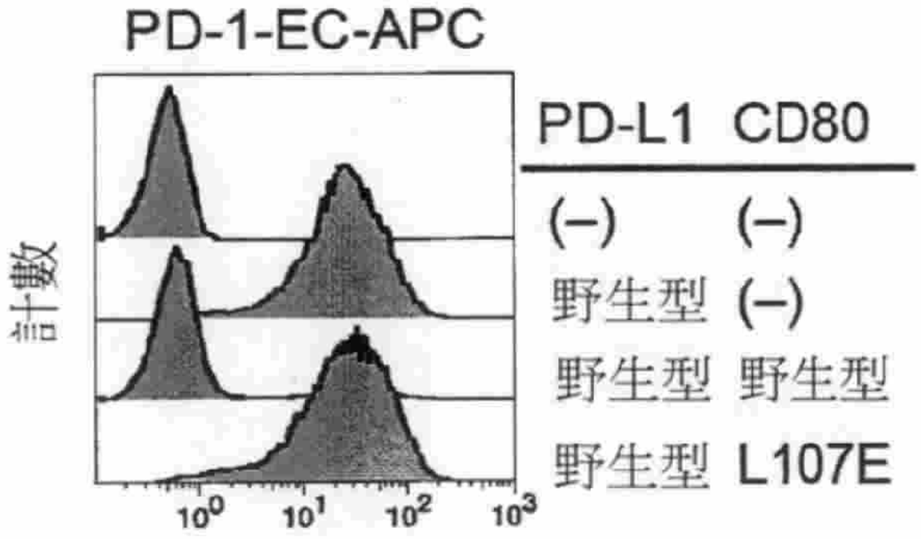
【第17圖】

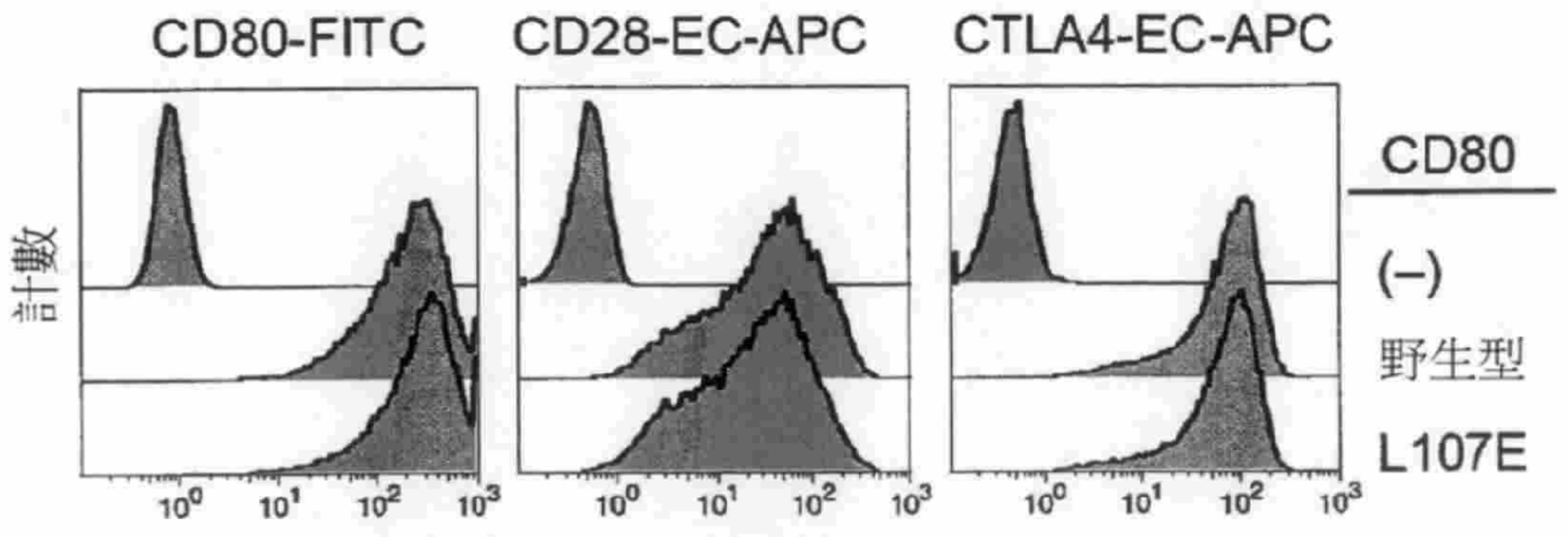


hCD80
(PDB ID:1DR9)

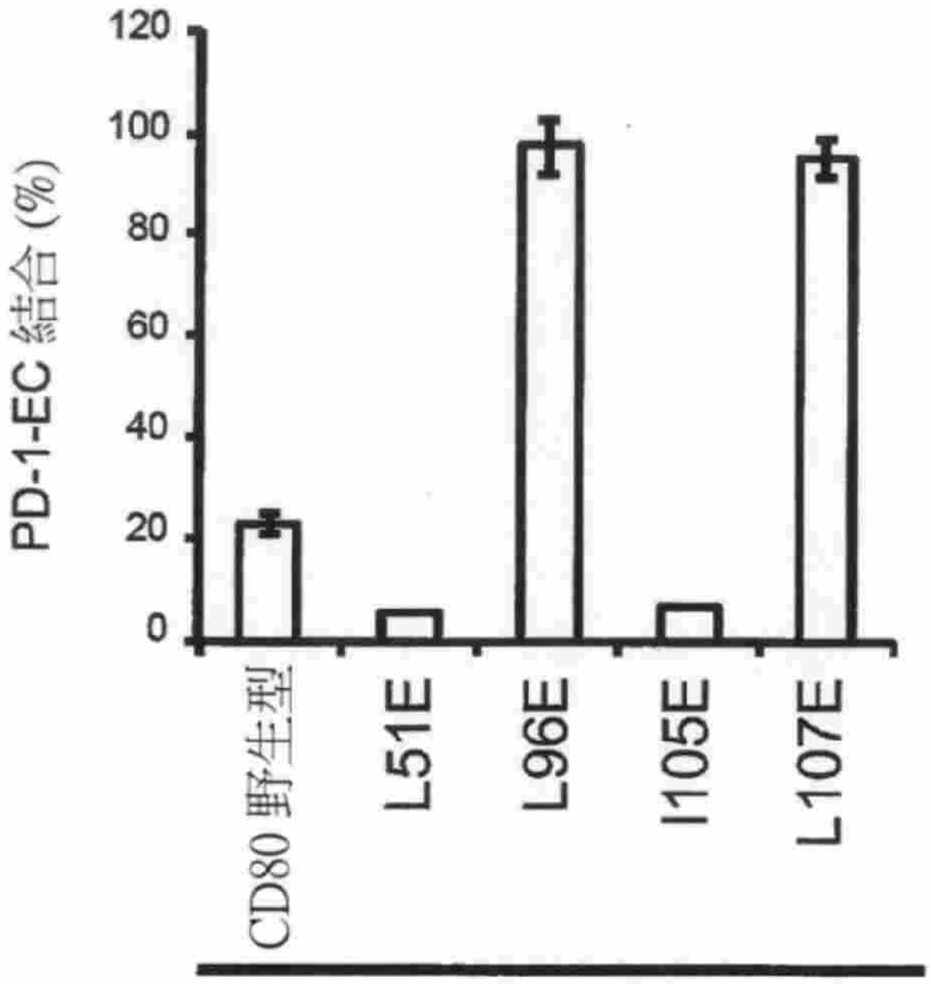
hCD86
(PDB ID:1NCN)

【第18圖】

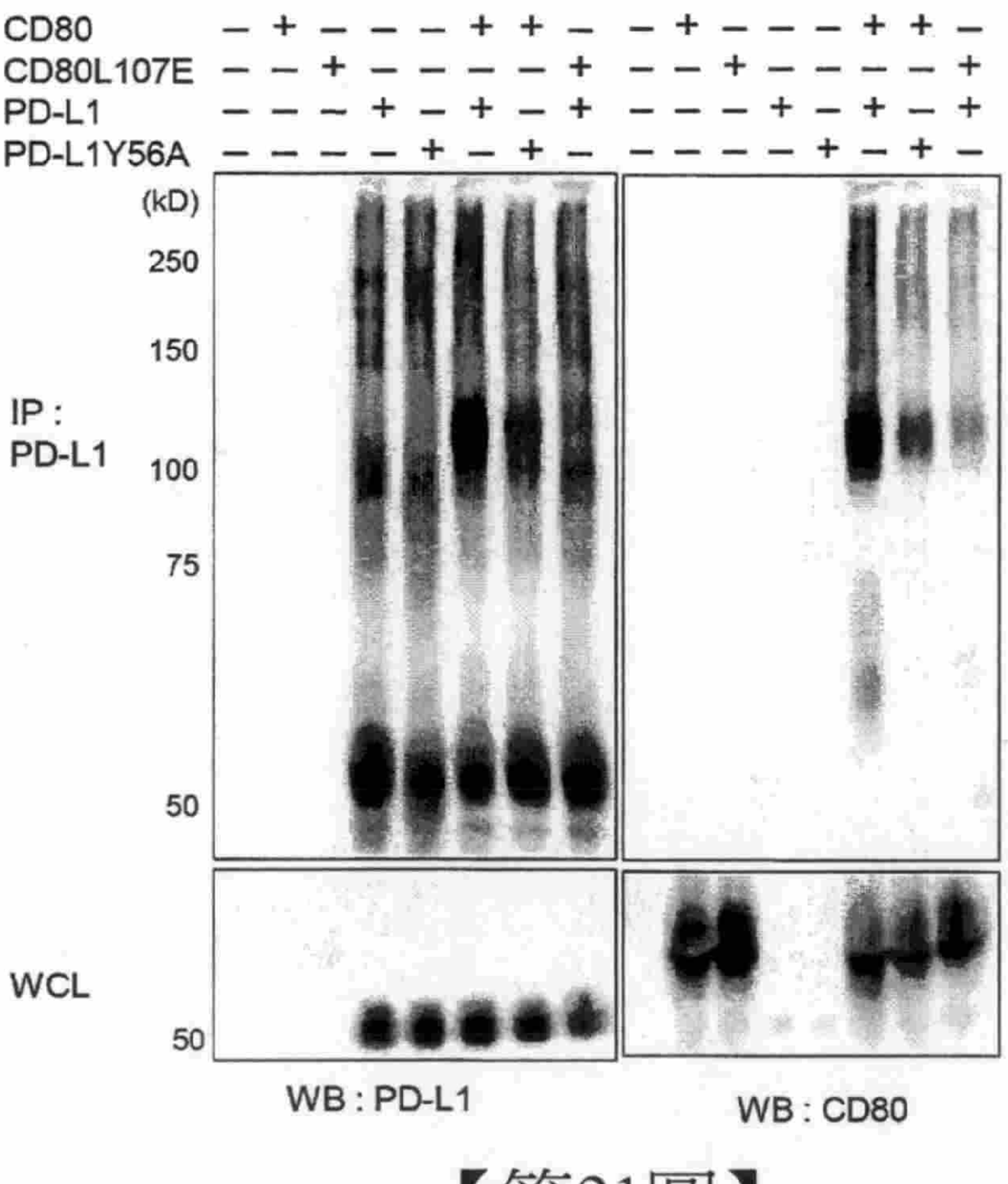




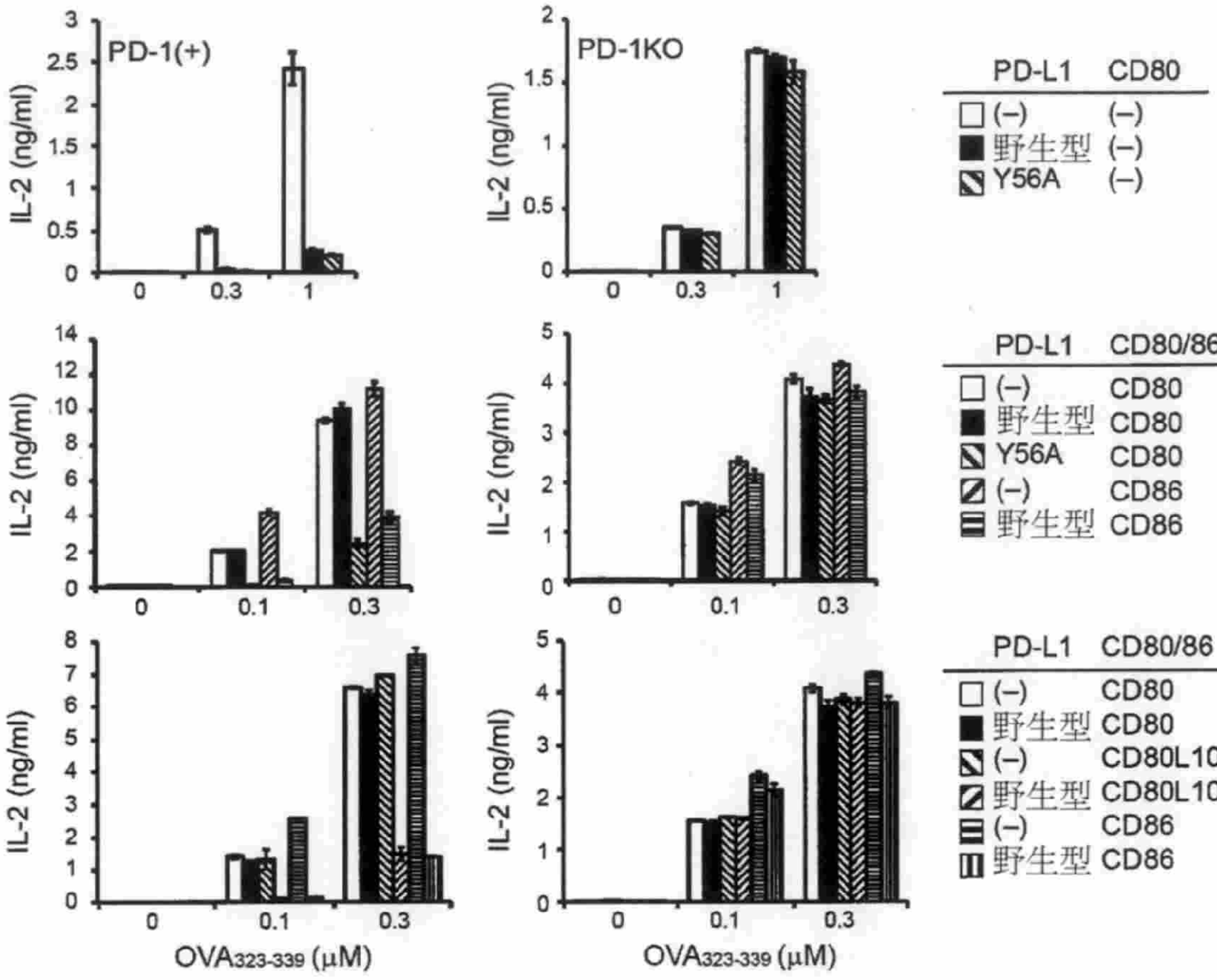
【第19圖】


PD-1-EC 結合 (%)
120
100
80
60
40
20
0
CD80 野生型
L51E
L96E
I105E
L107E
+PD-L1

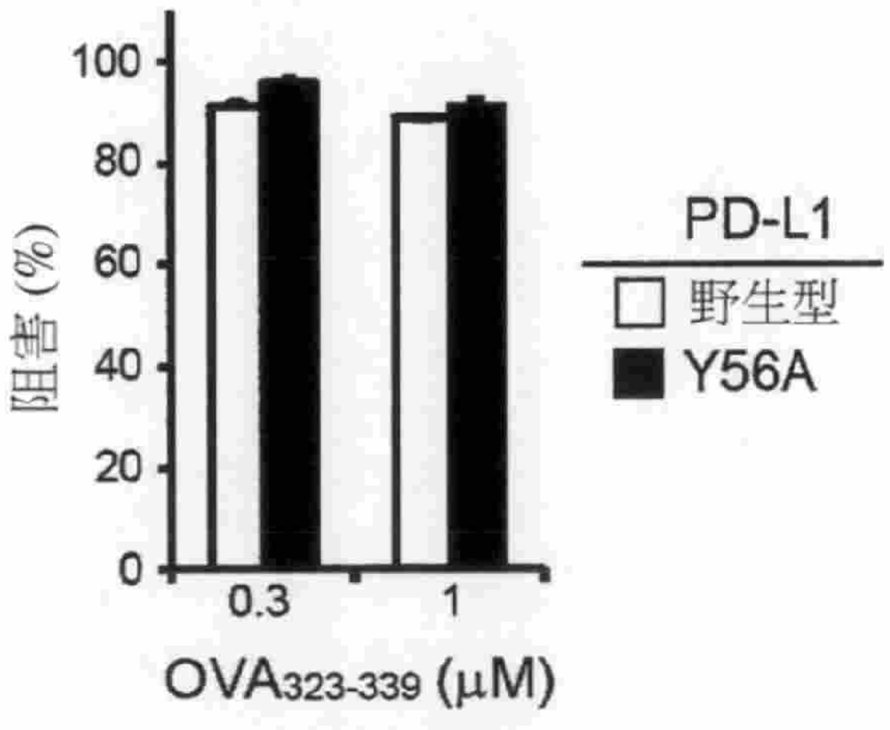
【第20圖】


CD80 – + – – – + + – – + – – – + + –
CD80L107E – – + – – – – + – – + – – – – +
PD-L1 – – – + – + – + – – – + – + – +
PD-L1Y56A – – – – + – + – – – – – + – + –
(kD)
250
150
IP :
PD-L1
100
75
50
WCL
50
WB : PD-L1
WB : CD80

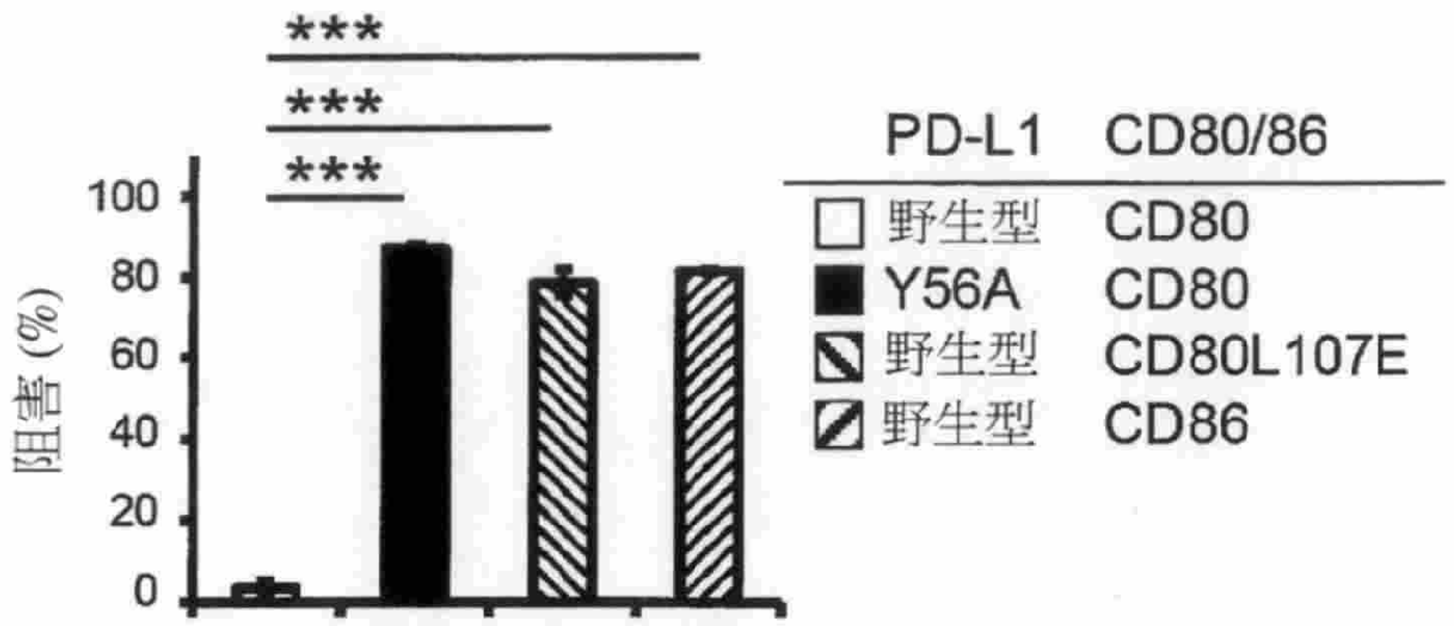
【第21圖】


PD-1(+)
PD-1KO
IL-2 (ng/ml)
OVA323-339 (μM)
PD-L1 CD80
(–) (–)
野生型 (–)
Y56A (–)
PD-L1 CD80/86
(–) CD80
野生型 CD80
Y56A CD80
(–) CD86
野生型 CD86
(–) CD80L107E
野生型 CD80L107E

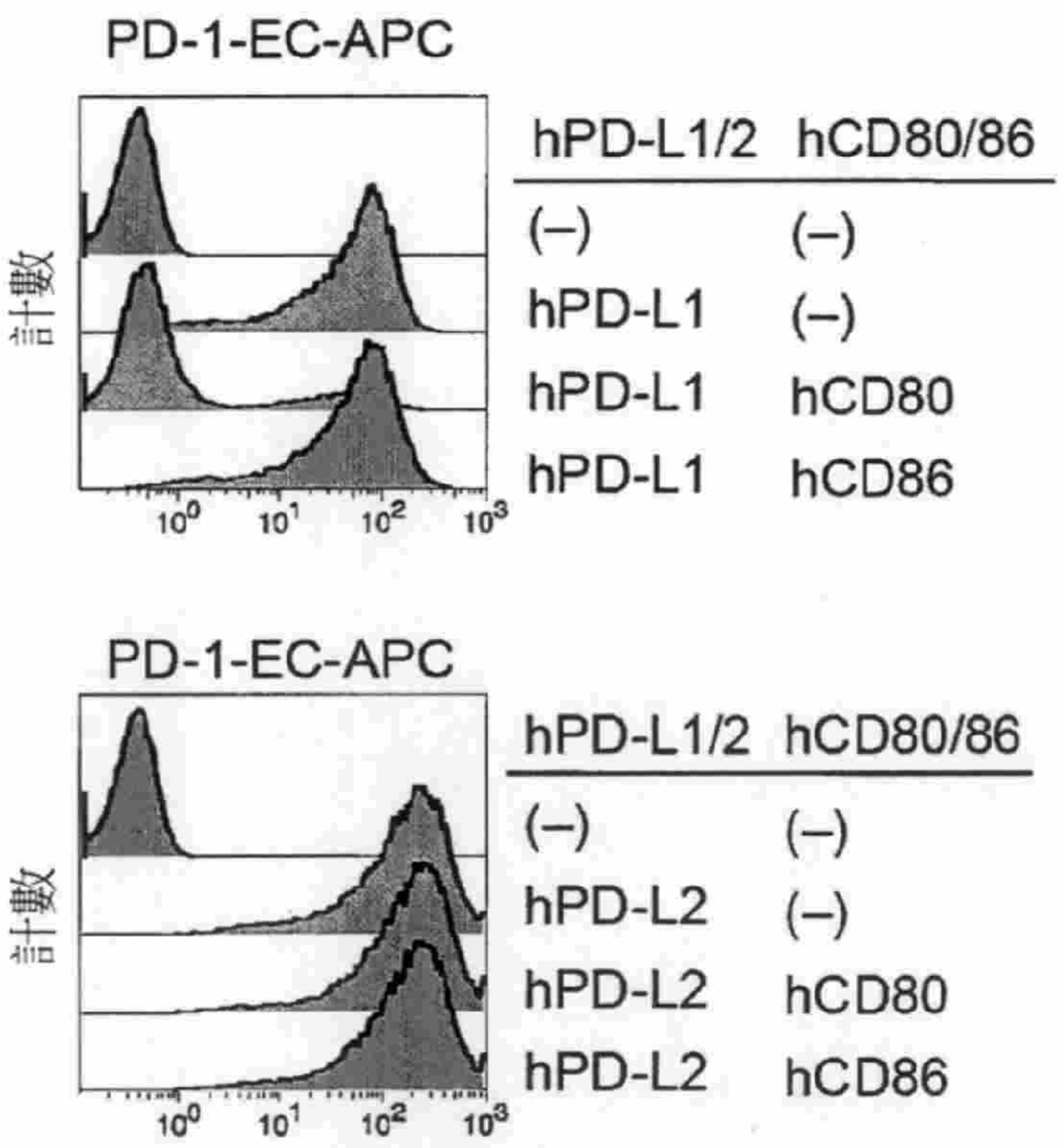
【第22圖】


阻害 (%)
OVA323-339 (μM)
PD-L1
野生型
Y56A

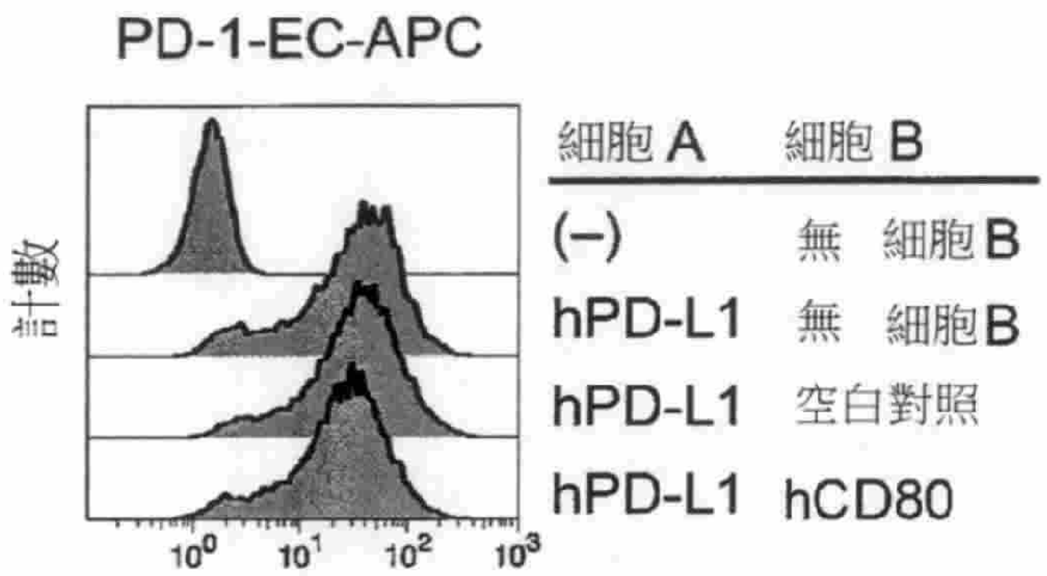
【第23圖】


***
***
***
100
80
60
40
20
0
阻害 (%)
PD-L1 CD80/86
野生型 CD80
Y56A CD80
野生型 CD80L107E
野生型 CD86

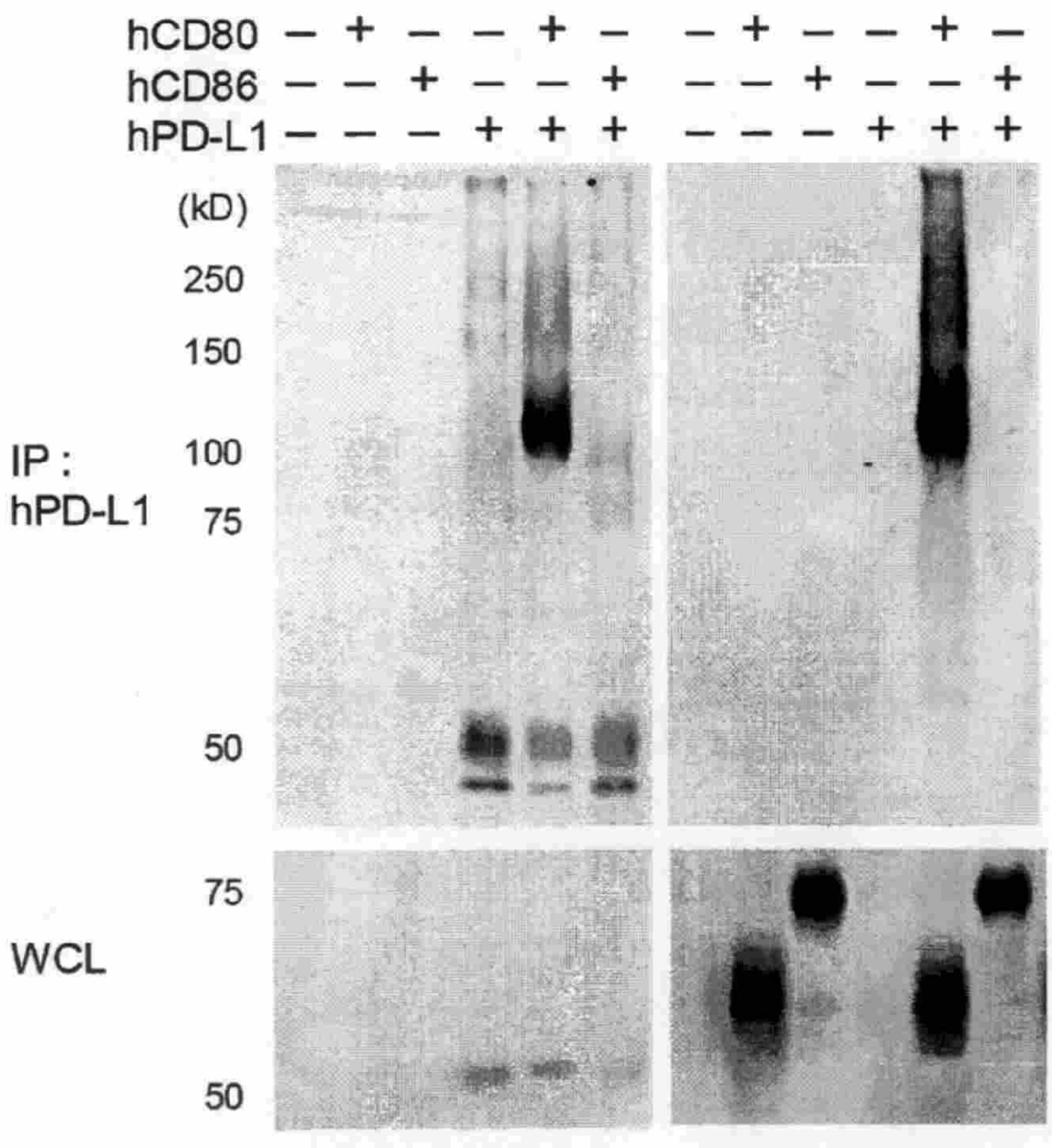
【第24圖】


PD-1-EC-APC
計數
10^0 10^1 10^2 10^3
hPD-L1/2 hCD80/86
(–) (–)
hPD-L1 (–)
hPD-L1 hCD80
hPD-L1 hCD86
PD-1-EC-APC
計數
10^0 10^1 10^2 10^3
hPD-L1/2 hCD80/86
(–) (–)
hPD-L2 (–)
hPD-L2 hCD80
hPD-L2 hCD86

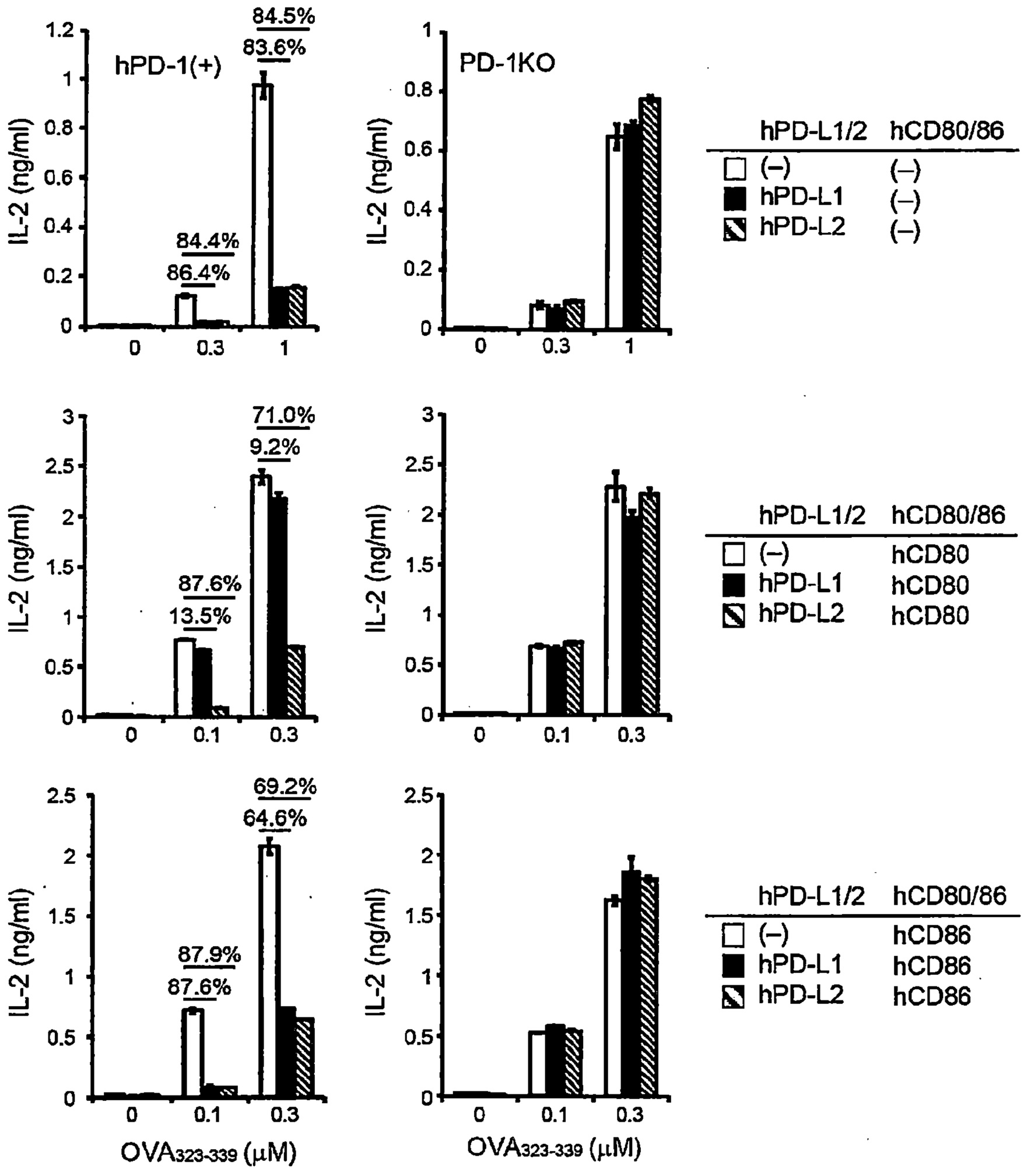
【第25圖】


PD-1-EC-APC
計數
10^0
10^1
10^2
10^3
細胞 A 細胞 B
(–) 無 細胞B
hPD-L1 無 細胞B
hPD-L1 空白對照
hPD-L1 hCD80

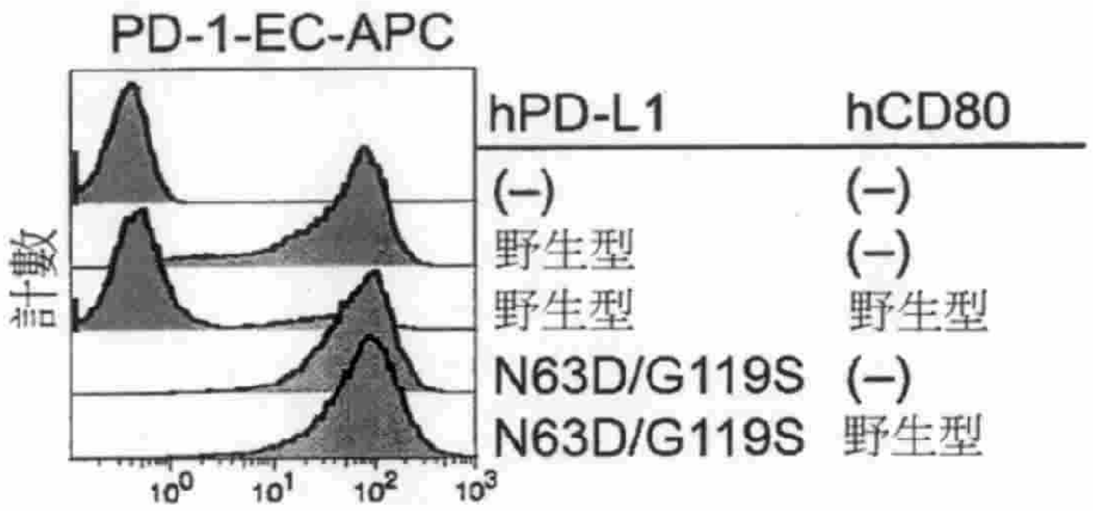
【第26圖】

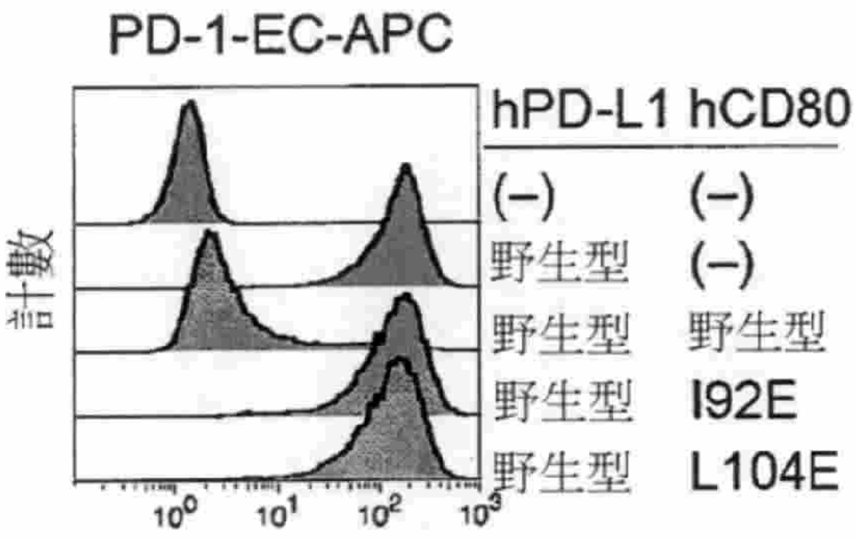

hCD80 – + – – + – – + – – + –
hCD86 – – + – – + – – + – – +
hPD-L1 – – – + + + – – – + + +
(kD)
250
150
100
75
50
IP :
hPD-L1
75
50
WCL
WB : hPD-L1
WB : hCD80/86

【第27圖】

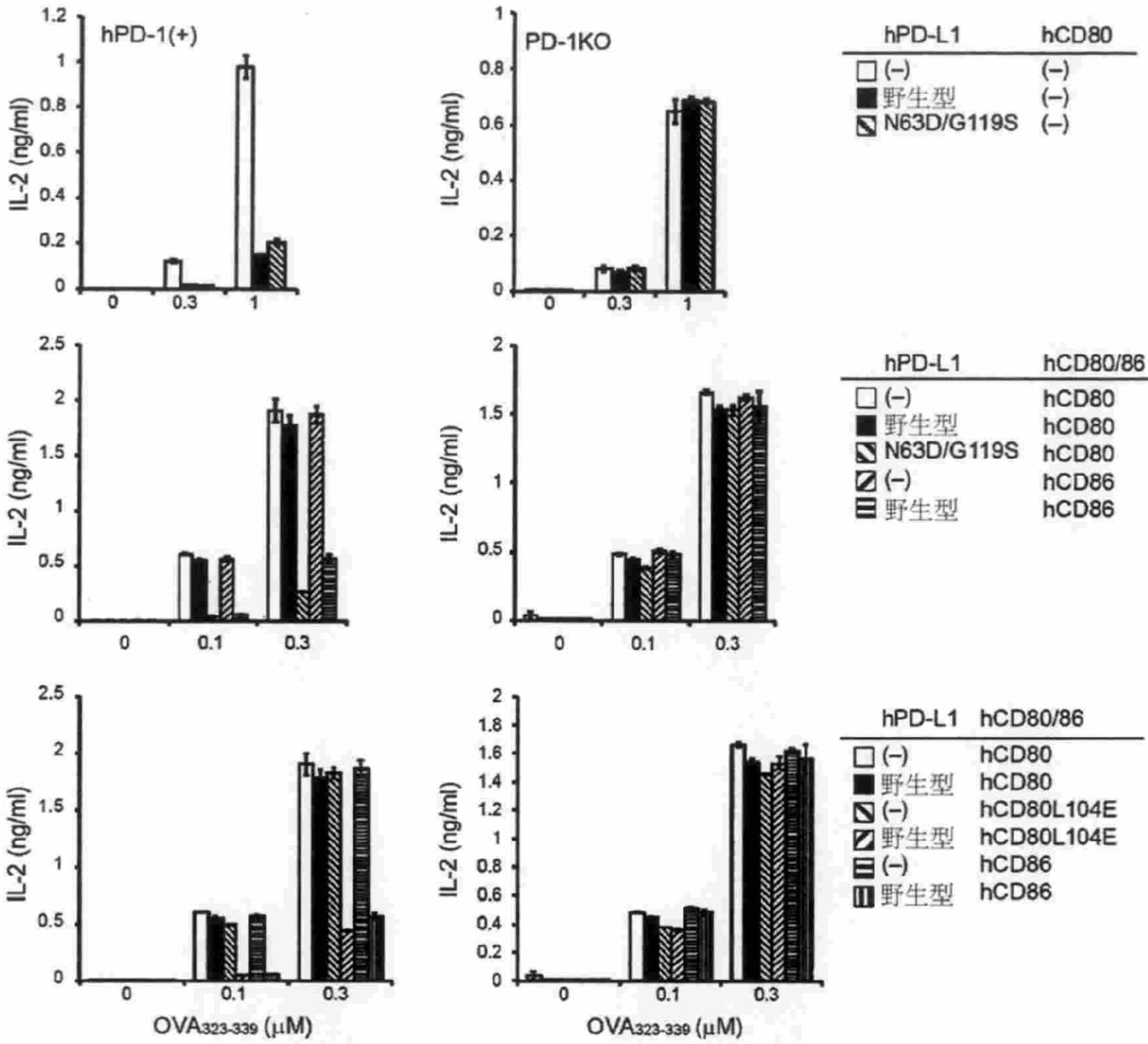

hPD-1(+)
PD-1KO
IL-2 (ng/ml)
84.5%
83.6%
84.4%
86.4%
71.0%
9.2%
87.6%
13.5%
69.2%
64.6%
87.9%
87.6%
0
0.3
1
0.1
OVA323-339 (μM)
hPD-L1/2
hCD80/86
(–)
hPD-L1
hPD-L2
hCD80
hCD86

【第28圖】

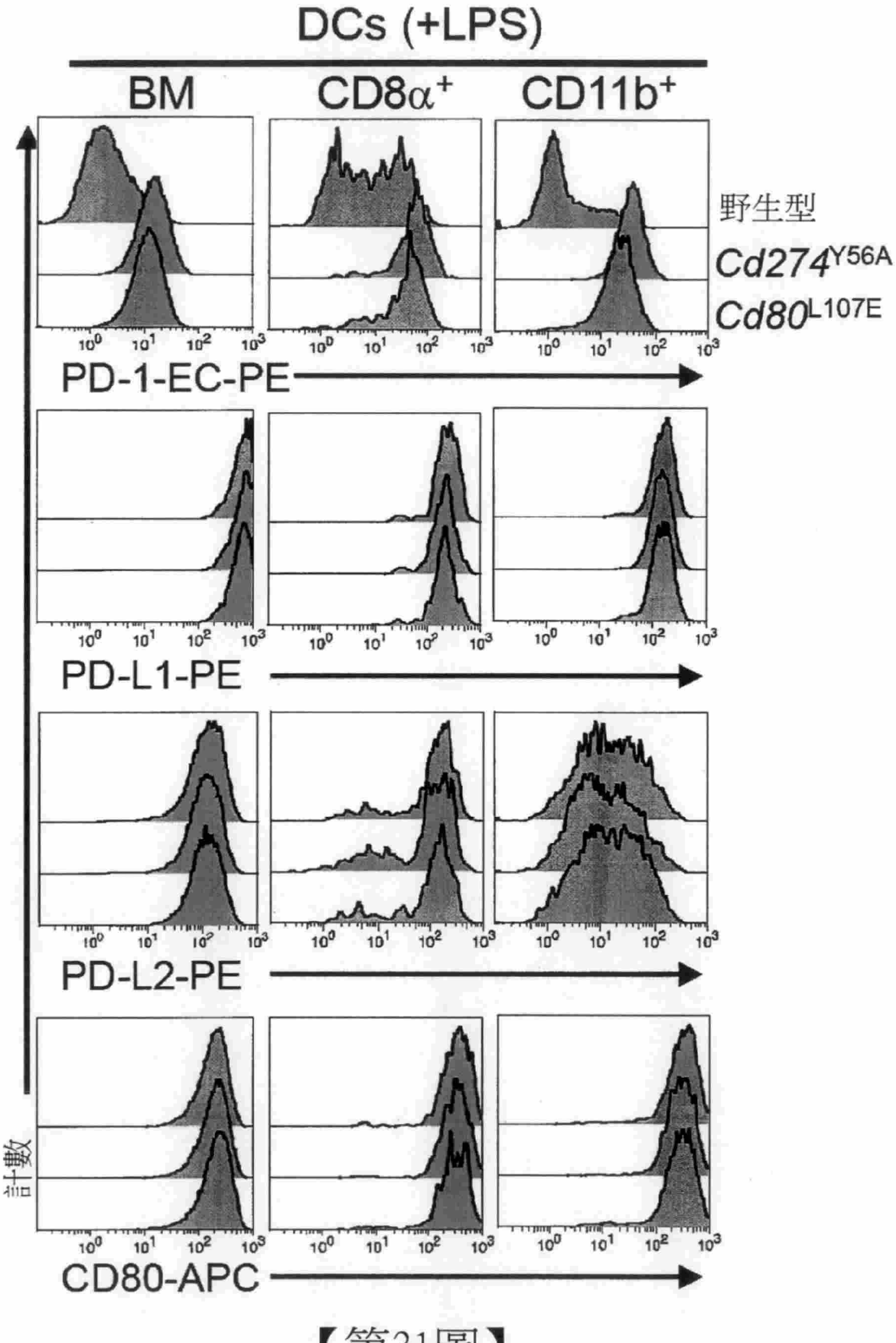

PD-1-EC-APC
計數
hPD-L1
hCD80
(–)
(–)
野生型
(–)
野生型
野生型
N63D/G119S
(–)
N63D/G119S
野生型
10^0
10^1
10^2
10^3


PD-1-EC-APC
計數
hPD-L1
hCD80
(–)
(–)
野生型
(–)
野生型
野生型
野生型
I92E
野生型
L104E
10^0
10^1
10^2
10^3

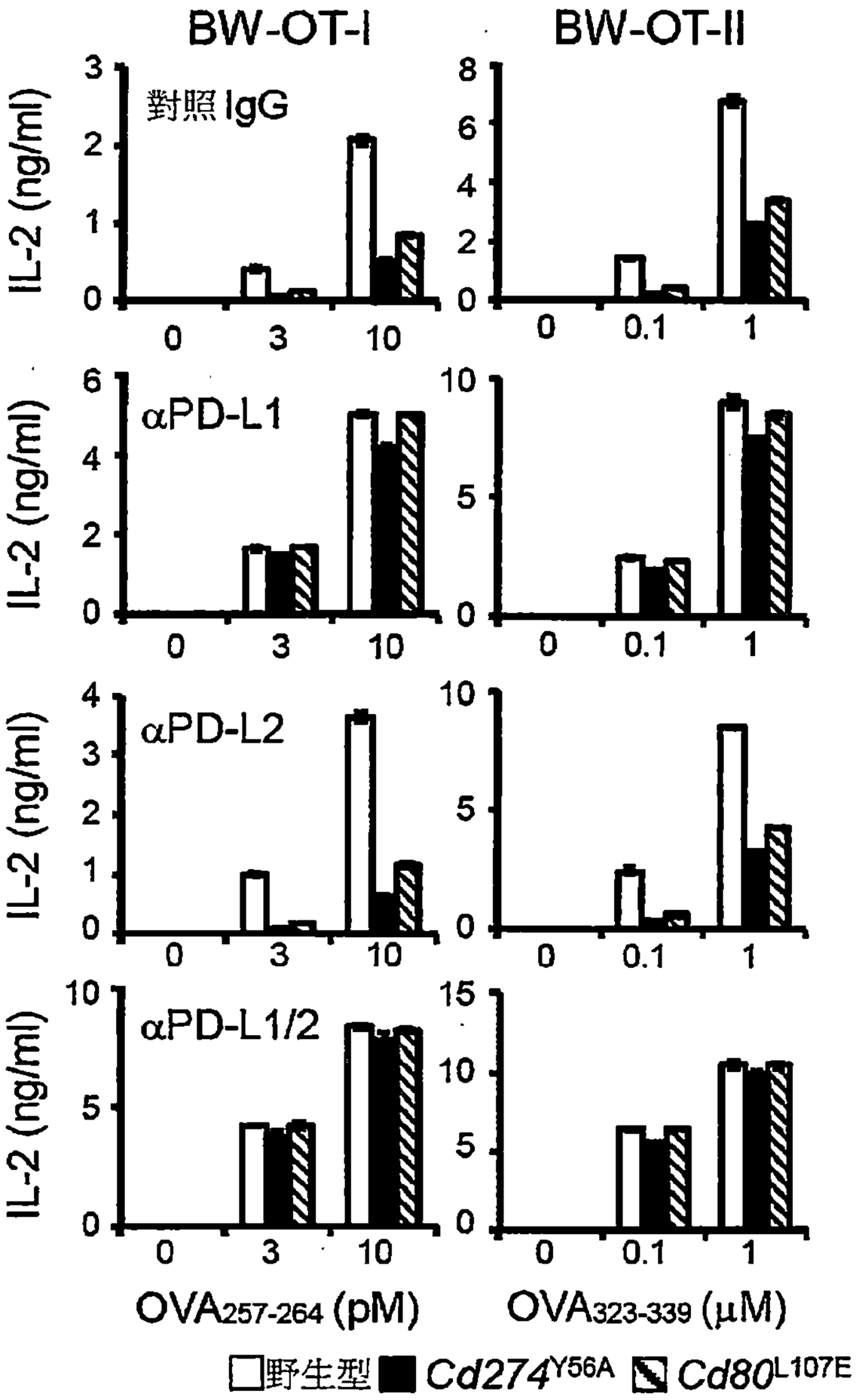
【第29圖】


hPD-1(+)
PD-1KO
IL-2 (ng/ml)
OVA323-339 (μM)
hPD-L1
hCD80
(–)
野生型
N63D/G119S
hCD80/86
hCD86
hCD80L104E

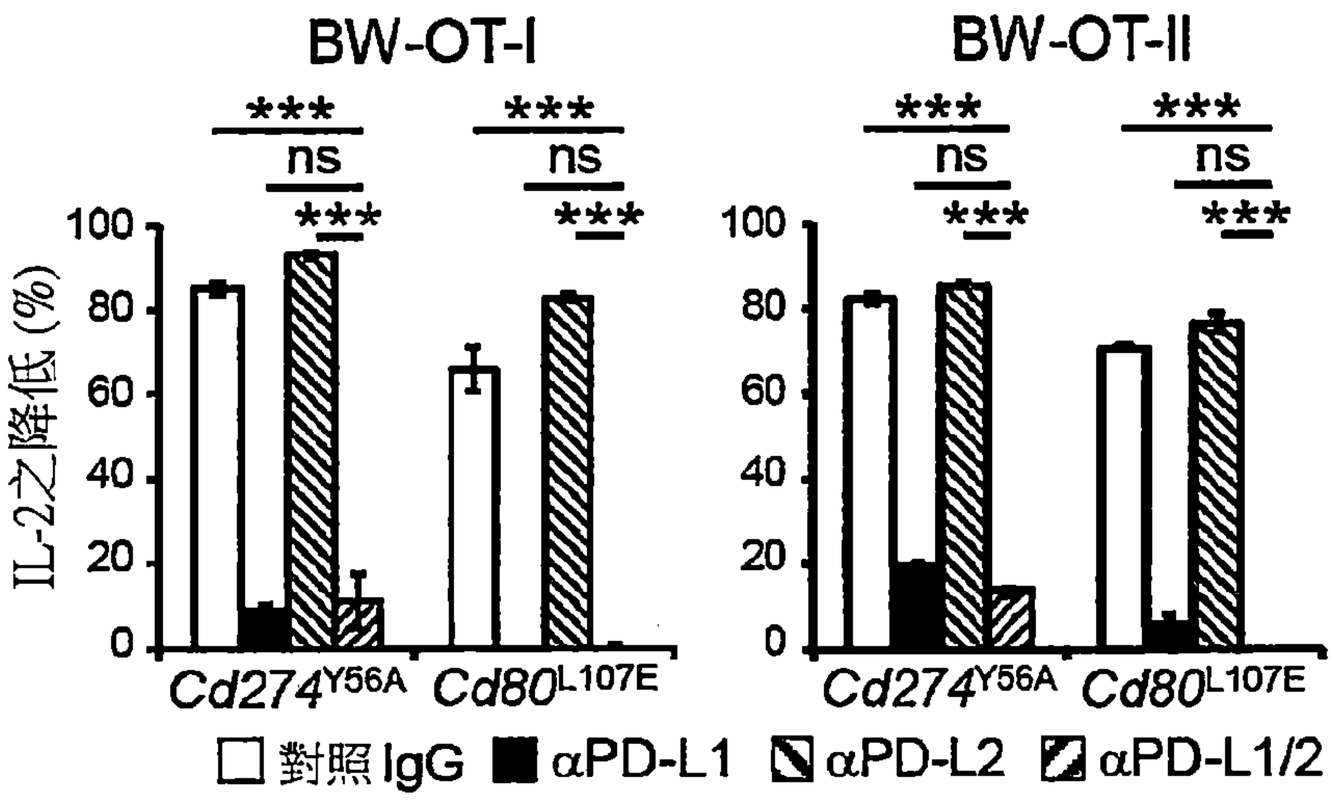
【第30圖】


DCs (+LPS)
BM
CD8α+
CD11b+
野生型
Cd274Y56A
Cd80L107E
PD-1-EC-PE
PD-L1-PE
PD-L2-PE
CD80-APC
計數

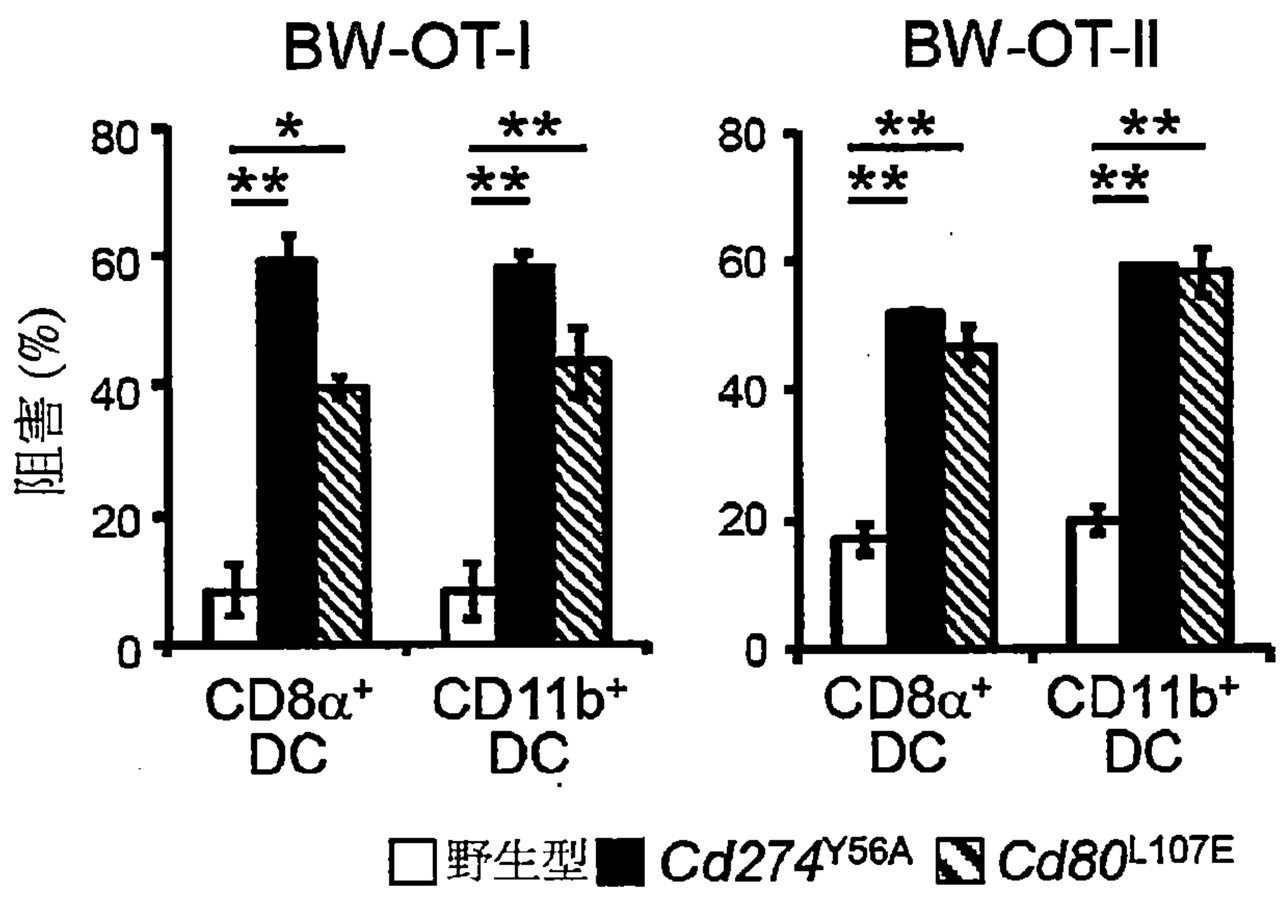
【第31圖】


BW-OT-I
BW-OT-II
對照 IgG
αPD-L1
αPD-L2
αPD-L1/2
IL-2 (ng/ml)
OVA257-264 (pM)
OVA323-339 (μM)
野生型
Cd274Y56A
Cd80L107E

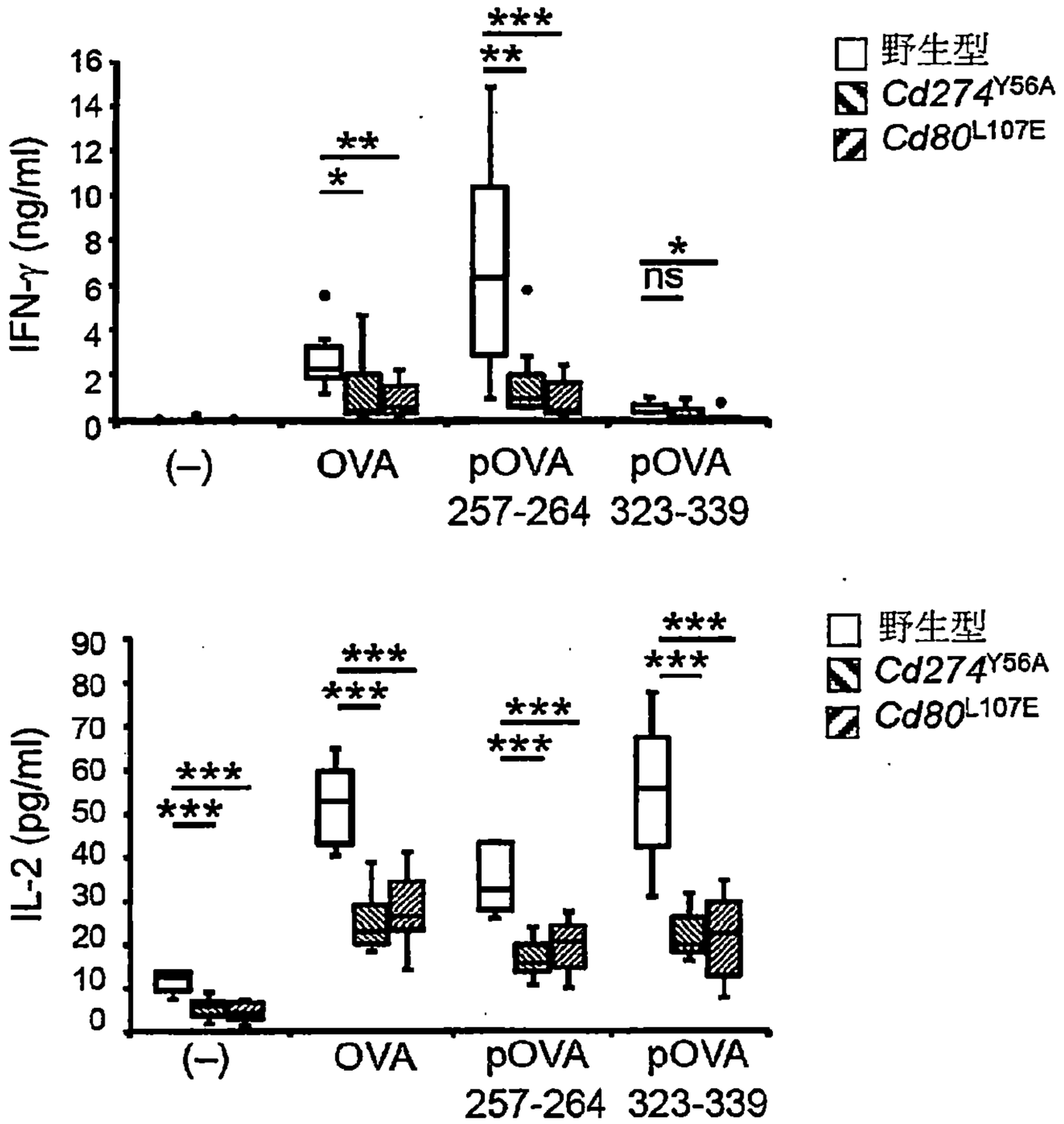
【第32圖】


BW-OT-I
BW-OT-II
***
ns
***
***
ns
***
100
80
60
40
20
0
IL-2之降低 (%)
Cd274Y56A
Cd80L107E
□對照 IgG
αPD-L1
αPD-L2
αPD-L1/2

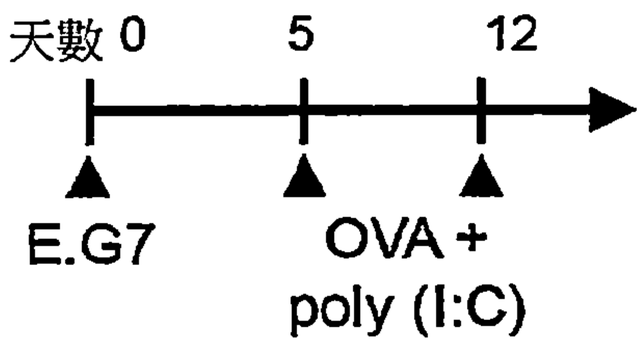
【第33圖】


BW-OT-I
BW-OT-II
*
**
**
**
**
**
80
60
40
20
0
阻害 (%)
CD8α+ DC
CD11b+ DC
□野生型
Cd274Y56A
Cd80L107E

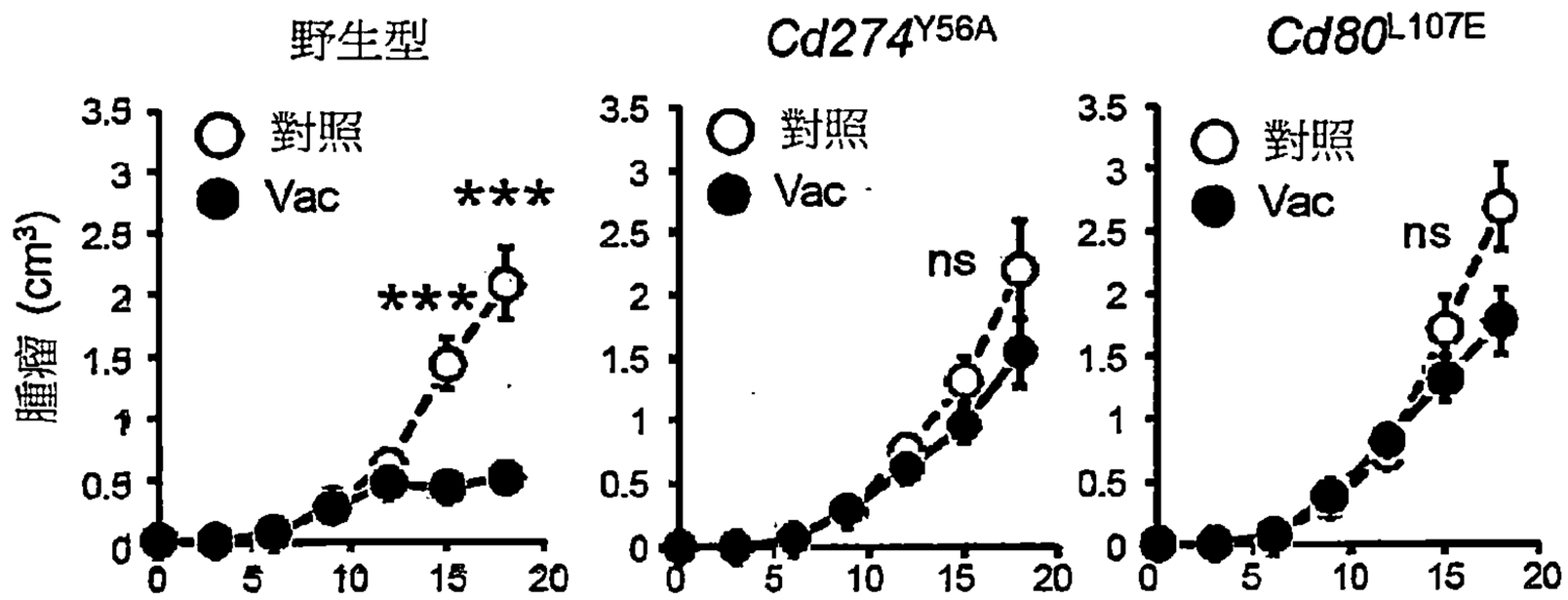
【第34圖】


IFN-γ (ng/ml)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
*
***
**
*
ns
(–)
OVA
pOVA 257-264
pOVA 323-339
野生型
Cd274Y56A
Cd80L107E
IL-2 (pg/ml)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
***
***
***
***
***
(–)
OVA
pOVA 257-264
pOVA 323-339
野生型
Cd274Y56A
Cd80L107E

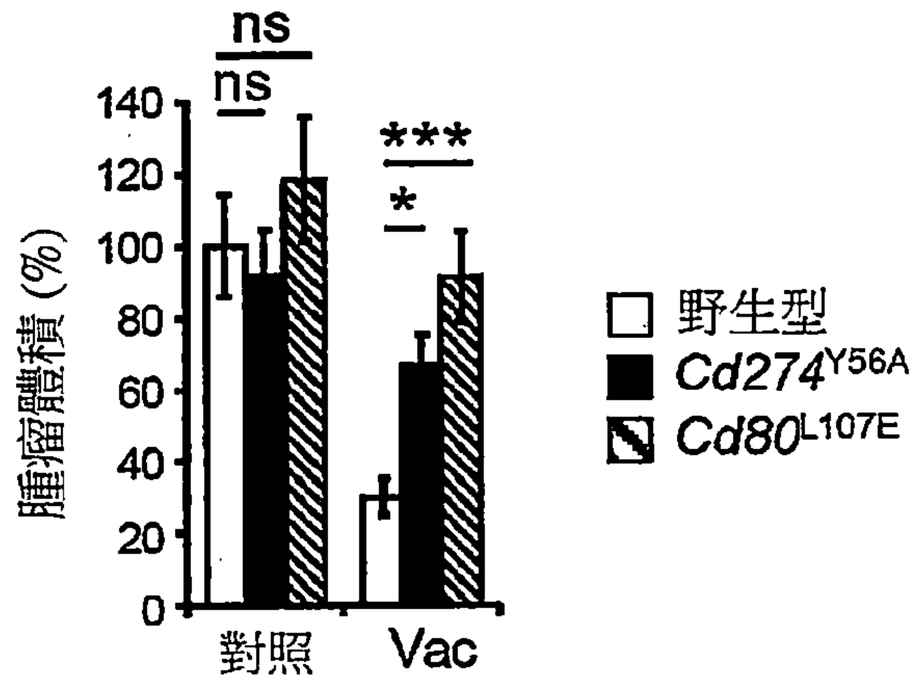
【第35圖】


天數 0
5
12
E.G7
OVA +
poly (I:C)

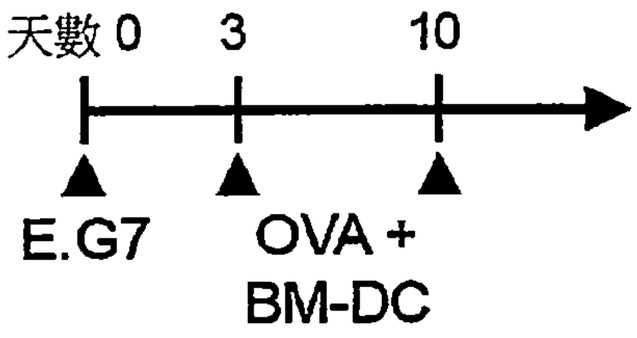
【第36圖】



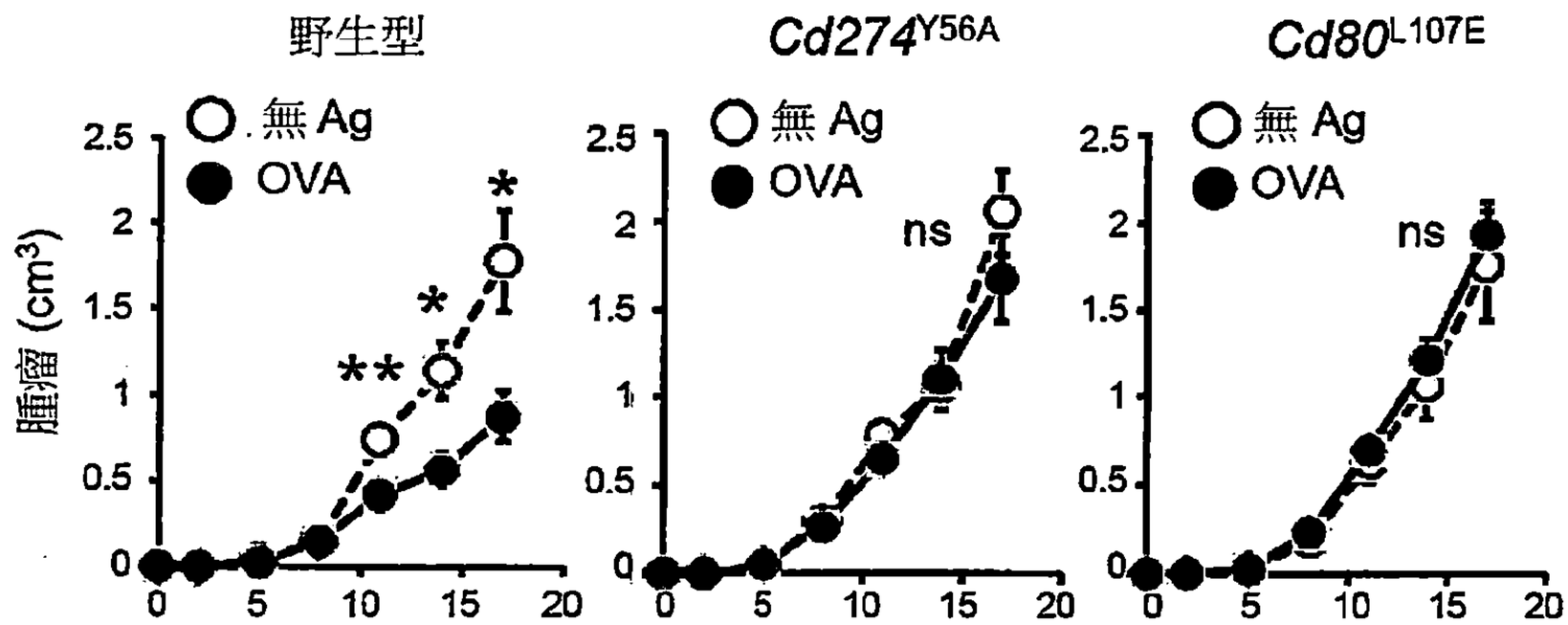
【第37圖】



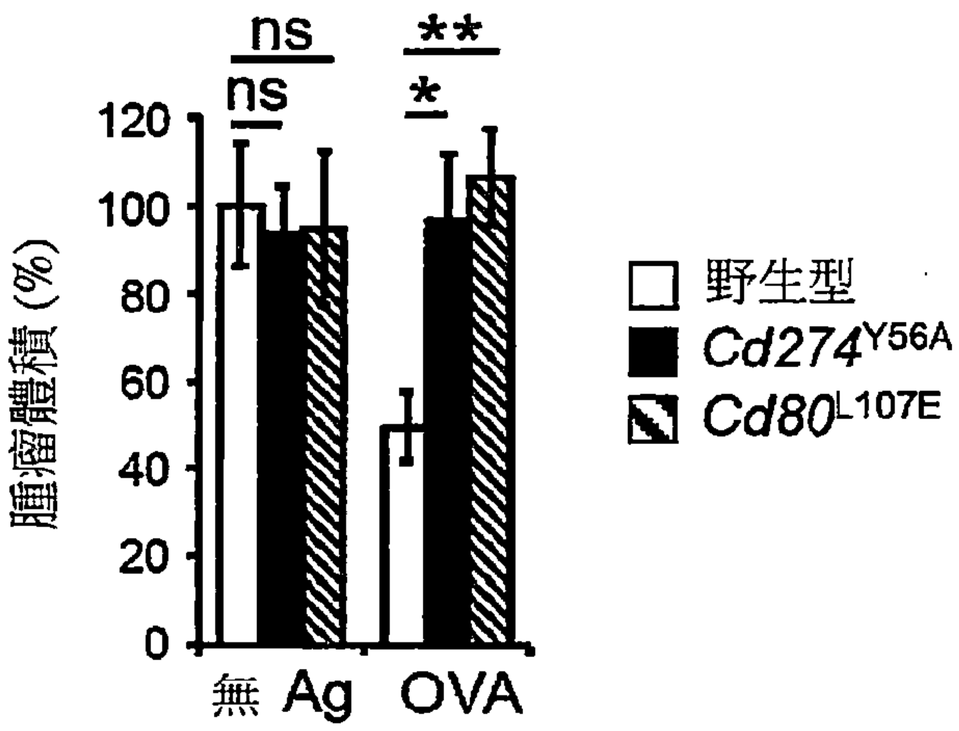
【第38圖】



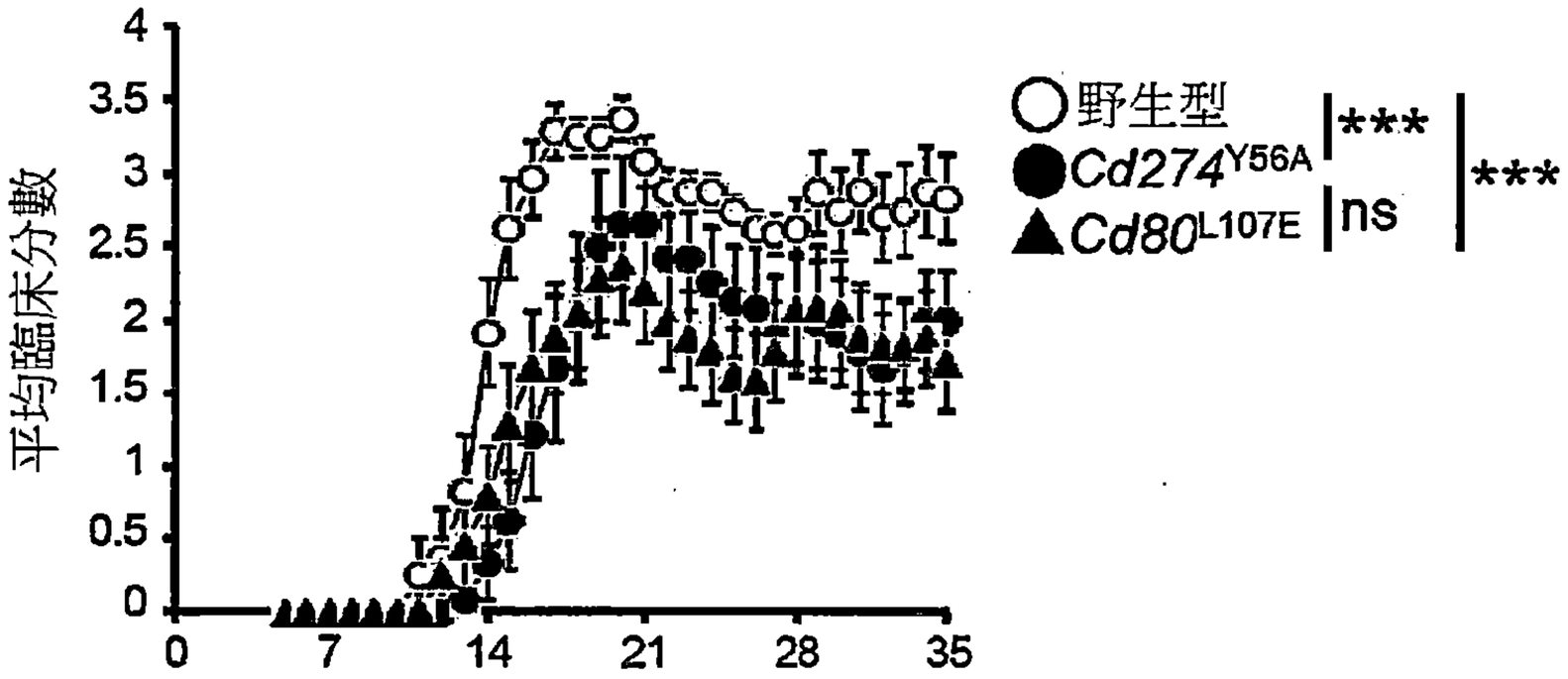
【第39圖】



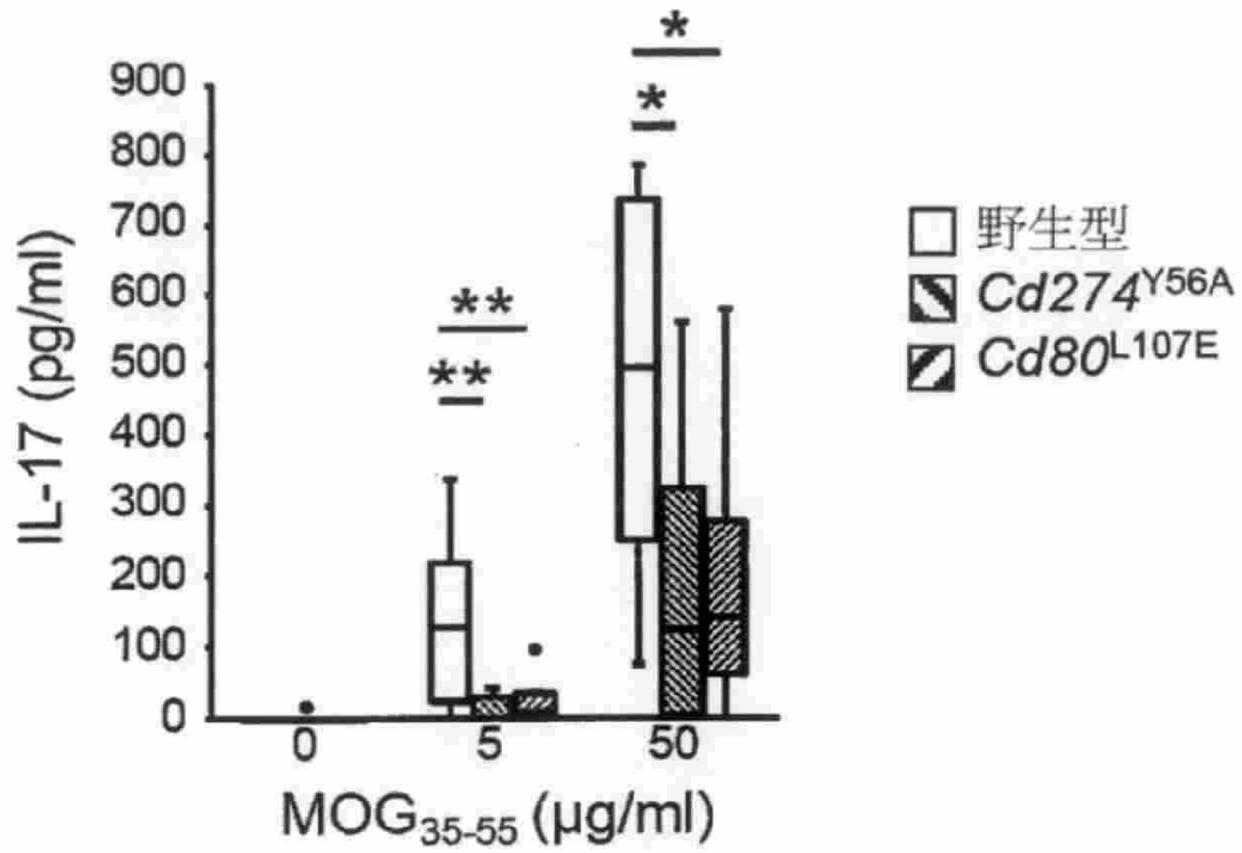
【第40圖】



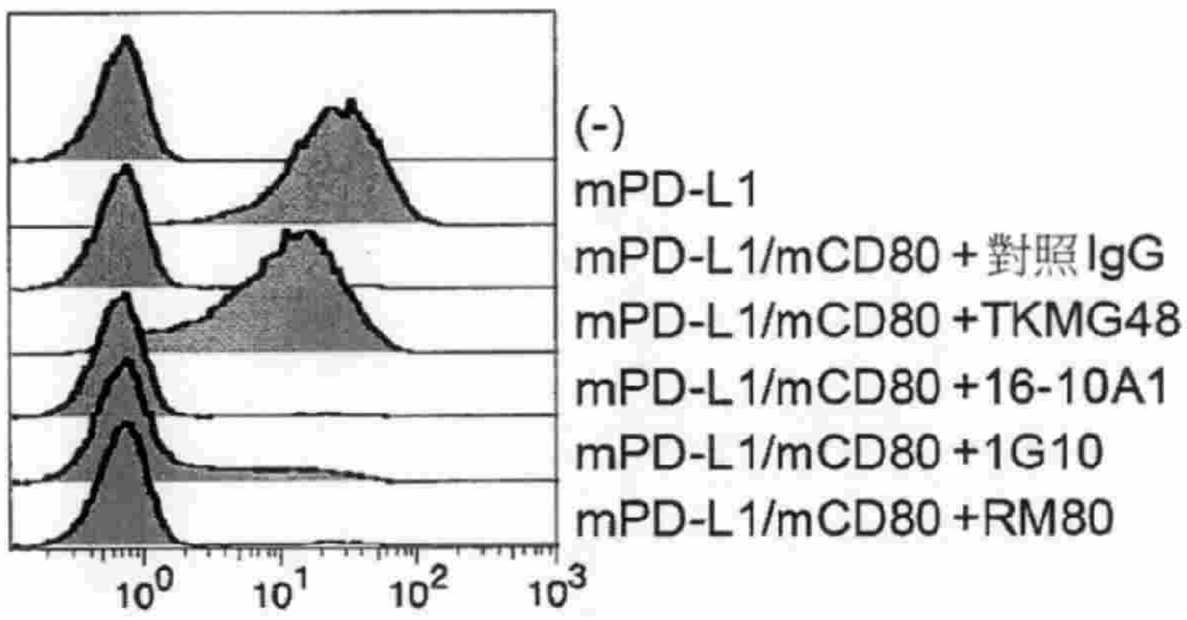
【第41圖】



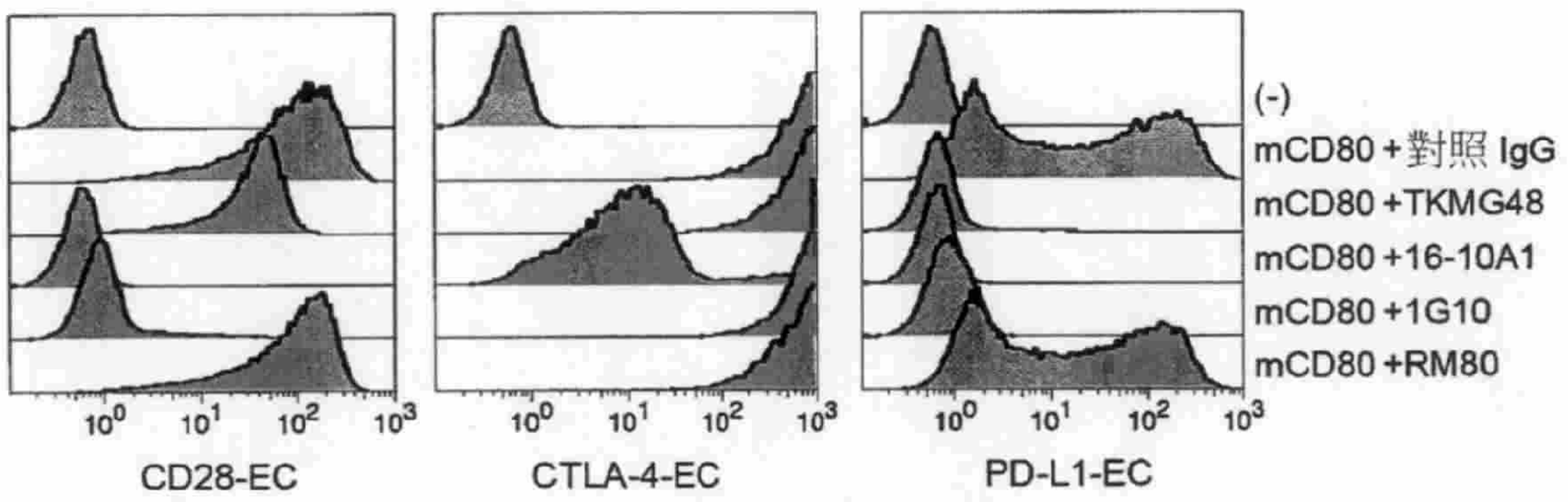
【第42圖】



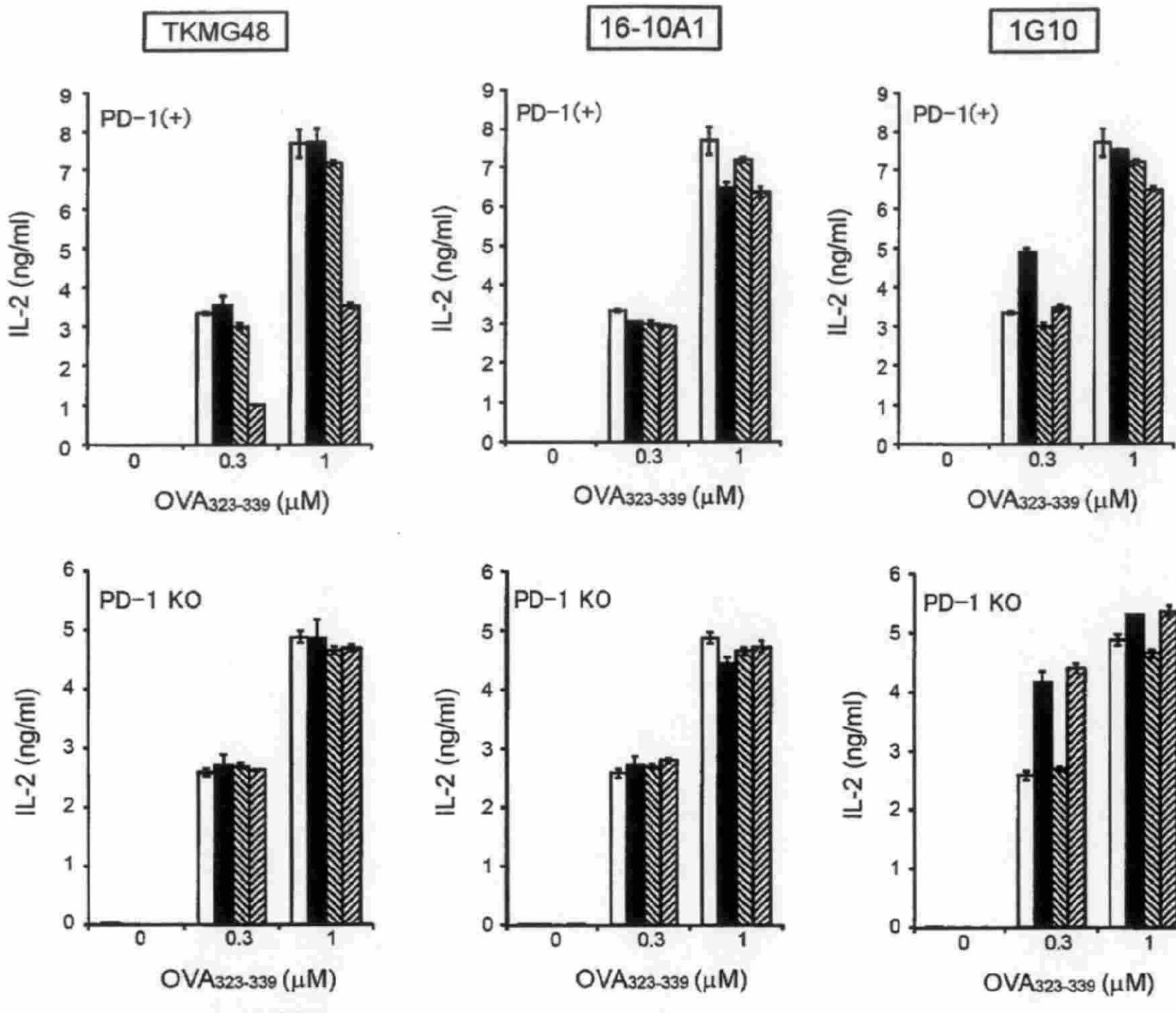
【第43圖】



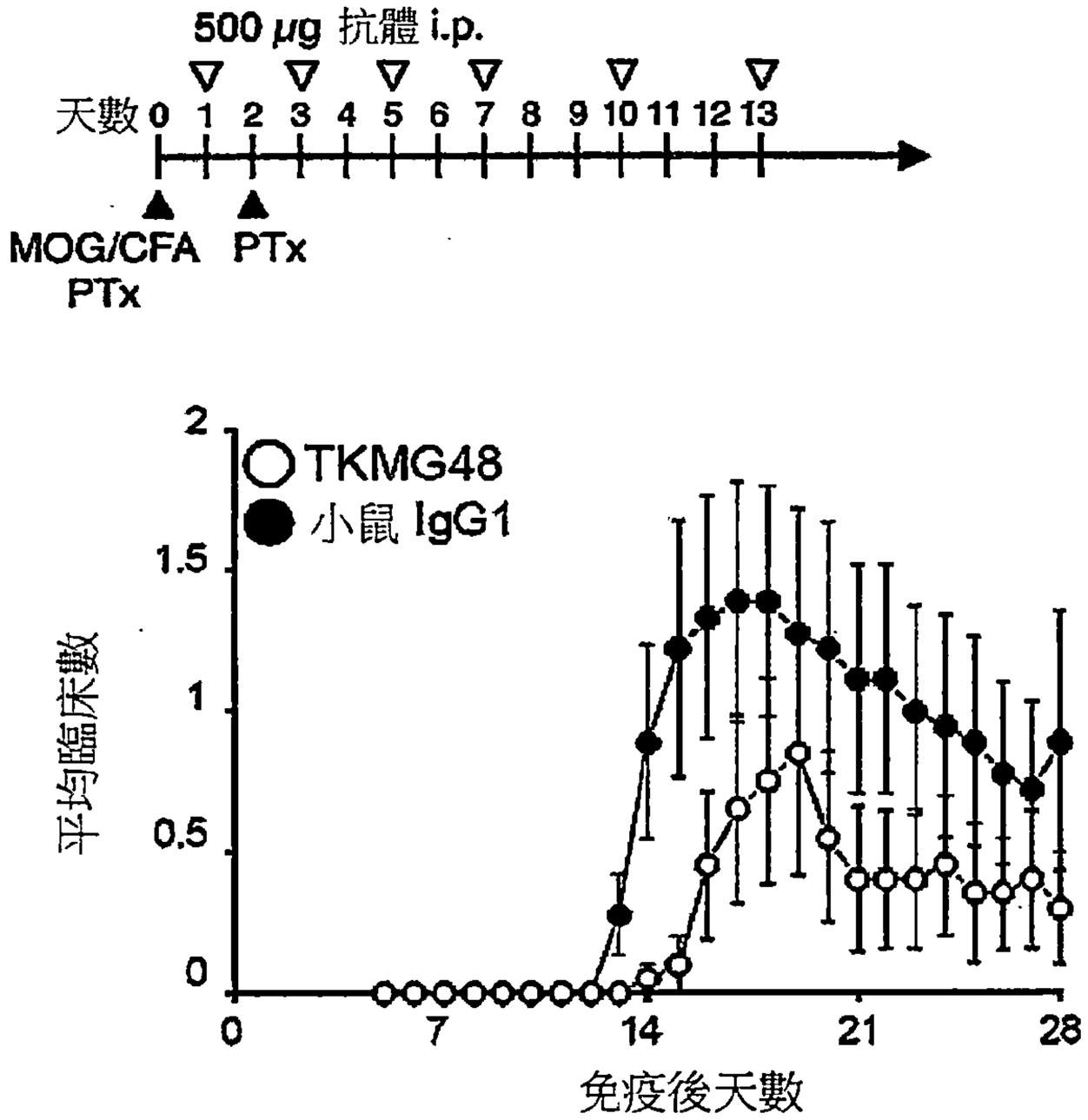
【第44圖】



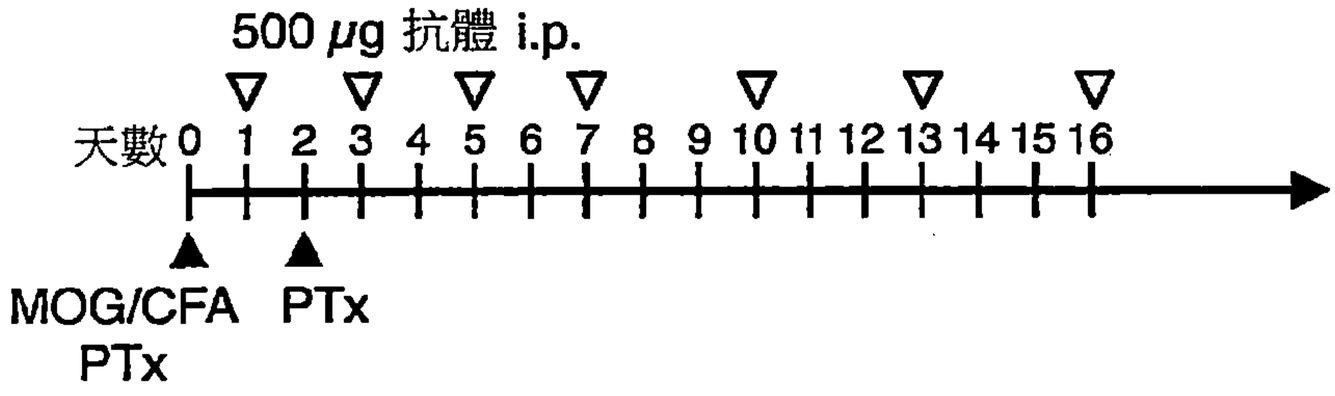
【第45圖】

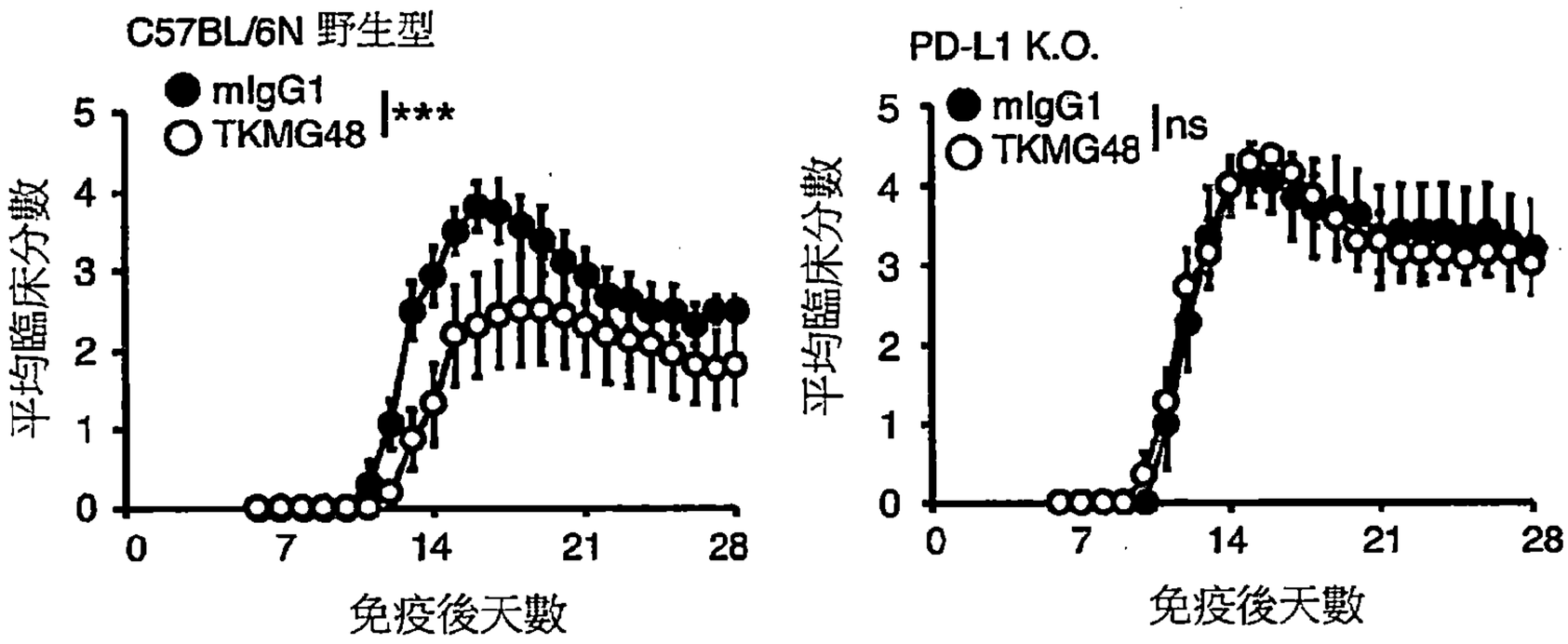

TKMG48
16-10A1
1G10
PD-1(+)
PD-1 KO
IL-2 (ng/ml)
OVA323-339 (μM)
0
0.3
1
□ mCD80/mCD86 + 對照 IgG
■ mCD80/mCD86 + 抗-mCD80 mAb
▨ mCD80/mCD86/mPD-L1 + 對照 IgG
▨ mCD80/mCD86/mPD-L1 + 抗-mCD80 mAb

【第46圖】

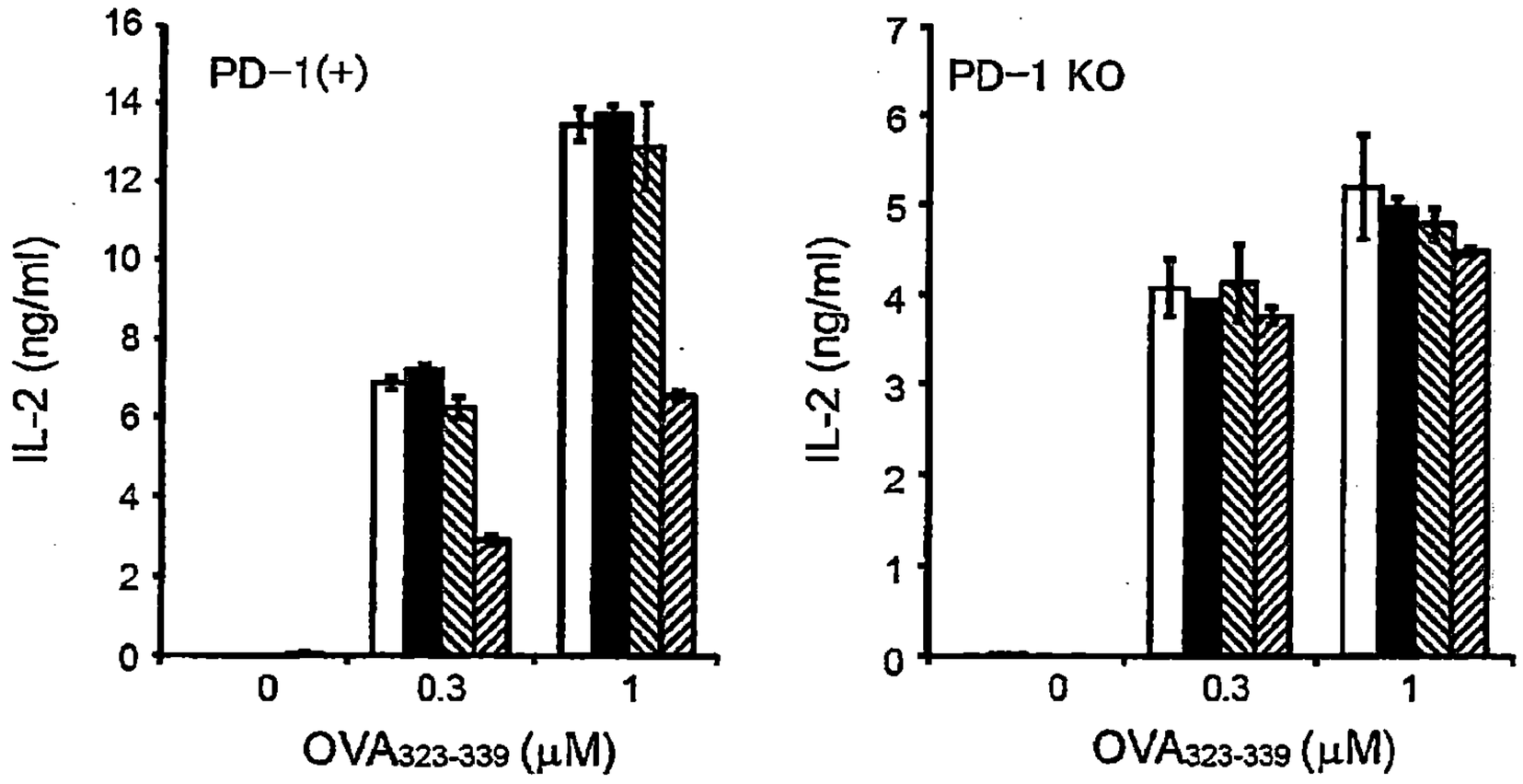

500 μg 抗體 i.p.
天數 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
MOG/CFA PTx
PTx
TKMG48
小鼠 IgG1
平均臨床數
免疫後天數

【第47圖】

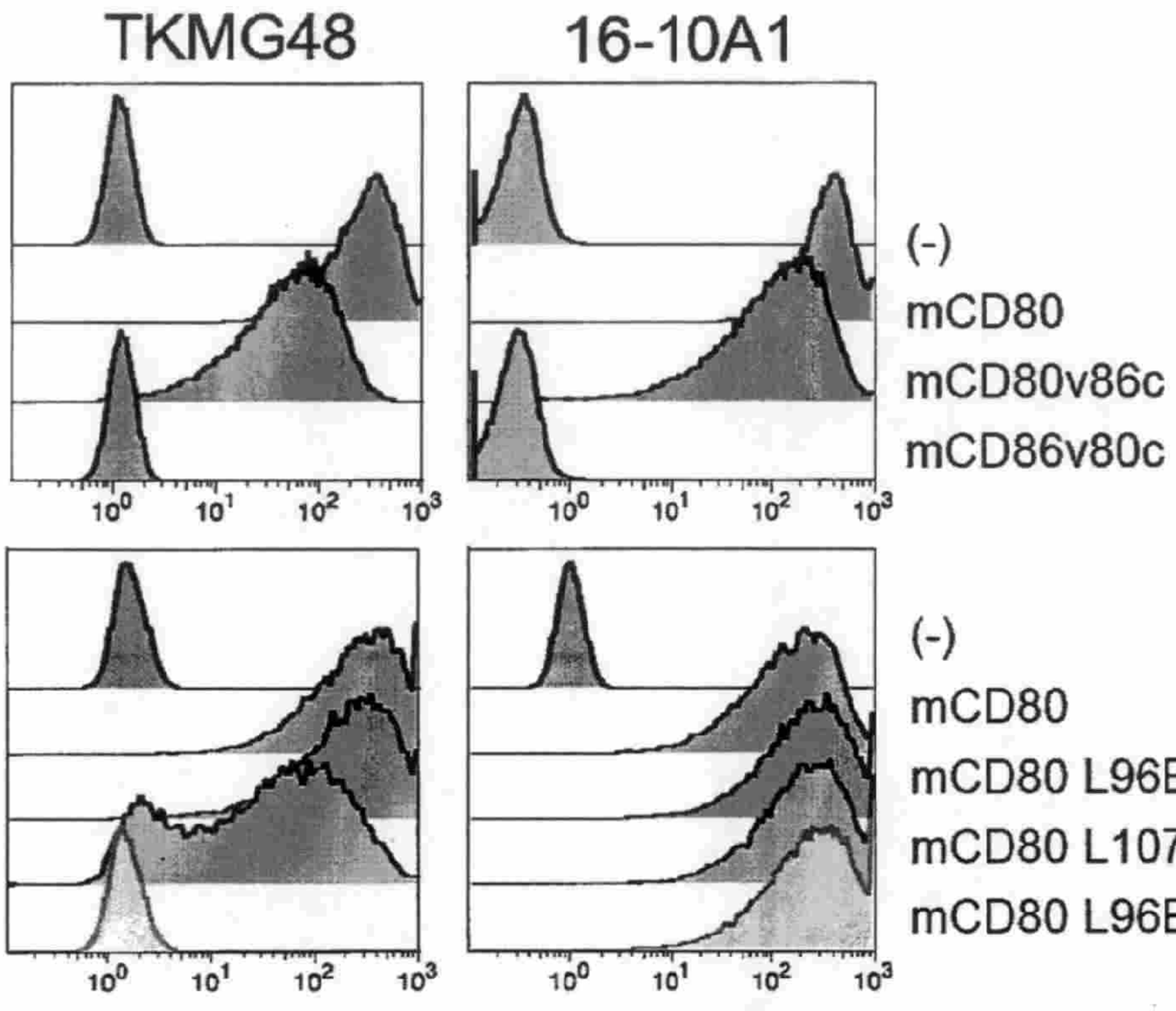

500 μg 抗體 i.p.
天數 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
MOG/CFA PTx
PTx


C57BL/6N 野生型
mIgG1
TKMG48
***
PD-L1 K.O.
ns
平均臨床分數
免疫後天數

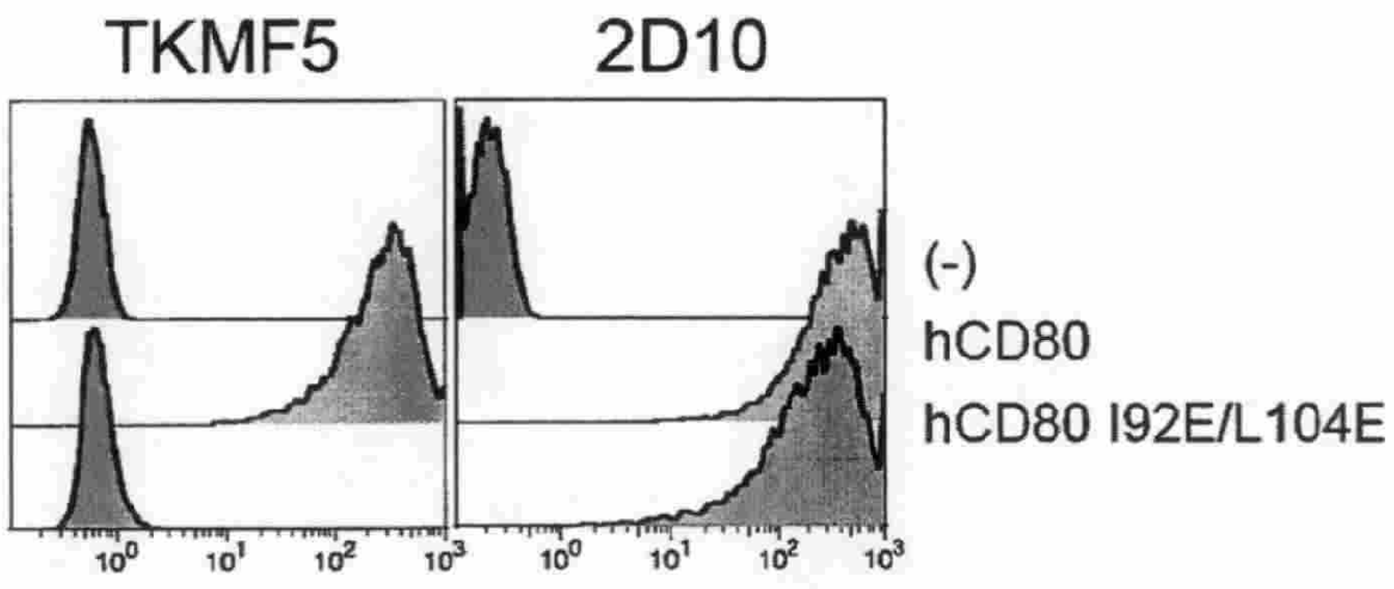
【第48圖】


PD-1(+)
PD-1 KO
IL-2 (ng/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
1
3
5
7
0.3
OVA323-339 (μM)
hCD80/hCD86 +對照 IgG
hCD80/hCD86 +TKMF5
hCD80/hCD86/hPD-L1 +對照 IgG
hCD80/hCD86/hPD-L1 +TKMF5

【第49圖】


TKMG48
16-10A1
(-)
mCD80
mCD80v86c
mCD86v80c
(-)
mCD80
mCD80 L96E
mCD80 L107E
mCD80 L96E/L107E

【第50圖】


TKMF5
2D10
(-)
hCD80
hCD80 I92E/L104E

【第51圖】

抗人類CD80抗體TKMF5之胺基酸序列

重鏈可變區域(序列編號7)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFS**YYWMN**WVKQRPGQGLEWIG**QIYPGDGDTNYNGKFKG**KATL

CDR1 (序列編號9) CDR2 (序列編號10)

TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR**SYGNTMDY**WGQGTSVTVSS

CDR3 (序列編號11)

輕鏈可變區域(序列編號8)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC**KAGQNVRTAVA**WYQQKPGQSPKTLIY**LASNRHT**GVPDRFTGSGSGTD

CDR1 (序列編號12) CDR2 (序列編號13)

FTLTISNVQSEDLADYFC**LQHWNYPFT**FGSGTKLEIK

CDR3 (序列編號14)

【第52圖】

抗小鼠CD80抗體TKMG48之胺基酸序列

重鏈可變區域(序列編號15)

QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFT**SYWMH**WVKQRPIQGLEWIG**NIDPSDSETHYNQKFKD**KATL

CDR1 (序列編號17) CDR2 (序列編號18)

TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**SYYYGTRYYAMDY**WGQGTSVTVSS

CDR3 (序列編號19)

輕鏈可變區域(序列編號16)

DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITC**KASQDINKYIA**WYQHKPGKGPRLLIH**YTSTLQP**GIPSRFSGSGSGRD

CDR1 (序列編號20) CDR2 (序列編號21)

YSFSISNLEPEDIATYYC**LQYDNLLT**FGGGTKLEIK

CDR3 (序列編號22)

【第53圖】