



(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 201722985 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：105135388

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 01 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/705 (2006.01)**A61K38/16 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2015/11/02 美國

62/249,836

2016/08/11 美國

62/373,654

(71)申請人：戊瑞治療有限公司 (美國) FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：布雷曼 湯瑪士 BRENNAN, THOMAS (US)；貝洛芬 大衛 BELLOVIN, DAVID

(US)；布夏 大衛 BUSH, DAVID (US)；珊尼諾 芭芭拉 SENNINO, BARBARA

(US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：92 項 圖式數：9 共 145 頁

(54)名稱

CD80 胞外域多肽及其用於癌症治療

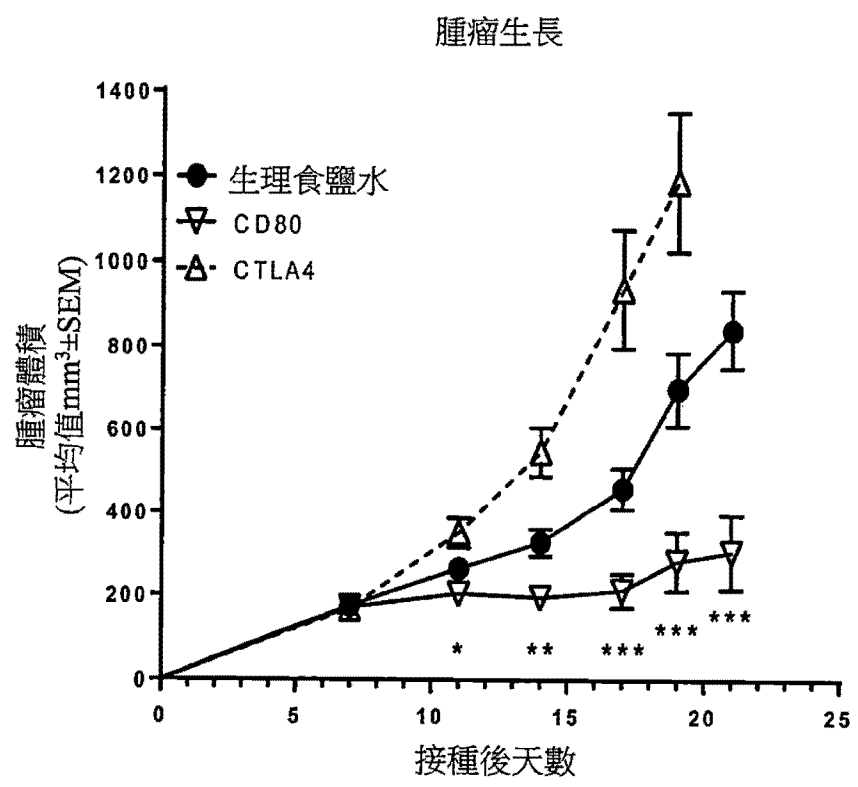
CD80 EXTRACELLULAR DOMAIN POLYPEPTIDES AND THEIR USE IN CANCER TREATMENT

(57)摘要

本申請案係關於 CD80(B7-1)胞外域(ECD)多肽及 CD80-ECD 融合分子以及其單獨及與諸如免疫刺激劑，諸如 PD-1/PD-L1 抑制劑之其他治療劑組合用於癌症治療中之用途。

This application relates to CD80 (B7-1) extracellular domain (ECD) polypeptides and CD80-ECD fusion molecules and their use in treatment of cancer, both alone and in combination with other therapeutic agents, such as immune stimulating agents such as PD-1/PD-L1 inhibitors.

指定代表圖：



【圖1A】

201722985

【發明摘要】

【中文發明名稱】

CD80胞外域多肽及其用於癌症治療

【英文發明名稱】

CD80 EXTRACELLULAR DOMAIN POLYPEPTIDES AND THEIR
USE IN CANCER TREATMENT

【中文】

本申請案係關於CD80 (B7-1)胞外域(ECD)多肽及CD80-ECD融合分子以及其單獨及與諸如免疫刺激劑，諸如PD-1/PD-L1抑制劑之其他治療劑組合用於癌症治療中之用途。

【英文】

This application relates to CD80 (B7-1) extracellular domain (ECD) polypeptides and CD80-ECD fusion molecules and their use in treatment of cancer, both alone and in combination with other therapeutic agents, such as immune stimulating agents such as PD-1/PD-L1 inhibitors.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

CD80胞外域多肽及其用於癌症治療

【英文發明名稱】

CD80 EXTRACELLULAR DOMAIN POLYPEPTIDES AND THEIR
USE IN CANCER TREATMENT

【技術領域】

本申請案係關於CD80 (B7-1)胞外域(ECD)多肽及CD80-ECD融合分子以及其單獨及與諸如免疫刺激劑，諸如PD-1/PD-L1抑制劑之其他治療劑組合用於癌症治療中之用途。

【先前技術】

CD80，亦稱為B7-1，為B7家族膜結合蛋白中之一者，其藉由經由其配位體結合活性傳遞共刺激或共抑制反應而參與免疫調節。B7家族蛋白之其他成員包括CD86 (B7-2)、誘導性協同刺激配位體(ICOS-L)、程式化死亡-1配位體(PD-L1; B7-H1)、程式化死亡-2配位體(PD-L2; B7-H2)、B7-H3及B7-H4。CD80為表現於T細胞、B細胞、樹突狀細胞及單核球之表面上的跨膜蛋白，且結合於受體CD28、CTLA4 (CD152)及PD-L1。CD80及CD86及其受體CTLA4及CD28作為共刺激-共抑制系統操作，例如以控制T細胞活化、擴增、分化及存活。CD80及CD86與CD28之相互作用產生例如引起T細胞反應活化的共刺激信號。CD80又刺激CTLA4之上調，CTLA4在結合於CD80後用以抑制先前藉由CD80/CD28相互作用觸發之T細胞反應。此反饋迴路使得可精細控制免疫反應。

CD80亦展示與具有與CD28類似之親和力的另一B7家族成員PD-L1

相互作用，而CD86不與PD-L1相互作用。PD-L1為程式化死亡-1 (PD-1) 蛋白之兩種配位體中之一者，其亦參與T細胞調節。特定言之，於T細胞上表現PD-1可在T細胞活化後誘導，且PD-1結合於PD-L1藉由促進T細胞失活下調T細胞活性。多種腫瘤細胞表面上表現PD-L1，從而可能引起PD-1/PD-L1相互作用及抑制針對該腫瘤之T細胞反應。此觀察結果引起開發PD-1/PD-L1相互作用之抑制劑作為癌症治療劑，其經設計以刺激針對患者中之腫瘤的天然免疫反應。

CD80結合於PD-L1可充當替代機制來阻斷PD-1/PD-L1相互作用及阻止腫瘤位點處T細胞反應之抑制。然而，同時，增加CD80含量亦可用以結合於CD28及誘導CTLA4，因此誘導或抑制T細胞反應。CD80之一些可溶形式亦可用於藉由阻斷內源CD80活性而阻斷CTLA4活化。另外，不同可溶性CD80蛋白形式可經由該等蛋白形式與腫瘤細胞之間的其他相互作用對腫瘤生長具有不同作用，該等其他相互作用之影響在測試之前不能預測。先前亦未直接測試CD80之各種可溶形式在活體內實際上如何影響腫瘤生長。本發明者已開發一組CD80胞外域(ECD)融合分子，其在單獨投與時與在結合PD-1/PD-L1抑制劑投與時對小鼠模型中之腫瘤生長具有特別有效作用。基於以下實施例中所示之資料，本文之實施例可在癌症治療中提供極佳治療作用。

【發明內容】

在一些實施例中，提供CD80胞外域(ECD)多肽或CD80 ECD融合分子。在一些實施例中，融合分子包含CD80 ECD及至少一種融合搭配物，該融合搭配物包含免疫球蛋白(諸如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)之Fc域、白蛋白或聚合物(諸如PEG)。在一些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD

融合分子包含人類CD80 (諸如SEQ ID NO:5之人類CD80)或來自CD80同功異型物2或同功異型物3之人類CD80 ECD (SEQ ID NO:3及4)。在一些實施例中，融合分子包含Fc域，諸如包含選自SEQ ID NO:9-16之序列的Fc域。在一些實施例中，融合分子包含人類IgG1 Fc域，諸如具有野生型序列(諸如SEQ ID NO:14之野生型序列)或者具有L234F、L235E及P331S胺基酸取代之突變序列(諸如SEQ ID NO:12之突變序列)的人類IgG1 Fc域。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子包含選自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:21之胺基酸序列。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子融合搭配物直接連接於CD80 ECD胺基酸序列之C末端胺基酸或成熟CD80 ECD胺基酸序列之N端胺基酸。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子可經由連接肽(諸如GS連接子)連接於CD80 ECD。

在一些實施例中，CD80 ECD融合分子之唾液酸含量為每莫耳蛋白質10-60 mol唾液酸(SA)，諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些此類實施例中，CD80 ECD融合分子為CD80 ECD Fc融合物，例如具有野生型Fc域，諸如人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域，或者具有取代L234F、L235E及P331S之IgG1 Fc域。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子包含選自SEQ ID

NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:21之胺基酸序列。在一些以上實施例中，相較於具有一致胺基酸序列但較低SA含量之融合分子，該融合分子在小鼠同基因型或異種移植模型中(諸如在CT26小鼠模型中)具有較大百分比腫瘤生長抑制。在一些以上實施例中，其中融合分子每莫耳蛋白質包含至少10 mol SA (諸如每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA)，相較於分別具有一致胺基酸序列但每莫耳蛋白質具有少於10 mol SA或每莫耳蛋白質少於15 mol SA或每莫耳蛋白質少於20 mol SA的融合分子，該融合分子在小鼠同基因型或異種移植模型中(諸如在CT26小鼠模型中)具有較大百分比腫瘤生長抑制。

本文之一些實施例包含CD80 ECD融合分子，其中該分子能夠經至少十天之時段(諸如至少兩週，諸如經十天至兩週或兩至三週之時段，或至少三週)在至少一種小鼠同基因型或異種移植癌症模型(諸如CT26模型)中產生至少50% (諸如至少60%，諸如至少70%，諸如至少80%，諸如至少90%，諸如至少95%，諸如至少98%)腫瘤細胞生長抑制。

在一些實施例中，給與小鼠一至三次劑量的0.3至3 mg/kg (諸如0.3至0.6 mg/kg) CD80 ECD Fc融合分子。在一些此類實施例中，CD80 ECD融合分子之唾液酸含量亦為每莫耳蛋白質10-60 mol唾液酸(SA)，諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或

至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子具有Fc作為融合搭配物，諸如人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子包含選自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:21之胺基酸序列。在一些以上實施例中，其中融合分子每莫耳蛋白質包含至少10 mol SA (諸如每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA)，相較於分別具有一致胺基酸序列但每莫耳蛋白質具有少於10 mol SA或每莫耳蛋白質少於15 mol SA或每莫耳蛋白質少於20 mol SA的融合分子，該分子在小鼠同基因型或異種移植模型中(諸如在CT26小鼠模型中)具有較大百分比腫瘤生長抑制。在一些以上實施例中，其中融合分子每莫耳蛋白質包含至少10 mol SA (諸如每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA)，相較於抗CTLA4抗體(諸如抗CTLA4抗體純系9D9)，該分子在至少十天或至少兩週或至少三週(諸如十天至兩週或兩至三週)後在小鼠同基因型或異種移植模型中(諸如在CT26小鼠模型中)具有較大百分比腫瘤生長抑制。

在一些以上實施例中，CD80 ECD Fc融合分子亦能夠在來自同基因型或異種移植腫瘤模型(諸如CT26模型)之小鼠中誘導完全腫瘤消退。

本文亦提供如下組合物，其包含上述任何實施例之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子，且進一步包含至少一種醫藥學上可接受之載劑。一些此類組合物進一步包含至少一種其他治療劑。

在一些實施例中，其他治療劑包含至少一種免疫刺激劑。在一些實施例中，免疫刺激劑包含程式化細胞死亡1 (PD-1)/程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)抑制劑。PD-1/PD-L1抑制劑可為抗體(諸如抗PD-1抗體或抗PD-L1

抗體)、肽或融合分子或小分子。

在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-1抗體，諸如包含選自尼沃單抗(nivolumab)、皮立珠單抗(pidilizumab)及派立珠單抗(pembrolizumab)之抗體的重鏈及輕鏈CDR或包含該抗體之重鏈及輕鏈可變區或包含該抗體之完整胺基酸序列的抗體。在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-L1抗體，諸如包含選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈CDR、重鏈及輕鏈可變區或完整胺基酸序列的抗體。

在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為PD-1融合分子(諸如AMP-224)或多肽(諸如AUR-012)。

本文中亦包括治療個體之癌症的方法，其包含投與個體有效量之來自上述實施例之CD80 ECD或CD80 ECD融合蛋白或組合物。在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。在一些實施例中，癌症係選自結腸直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、頭部及頸部之鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌及子宮內膜癌。在一些實施例中，癌症在選自手術、化學療法、放射療法或其組合之療法後復發或進展。

在本文之一些方法中，CD80 ECD、CD80 ECD融合分子或組合物與至少一種其他治療劑組合投與。在一些此類實施例中，其他治療劑可與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子一起封裝成同一組合物之部分，例如一起混合在一種組合物中或提供於各別容器、小瓶或其他包裝中。在一些實施例中，其他治療劑包含至少一種免疫刺激劑。在一些實施例中，免疫刺激劑包含程式化細胞死亡1 (PD-1)/程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)抑制劑。PD-1/PD-L1抑制劑可為抗體(諸如抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體)、肽或

融合分子或小分子。

在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-1抗體，諸如包含選自尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗之抗體的重鏈及輕鏈CDR或包含該抗體之重鏈及輕鏈可變區或包含該抗體之完整胺基酸序列的抗體。在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-L1抗體，諸如包含選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈CDR、重鏈及輕鏈可變區或完整胺基酸序列的抗體。

在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為PD-1融合分子(諸如AMP-224)或多肽(諸如AUR-012)。

在本文之方法的一些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子及其他治療劑(諸如免疫刺激劑，諸如PD-1/PD-L1抑制劑)可同時或依序投與。在一些情況下，在投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子前投與一或多次劑量之PD-1/PD-L1抑制劑。在一些情況下，在投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子前，個體已接受完整療程之免疫刺激劑(例如PD-1/PD-L1抑制劑)療法。在一些情況下，在免疫刺激劑(例如PD-1/PD-L1抑制劑)療法之第二過程期間投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。在一些情況下，在投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子前，個體已接受至少一次、至少兩次、至少三次或至少四次劑量之免疫刺激劑(諸如PD-1/PD-L1抑制劑)。在一些情況下，至少一次劑量之免疫刺激劑(例如PD-1/PD-L1抑制劑)與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子同時投與。

在一些實施例中，在投與其他治療劑(諸如免疫刺激劑，諸如PD-1/PD-L1抑制劑)前投與一或多次劑量之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。在一些此類情況下，在投與免疫刺激劑(例如PD-1/PD-L1抑制劑)

前，個體已接受至少一次、至少兩次、至少三次或至少四次劑量之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。在一些情況下，至少一次劑量之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與免疫刺激劑(例如PD-1/PD-L1抑制劑)同時投與。

在本文之任何方法中，個體可對用PD-1/PD-L1抑制劑治療具有耐藥性。在一些此類情況下，個體先前已接受PD-1/PD-L1抑制劑療法，而在其他此類情況下，個體先前未接受PD-1/PD-L1抑制劑療法，但經由其他方式(諸如特定表現型特點)鑑別為具有耐藥性。

在以上方法中之任一者中，除CD80 ECD或CD80 ECD融合分子以外，可向個體投與包含至少一種化療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑及/或抗贅生性組合物的其他治療劑。

在一些實施例中，相較於用單獨給與之CD80 ECD或融合分子或免疫刺激劑(諸如PD-1/PD-L1抑制劑)治療，投與個體的CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與免疫刺激劑(諸如PD-1/PD-L1抑制劑)之組合已展示以協同方式降低或抑制至少一種小鼠同基因型或異種移植癌症模型中之腫瘤生長。在一些實施例中，小鼠模型為具有鼠類結腸直腸癌CT26細胞之結腸直腸癌模型。在其他實施例中，該模型可為MC38模型或B16模型。

在以上方法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可經1週、10天、2週或3週之時段使至少一種小鼠同基因型或異種移植癌症模型中之腫瘤生長抑制例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%，或可經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使患者之腫瘤生長抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。

在以上方法實施例中之任一者中，投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可例如經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使動物或人類個體之至少一種腫瘤之體積降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在一些此類實施例中，腫瘤為實體腫瘤。

在以上組合療法方法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與其他治療劑(諸如免疫刺激劑，諸如PD-1/PD-L1抑制劑)之組合可經1週、10天、2週或3週之時段使腫瘤生長抑制例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%，或可經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使患者之腫瘤生長抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在以上組合療法方法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與其他治療劑(諸如免疫刺激劑，諸如PD-1/PD-L1抑制劑)之組合可例如經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使動物或人類個體之至少一種腫瘤之體積降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在一些此類實施例中，腫瘤為實體腫瘤。

在一些以上組合療法實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子為每莫耳CD80 ECD蛋白質包含10-60 mol唾液酸(SA)(諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA)的CD80 ECD融合分子。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、

每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些此類實施例中，CD80 ECD融合分子包含Fc域作為融合搭配物，諸如野生型Fc域，諸如野生型人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子包含選自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:21之胺基酸序列。在一些此類實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子能夠經至少十天之時段(諸如至少兩週，諸如至少三週，諸如經十天至兩週或兩至三週之時段)使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低至少90%(諸如至少95%或至少98%)。在一些實施例中，在給與小鼠一至三次劑量之0.3至3 mg/kg (諸如0.3至0.6 mg/kg) CD80 ECD Fc融合分子後獲得此等結果。

本文亦包含有包含人類CD80 ECD多肽及人類IgG1 Fc域(諸如野生型人類IgG1 Fc)之CD80 ECD融合分子，其中CD80 ECD Fc每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包

含SEQ ID NO:20之胺基酸序列。在一些實施例中，該分子能夠經至少十天之時段(諸如至少兩週，諸如至少三週，諸如經十天至兩週或兩至三週之時段)使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低至少90% (諸如至少95%或至少98%)。在一些實施例中，在給與小鼠一至三次劑量之0.3至3 mg/kg (諸如0.3至0.6 mg/kg) CD80 ECD Fc融合分子後獲得此等結果。

亦包含有包含CD80 ECD IgG1 Fc且進一步包含至少一種醫藥學上可接受之載劑的組合物。此類組合物亦可含有其他治療劑。在一些實施例中，其他治療劑為至少一種免疫刺激劑，諸如程式化細胞死亡1 (PD-1)/程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)抑制劑。在一些情況下，PD-1/PD-L1抑制劑為抗體，諸如抗PD-1抗體，諸如尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗。舉例而言，抗體可具有選自尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗之抗體的重鏈及輕鏈CDR或重鏈及輕鏈可變區。在其他實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-L1抗體。抗PD-L1抗體可具有選自例如BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈CDR，或可包含BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736或MSB0010718C之重鏈及輕鏈可變區。在一些實施例中，抗PD-1抗體係選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C。或者，PD-1/PD-L1抑制劑可為PD-1融合分子(諸如AMP-224)或多肽(諸如AUR-012)。

本發明亦涵蓋治療個體之癌症的方法，其包含投與個體有效量之上述CD80 ECD IgG1 Fc融合分子。在一些實施例中，癌症為實體腫瘤，諸如選自以下之癌症：結腸直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、頭部及頸部之鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌及子宮內膜癌。在一些實施例中，癌症在選自手術、化學療法、放射療

法或其組合之療法後復發或進展。

在一些此等方法實施例中，CD80 ECD Fc每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域為人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包含SEQ ID NO:20或21之胺基酸序列。在一些實施例中，在用腫瘤細胞接種小鼠後，分子能夠經兩或三週之時段使小鼠中之CT26腫瘤細胞之生長降低至少90%。在一些實施例中，在用腫瘤細胞接種小鼠後，分子能夠經兩或三週之時段使小鼠中之CT26腫瘤細胞之生長降低至少95%，諸如降低至少98%。舉例而言，此類結果可在給與小鼠一至三次劑量之0.3至3.0 mg/kg (諸如0.3至0.6 mg/kg) ECD Fc融合分子時獲得。在一些方法實施例中，CD80 ECD Fc每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-40 mol SA，且CD80 ECD Fc經兩或三週之時段降低小鼠中CT26腫瘤細胞之生長的程度大於每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含少於10 mol SA的相同胺基酸序列之CD80 ECD Fc蛋白質。本發明亦包含提高CD80 ECD融合蛋白在治療個體之癌症中之功效的方法，其包含增加CD80 ECD融合蛋白中唾液酸(SA)之含量或提供具有增加之SA含量的CD80 ECD融合蛋白及投與個體包含增加之含量的SA的CD80

ECD融合蛋白。在一些此類實施例中，每莫耳CD80 ECD蛋白質之SA含量增加5、10、20、30、40或50 mol。在一些此等方法實施例中，CD80 ECD Fc每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域為人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包含SEQ ID NO:20或21之胺基酸序列。在一些實施例中，分子能夠經兩或三週之時段使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低至少90%。在一些實施例中，該分子能夠經至少十天之時段(諸如至少兩週，諸如至少三週，諸如經十天至兩週或兩至三週之時段)使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低至少95% (諸如至少98%)。在一些實施例中，在給與小鼠一至三次劑量之0.3至3 mg/kg (諸如0.3至0.6 mg/kg) CD80 ECD Fc融合分子後獲得此等結果。

在一些此等方法實施例中，提高之功效以整體存活增加、無疾病存活增加之形式或以動物或人類個體中至少一種腫瘤之生長大大降低之形式量測。換言之，相較於具有較低SA含量之CD80 ECD融合分子，此等參數中之一或多者在投與具有較高SA含量之CD80 ECD融合分子後改良。在其他實施例中，提高之功效以小鼠同基因型或異種移植模型(諸如CT26小鼠模型)中腫瘤生長大大降低之形式或以動物或人類個體中清除速率降低之形式量測。在一些實施例中，功效以個體中至少一種腫瘤之腫瘤生長大大降

低或至少一種小鼠同基因型或異種移植模型中腫瘤生長大大降低之形式量測，且其中相較於投與無增加之SA含量的CD80 ECD融合分子，在投與具有增加之SA含量的CD80 ECD融合分子後，腫瘤生長進一步降低至少10% (諸如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%)。

應瞭解，前述一般描述及以下實施方式詳細描述僅為例示性及解釋性的且不限制申請專利範圍。本文中所用之章節標題僅出於組織目的而不應被視為限制所述標的物。本文所引用之所有參考文獻，包括專利申請案及公開案，出於任何目的以全文引用的方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1A-1B展示相較於CTLA4 ECD Fc融合分子及生理食鹽水對照，投與植入有鼠類結腸直腸癌細胞株CT26細胞之小鼠CD80 ECD Fc融合分子的作用。圖1A展示直至用CT26細胞接種小鼠後21天的腫瘤體積。如圖中所示，相較於生理食鹽水對照，以統計學上顯著之方式，CTLA4 ECD Fc提高腫瘤生長，而CD80 ECD Fc抑制腫瘤生長。對研究每日之計算腫瘤體積使用不配對雙尾t檢驗分析來計算P值(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。圖1B展示接種後第19天三個組之個別腫瘤體積。

圖2A-2B展示相較於生理食鹽水對照，投與植入有鼠類結腸直腸癌細胞株CT26細胞之小鼠CD80 ECD Fc融合分子或抗PD-1抗體或兩者之組合的作用。圖2A展示直至接種後14天的腫瘤體積。相較於CD80 ECD Fc (第9天後開始 $p < 0.01$)或抗PD-1 (在第14天 $p < 0.01$)單一療法，投與CD80 ECD Fc與抗PD-1組合之小鼠展示統計學上顯著之腫瘤生長降低。經由雙尾不配對t檢驗比較組合組與CD80 ECD Fc組來測定統計顯著性。圖2B展示第14

天之個別腫瘤體積。

圖3A-B展示Fc融合多肽序列對CD80 ECD Fc融合分子對小鼠中CT26腫瘤之腫瘤生長之作用的作用。特定言之，投與小鼠生理食鹽水對照，或CD80 ECD Fc與人類IgG1野生型Fc域融合搭配物(CD80-IgG1 WT)或CD80 ECD Fc與突變(L234F/L235E/P331S)人類IgG1 Fc域融合搭配物(CD80-IgG1 MT)。圖3A展示直至接種後第21天腫瘤體積之變化。突變Fc域使抗腫瘤活性提高，其在接種後第14天開始為統計學上顯著的($p<0.01$)。經由雙尾未配對t檢驗測定統計顯著性。圖3B展示接種後第21天之個別腫瘤體積。

圖4A-B展示在暴露於生理食鹽水對照或具有野生型及突變Fc融合搭配物之CD80 ECD Fc融合分子後針對CD3+及CD4+ T細胞之存在對鼠類腫瘤細胞進行之染色。圖4A提供代表性影像，其展示注射生理食鹽水、CD80-IgG1 WT或CD80-IgG1 MT後7天收集的CT26腫瘤中之CD3+細胞(上部影像)及相應DAPI染色(核，下部影像)。相較於媒劑，CD80-IgG1 WT與CD80-IgG1 MT增加腫瘤內CD3+細胞之數目，但CD80-IgG1 MT後增加幅度較大。使用10×物鏡收集影像。圖4B提供代表性影像，其展示注射生理食鹽水、CD80-IgG1 WT或CD80-IgG1 MT後7天收集的CT26腫瘤中的CD3+細胞(上列)及CD4+細胞(下列)。在同一視野但用不同通道採集影像。相較於媒劑，CD80-IgG1 WT與CD80-IgG1 MT均使浸潤性CD4+細胞之數目增加。相較於CD80-IgG1 WT，使用CD80-IgG1 MT時CD3+與CD4+細胞之比率增加。使用10×物鏡收集影像。

圖5A-D展示暴露於塗有0.01、0.1或1微克/孔CD80 ECD IgG1 Fc域融合分子(CD80-Fc)之蛋白A珠粒的96孔組織培養盤上自T細胞釋放之細胞

激素IFN- γ 及TNF- α 。圖5A及5C展示如藉由可溶性細胞激素產生所量測，單獨的珠粒固定之CD80-Fc不會引起顯著T細胞活化。圖5B及5D展示在少量OKT3-scFv (過低而不會自行引起T細胞刺激)與CD80-Fc一起固定時，觀測到細胞激素釋放。

圖6展示用生理食鹽水對照或0.3或0.6 mg/kg劑量之三個不同批次之具有三種不同唾液酸(SA)含量的CD80 ECD Fc融合分子處理後鼠類CT26腫瘤之腫瘤生長。批次A每莫耳蛋白質具有5 mol SA，批次D每莫耳蛋白質具有15 mol SA且批次E每莫耳蛋白質具有20 mol SA。相較於對照，用以0.3或0.6 mg/kg給與之CD80 ECD Fc批次E處理使腫瘤生長抑制93%及98% ($P<0.001$)。相較於對照，用以0.3或0.6 mg/kg給與之CD80 ECD Fc批次D處理使腫瘤生長抑制93%及95% ($P<0.001$)。藉由比較，相較於對照，用0.3 mg/kg之CD80 ECD Fc批次A處理並不抑制腫瘤生長，且在以0.6 mg/kg給與時，其僅誘導70%腫瘤生長抑制($P<0.001$)。

圖7展示用以下處理之CT26腫瘤的腫瘤生長：10 mg/kg小鼠IgG2b；0.3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol；10 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9；及1.5 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9。箭頭指示何時給與小鼠。星號(*)表示0.3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol與其他處理之間的統計學上顯著之差異。

圖8展示用以下處理之MC38腫瘤的腫瘤生長：10 mg/kg小鼠IgG2b；3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol；10 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9；及1.5 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9。箭頭指示何時給與小鼠。星號(*)表示3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol與其他處理之間的統計學上顯著之差異。

圖9展示用以下處理之B16腫瘤的腫瘤生長：10 mg/kg小鼠IgG2b；3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol；10 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9；及1.5 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9。箭頭指示何時給與小鼠。星號(*)表示3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol與其他處理之間的統計學上顯著之差異。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2016年8月11日申請之美國臨時專利申請案第62/373,654號及2015年11月2日申請之美國臨時申請案第62/249,836號的優先權，該等申請案均以全文引用之方式併入本文中。

定義

除非另外定義，否則結合本發明使用之科學及技術術語將具有一般技術者通常瞭解之含義。此外，除非上下文另外需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。

在本申請案中，除非另外說明，否則「或」之使用意謂「及/或」。在多個附屬項的情況下，「或」之使用僅以替代方式重新提及超過一個前述獨立項或附屬項。此外，除非另外特別陳述，否則諸如「元件」或「組件」之術語涵蓋包含一個單元之元件及組件與包含超過一個子單元之元件及組件。

舉例而言，尤其Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))中描述描述與重組DNA、寡核苷酸合成、組織培養及轉型(例如電穿孔、脂質體轉染)、酶促反應及純化技術結合使用之例示性技術。

除非另外指定，否則如根據本發明使用之以下術語應理解為具有以下含義：

術語「**核酸分子**」及「**聚核苷酸**」可互換使用，且係指核苷酸之聚合物。此類核苷酸之聚合物可含有天然及/或非天然核苷酸且包括(但不限於)DNA、RNA及PNA。「**核酸序列**」係指構成核酸分子或聚核苷酸之核苷酸的線性序列。

術語「**多肽**」與「**蛋白質**」可互換使用且係指胺基酸殘基聚合物，且不限於最小長度。此類胺基酸殘基之聚合物可含有天然或非天然胺基酸殘基且包括(但不限於)肽、寡肽、胺基酸殘基之二聚物、三聚物及多聚物。該定義涵蓋全長蛋白質與其片段。該等術語亦包括多肽之表現後修飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化及其類似修飾。此外，出於本發明之目的，「多肽」係指包括對天然序列之修飾(諸如缺失、添加及取代(一般為保守性質))之蛋白質，只要該蛋白質維持所要活性即可。此等修飾可為有意的，如經由定點突變誘發；或可為偶然的，諸如經由產生蛋白質之宿主的突變或因PCR擴增所致的錯誤。

「**CD80胞外域**」或「**CD80 ECD**」係指CD80之胞外域多肽，包括其天然及經工程改造之變異體。CD80 ECD之非限制性實例包括SEQ ID NO:--。「**CD80 ECD融合分子**」係指包含CD80 ECD及融合搭配物(諸如Fc域、白蛋白或PEG)之分子。融合搭配物可共價連接於例如CD80 ECD之N末端或C末端或內部位置。CD80 ECD融合分子之非限制性實例包括SEQ ID NO:--。

術語「**程式化細胞死亡蛋白1**」及「**PD-1**」係指屬於CD28家族之免疫抑制受體。PD-1在活體內主要在先前活化之T細胞上表現，且結合於兩種

配位體PD-L1及PD-L2。如本文所用，術語「PD-1」包括人類PD-1 (hPD-1)、hPD-1之變異體、同功異型物及物種同源物，及具有hPD-1之至少一種常見抗原決定基之類似物。完整hPD-1序列可見於Genbank寄存編號U64863。在一些實施例中，PD-1為具有SEQ ID NO:--(前驅物，含有信號序列)或SEQ ID NO:--(成熟，無信號序列)之胺基酸序列的人類PD-1。

術語「程式化細胞死亡1配位體1」及「PD-L1」係指PD-1之兩種細胞表面醣蛋白配位體中之一者(另一者為PD-L2)，其在結合於PD-1後下調T細胞活化及細胞激素分泌。如本文所用，術語「PD-L1」包括人類PD-L1 (hPD-L1)、hPD-1之變異體、同功異型物及物種同源物，及具有hPD-L1之至少一種常見抗原決定基之類似物。完整hPD-L1序列可見於Genbank®寄存編號Q9NZQ7。在一些實施例中，PD-L1為具有SEQ ID NO:--(前驅物，含有信號序列)或SEQ ID NO:--(成熟，無信號序列)之胺基酸序列的人類PD-L1。

如本文所用，術語「免疫刺激劑」係指藉由充當免疫刺激分子(包括共刺激分子)之促效劑或充當免疫抑制分子(包括共抑制分子)之拮抗劑來刺激免疫系統之分子。免疫刺激劑可為生物製劑，諸如抗體或抗體片段、其他蛋白質或疫苗，或可為小分子藥物。「免疫刺激分子」包括用於增強、刺激、誘導或以其他方式「開啟」免疫反應的受體或配位體。如本文所定義的免疫刺激分子包括共刺激分子。「免疫抑制分子」包括用於降低、抑制、抑止或以其他方式「關閉」免疫反應的受體或配位體。如本文所定義的免疫抑制分子包括共抑制分子。此類免疫刺激及免疫抑制分子可為例如免疫細胞(諸如T細胞)上所發現或參與先天免疫之細胞(諸如NK細胞)上所發現的受體或配位體。

術語「**PD-1/PD-L1抑制劑**」係指干擾PD-1/PD-L1信號傳導路徑之部分。在一些實施例中，抑制劑藉由結合於PD-1及/或PD-L1抑制PD-1/PD-L1信號傳導路徑。在一些實施例中，抑制劑亦結合於PD-L2。在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑阻斷PD-1與PD-L1及/或PD-L2結合。非限制性例示性PD-1/PD-L1抑制劑包括結合於PD-1之抗體；結合於PD-L1之抗體；融合蛋白，諸如AMP-224；及肽，諸如AUR-012。

術語「**抑制PD-1之抗體**」係指結合於PD-1或結合於PD-L1且從而抑制PD-1及/或PD-L1信號傳導之抗體。在一些實施例中，抑制PD-1之抗體結合於PD-1且阻斷PD-L1及/或PD-L2與PD-1結合。在一些實施例中，抑制PD-1之抗體結合於PD-L1且阻斷PD-1與PD-L1結合。抑制PD-1且結合於PD-L1的抗體可稱為抗PD-L1抗體。抑制PD-1且結合於PD-1的抗體可稱為抗PD-1抗體。

關於CD80 ECD及CD80 ECD融合分子，術語「**阻斷**」配位體「之結合」及其語法變化形式係指抑制CD80與CD80配位體(諸如CD28、CTLA4或PD-L1)之間的相互作用的之能力。此類抑制可經由任何機制進行，包括藉由競爭與CD80配位體結合之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。

關於抗PD-1抗體及PD-1融合分子或肽，術語「**阻斷**」配位體(諸如PD-L1)「之結合」及其語法變化形式用以指抑制PD-1與PD-1配位體(諸如PD-L1)之間的相互作用的能力。此類抑制可經由任何機制進行，包括直接干擾配位體結合(例如因為覆蓋PD-1上之結合位點)，及/或改變配位體親和力之抗體誘導的PD-1構形改變等，或在PD-1融合分子或肽之情況下，藉由競爭與PD-1配位體結合。

「**親和力**」或「**結合親和力**」係指分子(例如多肽)之單一結合位點與

其結合搭配物(例如配位體)之間的非共價相互作用之總和的強度。在一些實施例中，「結合親和力」係指內源結合親和力，其反映結合對(例如多肽與配位體)之成員之間的1:1相互作用。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(K_d)表示。

如本文所用，術語「抗體」係指包含至少重鏈之互補決定區(CDR) 1、CDR2及CDR3及至少輕鏈之CDR1、CDR2及CDR3的分子，其中該分子能夠結合於抗原。術語抗體包括(但不限於)能夠結合抗原之片段，諸如Fv、單鏈Fv (scFv)、Fab、Fab'及(Fab')₂。術語抗體亦包括(但不限於)嵌合抗體、人類化抗體及各種物種之抗體，諸如小鼠、人類、獼猴等。

在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區。在一些實施例中，抗體包含至少一個包含重鏈可變區及重鏈恆定區之至少一部分的重鏈，及至少一個包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區之至少一部分的輕鏈。在一些實施例中，抗體包含兩個重鏈，其中各重鏈包含重鏈可變區及重鏈恆定區之至少一部分，及兩個輕鏈，其中各輕鏈包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區之至少一部分。如本文所使用，單鏈Fv (scFv)或包含例如單一多肽鏈(包含全部六個CDR(三個重鏈CDR及三個輕鏈CDR))的任何其他抗體視為具有重鏈及輕鏈。在一些此類實施例中，重鏈為包含三個重鏈CDR之抗體區且該抗體區中之輕鏈包含三個輕鏈CDR。

術語「重鏈可變區」係指包含重鏈HVR1、構架(FR) 2、HVR2、FR3及HVR3之區域。在一些實施例中，重鏈可變區亦包含FR1之至少一部分及/或FR4之至少一部分。

術語「重鏈恆定區」係指包含至少三個重鏈恆定域C_H1、C_H2及C_H3之區域。非限制性例示性重鏈恆定區包括 γ 、 δ 及 α 。非限制性例示性重鏈恆

定區亦包括 ϵ 及 μ 。各重鏈恆定區對應於抗體同型。舉例而言，包含 γ 恆定區之抗體為IgG抗體，包含 δ 恆定區之抗體為IgD抗體且包含 α 恆定區之抗體為IgA抗體。另外，包含 μ 恆定區之抗體為IgM抗體且包含 ϵ 恆定區之抗體為IgE抗體。特定同型可進一步細分為子類。舉例而言，IgG抗體包括(但不限於)IgG1 (包含 γ_1 恆定區)、IgG2 (包含 γ_2 恆定區)、IgG3 (包含 γ_3 恆定區)及IgG4 (包含 γ_4 恆定區)抗體；IgA抗體包括(但不限於)IgA1 (包含 α_1 恆定區)及IgA2 (包含 α_2 恆定區)抗體；且IgM抗體包括(但不限於)IgM1及IgM2。

術語「**重鏈**」係指包含重鏈可變區、具有或不具有前導序列的多肽。在一些實施例中，重鏈包含重鏈恆定區之至少一部分。術語「**全長重鏈**」係指包含重鏈可變區及重鏈恆定區、具有或不具有前導序列之多肽。

術語「**輕鏈可變區**」係指包含輕鏈HVR1、構架(FR) 2、HVR2、FR3及HVR3之區域。在一些實施例中，輕鏈可變區亦包含FR1及/或FR4。

術語「**輕鏈恆定區**」係指包含輕鏈恆定域 C_L 之區域。非限制性例示性輕鏈恆定區包括 λ 及 κ 。

術語「**輕鏈**」係指包含至少一個輕鏈可變區、具有或不具有前導序列的多肽。在一些實施例中，輕鏈包含輕鏈恆定區之至少一部分。術語「**全長輕鏈**」係指包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區、具有或不具有前導序列之多肽。

術語「**高變區**」或「**HVR**」係指抗體可變域中在序列上具有高變性及/或形成結構上定義之環(「**高變環**」)的各區域。一般而言，天然四鏈抗體包含六個HVR；三個位於 V_H 中(H1、H2、H3)，且三個位於 V_L 中(L1、L2、L3)。HVR一般包含來自高變環及/或來自「**互補決定區**」(「**CDR**」)的氨基酸殘基，後者具有最高的序列可變性及/或參與抗原識別。例示性高變環

出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2) 及 96-101 (H3) 處。(Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。) 例示性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3) 出現在L1之胺基酸殘基24-34、L2之胺基酸殘基50-56、L3之胺基酸殘基89-97、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之胺基酸殘基50-65及H3之胺基酸殘基95-102。(Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。術語高變區(HVR)及互補決定區(CDR)均指形成抗原結合區之可變區部分。

如本文所用,「嵌合抗體」係指包含至少一個來自第一物種(諸如小鼠、大鼠、獼猴等)之可變區及至少一個來自第二物種(諸如人類、獼猴等)之恆定區的抗體。在一些實施例中,嵌合抗體包含至少一個小鼠可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中,嵌合抗體包含至少一個獼猴可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中,嵌合抗體包含至少一個大鼠可變區及至少一個小鼠恆定區。在一些實施例中,嵌合抗體之全部可變區來自第一物種且嵌合抗體之全部恆定區來自第二物種。

如本文所用,「人類化抗體」係指非人類可變區之構架區中的至少一個胺基酸置換為來自人類可變區之相應胺基酸的抗體。在一些實施例中,人類化抗體包含至少一個人類恆定區或其片段。在一些實施例中,人類化抗體為Fab、scFv、(Fab')₂等。

如本文所用,「人類抗體」係指人類中產生的抗體、包含人類免疫球蛋白基因之非人類動物(諸如XenoMouse®)中產生的抗體及使用活體外方法(諸如噬菌體呈現)選擇之抗體,其中抗體譜系基於人類免疫球蛋白序列。

術語「前導序列」係指促進多肽自哺乳動物細胞分泌的位於多肽N端的胺基酸殘基序列。前導序列當自哺乳動物細胞輸出多肽時可裂解，從而形成成熟蛋白質。前導序列可為天然或合成的，且其可與其所連接之蛋白質異源或同源。非限制性例示性前導序列亦包括來自異源蛋白質之前導序列。在一些實施例中，抗體不具有前導序列。在一些實施例中，抗體包含至少一個前導序列，其可選自天然抗體前導序列及異源前導序列。

如本文所用，術語「經分離」係指已與自然界中通常存在的至少一些組分分離的分子。舉例而言，當多肽與產生多肽之細胞的至少一些組分分離時，該多肽稱為「經分離」。若多肽在表現後由細胞分泌，則將含有多肽之清液層與產生其之細胞在實體上分離視為「分離」該多肽。類似地，當聚核苷酸不為自然界中其通常存在之較大聚核苷酸(諸如基因組DNA或粒線體DNA，在DNA聚核苷酸的情況下)之一部分或與產生其之細胞中的至少一些組分分離(例如在RNA聚核苷酸的情況下)時，稱為「經分離」。因此，含於宿主細胞內部之載體中的DNA聚核苷酸可稱為「經分離」，只要自然界中該聚核苷酸不存在於該載體中。

術語「降低」在用於諸如腫瘤體積之參數時意謂以可觀測可量測方式降低參數之水準。在一些實施例中，降低可為至少10%，諸如至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些實施例中，相較於替代治療或對照，降低可為統計學上顯著的。

術語「個體」及「患者」在本文中可互換地用於指人類。在一些實施例中，亦提供治療其他哺乳動物(包括(但不限於)啮齒動物、猿猴、貓科動物、犬科動物、馬科動物、牛科動物、豬科動物、綿羊、山羊、哺乳實驗室哺乳動物、哺乳農畜、哺乳運動動物及哺乳寵物)之方法。

術語「耐藥性」或「非反應性」在用於用治療劑治療之情況下時意謂相對於以往個體對標準劑量之治療劑反應，或相對於患有類似病症之類似個體對標準劑量之治療劑的預期反應，個體對標準劑量之治療劑展示降低之反應或缺乏反應。因此，在一些實施例中，儘管個體先前並未給與治療劑，但個體可對治療劑具有耐藥性，或個體在一或多個先前場合對治療劑產生反應後可對該治療劑產生耐藥性。

如本文所用，術語「樣品」係指例如基於物理、生物化學、化學及/或生理學特徵表徵、定量及/或鑑別的獲自或源自含有細胞及/或其他分子實體之個體的組合物。例示性樣品為組織樣品。

術語「組織樣品」係指獲自個體之組織的類似細胞的統稱。組織樣品來源可為來自新鮮、冷凍及/或保藏之器官或組織樣品或生物檢體或抽出物的固體組織；血液或任何血液組分；體液，諸如大腦脊髓液、羊膜液、腹膜液、滑液或間質液；個體妊娠或發育的任何時間的細胞。在一些實施例中，組織樣品為滑膜生物檢體組織樣品及/或滑液樣品。在一些實施例中，組織樣品為滑液樣品。組織樣品亦可為初級或經培養細胞或細胞株。視情況，組織樣品獲自疾病組織/器官。組織樣品可含有自然界中不與組織天然互混之化合物，諸如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、營養物、抗生素或其類似物。如本文所用，「對照樣品」或「對照組織」係指獲自己知來源或咸信未罹患個體所治療之疾病的樣品、細胞或組織。

出於本文之目的，組織樣品「切片」意謂組織樣品之部分或塊，諸如自實體組織樣品切割的組織或細胞之薄切片。

本文所用之術語「癌症」係指展現異常高增殖及生長水準的細胞群。癌症可為良性(亦稱為良性腫瘤)、惡化前或惡性的。癌細胞可為實體癌細

胞(亦即「**實體腫瘤**」)或可為白血病性癌細胞。本文所用之術語「**癌症生長**」係指包含癌症之細胞的增殖或生長，此導致癌症尺寸或程度相應增加。

癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。更特定而言，此類癌症之非限制性實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食道癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌(包括鱗狀細胞非小細胞肺癌)、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、腎細胞癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌、胃癌、黑色素瘤及各種類型之頭頸癌(包括頭部及頸部之鱗狀細胞癌)。

如本文所用，「**治療**」係指治療性處理與預防性或防治性措施，其中目標為預防或減緩(減輕)靶向病理性病狀或病症。在某些實施例中，術語「**治療**」涵蓋針對哺乳動物(包括人類)之疾病的治療劑的任何投與或施用，且包括抑制或減緩疾病或疾病進展；部分或完全緩解疾病，例如藉由引起消退，或恢復或修補損失、缺失或缺乏的功能；刺激低效過程；或使疾病平穩以具有降低之嚴重性。術語「**治療**」亦包括降低任何表現型特徵之嚴重性及/或降低該特徵之發生率、程度或可能性。需要治療者包括已患該病症者以及傾向於患該病症者或預防該病症者。

如本文所用，術語「**功效**」可由經諸如1年、5年或10年之時段之一或多個參數(諸如存活或無疾病存活)以及諸如個體之一或多種腫瘤生長降低的參數測定。藥物動力學參數(諸如生物可用性)及基礎參數(諸如清除率)亦可影響功效。因此，「**提高之功效**」(亦即功效改良)可歸因於改良之藥

物動力學參數以及改良之效能，且可藉由比較測試動物或人類個體中之清除率及腫瘤生長以及諸如存活率、復發率或無疾病存活之參數量測。

術語「有效量」或「治療有效量」係指有效治療個體之疾病或病症的藥物之量。在某些實施例中，有效量係指以必需的劑量及時間段有效達成所要治療或預防結果的量。CD80 ECD或CD80 ECD融合分子之治療有效量可根據如下因素變化，諸如個體之疾病病況、年齡、性別及體重及藥物在個體體內引發所要反應的能力。治療有效量涵蓋治療有利作用超過藥物之任何毒性或不利作用的量。在一些實施例中，表述「有效量」係指藥物有效治療癌症之量。「與」一或多種其他治療劑(諸如免疫刺激劑)「組合」投與包括同時(共同)及以任何次序連續(依序)投與。

「醫藥學上可接受之載劑」係指與治療劑一起用於構成向個體投與之「醫藥組合物」的此項技術中習知的無毒固體、半固體或液體填補劑、稀釋劑、囊封材料、調配助劑或載劑。醫藥學上可接受之載劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒且與調配物之其他成分相容。醫藥學上可接受之載劑適於所用之調配物。舉例而言，若治療劑欲經口投與，則載劑可為凝膠膠囊。若治療劑欲皮下投與，則載劑理想地對於皮膚不具刺激性且不會引起注射位點反應。

例示性CD80胞外域及胞外域融合分子

本文提供CD80 ECD及CD80 ECD融合分子。CD80 ECD例如可包含人類CD80同功異型物1、同功異型物2及同功異型物3之ECD (參見SEQ ID NO:1-3)。在一些實施例中，CD80 ECD可包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列。

CD80 ECD融合分子可包含融合搭配物，諸如聚合物、多肽、親脂性部分及丁二醯基。例示性多肽融合搭配物包括(但不限於)血清白蛋白及IgG

Fc域。其他例示性聚合物融合搭配物包括(但不限於)聚乙二醇，包括具有分支鏈及/或線性鏈之聚乙二醇。特定例示性Fc域之胺基酸序列在本文中以SEQ ID NO:9-16展示。

在某些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子缺乏信號肽。在某些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子包括至少一種信號肽，其可選自天然CD80信號肽(SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:1之胺基酸1-34)及/或異源信號肽。

在CD80 ECD融合分子之情況下，融合搭配物可連接於多肽之胺基端或羧基端。在某些實施例中，多肽與融合搭配物共價連接。若融合搭配物亦為多肽(「融合搭配物多肽」)，則該多肽及融合搭配物多肽可為連續胺基酸序列之一部分。在此類情況下，多肽及融合搭配物多肽可由編碼該多肽與該融合搭配物多肽之編碼序列轉譯為單一多肽。在一些此類情況下，兩種多肽直接依序連接以使得一種多肽之N末端緊跟在另一多肽之C末端之後而無介入胺基酸。在其他情況下，在兩種多肽之間插入連接肽序列，諸如GS連接序列。在某些實施例中，CD80 ECD與融合搭配物經由其他方式共價連接，諸如除肽鍵以外的化學鍵。在某些實施例中，多肽與融合搭配物非共價連接。在某些此類實施例中，其可例如使用結合對連接。例示性結合對包括(但不限於)生物素與抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素、抗體與其抗原等。

在一些實施例中，CD80 ECD融合分子包含SEQ ID NO:20或21之序列。

CD80 ECD融合分子可視其產生方式而定具有不同水準之特定糖基化修飾。舉例而言，相對於CD80 ECD蛋白質之濃度，CD80 ECD融合分子

可具有不同濃度之唾液酸殘基。在一些實施例中，較高唾液酸含量可在體內具有較長清除時間，因此具有提高之整體生物可用性。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子之唾液酸含量為每莫耳蛋白質10至60 mol唾液酸(SA)。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子之唾液酸含量為每莫耳蛋白質15至60 mol唾液酸(SA)。舉例而言，在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-30 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-25 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-30 mol SA，諸如每莫耳蛋白質30-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質10、15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少25 mol SA、每莫耳蛋白質至少30 mol SA、每莫耳蛋白質至少35 mol SA或每莫耳蛋白質至少40 mol SA。在一些此類實施例中，融合搭配物為Fc域，諸如人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。

在一些實施例中，相較於當前CD80 ECD融合分子，CD80 ECD融合分子之SA含量增加或維持在相對高水準下。在一些實施例中，SA含量增加(諸如每莫耳CD80 ECD蛋白質增加5、10、15、20、30、40或50 mol SA)可使至少一種小鼠同基因型或異種移植腫瘤模型中之功效提高。舉例而言，在一些實施例中，在SA含量增加(諸如每莫耳CD80 ECD蛋白質增加5、10、15、20、30、40或50 mol SA)時，小鼠腫瘤模型中之腫瘤生長可進一步降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或98%。

舉例而言，在一些實施例中，CD80 ECD Fc融合分子(諸如包含人類IgG1 Fc域且每莫耳蛋白質包含10至60 mol SA之融合分子)能夠經用腫瘤

細胞接種後至少十天或至少兩週或至少三週(諸如十天至兩週或兩至三週)之時段在至少一種小鼠同基因型或異種移植癌症模型中產生至少80% (諸如至少90%，諸如至少95%，諸如至少98%)腫瘤細胞生長抑制。在一些此類實施例中，分子每莫耳蛋白質包含至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA，或在每莫耳蛋白質15-30、15-25或20-30 mol SA範圍內。在一些實施例中，小鼠模型為CT26、MC38或B16小鼠腫瘤模型。在一些實施例中，在腫瘤達到最小體積後，例如經一週之時段給與小鼠一至三次劑量的0.3至3.0 mg/kg (諸如0.3至0.6 mg/kg)的分子。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子包含SEQ ID NO:20或21之序列。

在一些實施例中，CD80 ECD Fc融合分子經接種後至少十天或至少兩週或至少三週(諸如十天至兩週或兩至三週)之時段使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低的程度大於具有一致胺基酸序列但每莫耳蛋白質具有較低含量之SA的CD80 ECD Fc融合蛋白。在一些實施例中，CD80 ECD Fc融合分子經接種後至少十天或至少兩週之時段(諸如經十天至兩週或兩至三週)使小鼠中CT26腫瘤之生長降低之程度大於抗CTLA4抗體，諸如抗CTLA4抗體純系9D9。在一些此類實施例中，以0.3 mg/kg、0.6 mg/kg或3.0 mg/kg給與CD80 ECD Fc分子一至三次，而以1.5或10 mg/kg給與抗CTLA4抗體相同次數。在一些此類實施例中，該模型為CT26、MC38或B16鼠類腫瘤模型。

本文之實例6例如提供如下資料，其展示用每莫耳蛋白質具有15或20 mol SA之CD80 ECD融合分子處理小鼠同基因型腫瘤模型在一次劑量之0.3 mg/kg後使腫瘤生長抑制至少93%，而用每莫耳蛋白質僅具有5 mol SA

之分子進行相同處理不顯著抑制腫瘤生長。類似地，0.6 mg/kg劑量的每莫耳蛋白質具有15或20 mol SA之CD80 ECD融合分子使腫瘤生長抑制95%至98%，而用每莫耳蛋白質具有5 mol SA之分子進行相同處理僅使腫瘤生長抑制70%。(參見圖6。) 用腫瘤接種後約三週評定抑制程度。

此外，本文之實例7展示相較於1.5 mg/kg及10 mg/kg劑量之抗CTLA4抗體(純系9D9)，三種不同同基因型小鼠腫瘤模型(CT26、MC38及B16模型)中0.3 mg/kg (CT26)或3.0 mg/kg (MC38及B16)劑量之每莫耳蛋白質具有20 mol SA之CD80 ECD Fc融合分子(小鼠替代物)的資料。如圖7-9中所描繪，用腫瘤細胞接種後數天經7天時段給與各蛋白質三次(箭頭展示給藥之日)。在各情況下，經兩至三週研究之時程，CD80 ECD Fc在腫瘤生長抑制方面優於抗CTLA4抗體。(圖7-9。) 舉例而言，在CT26模型中，在用腫瘤細胞接種後第21天，CD80 ECD Fc融合分子展示腫瘤生長降低90%，相比之下，兩種劑量之抗CTLA4為75%或53%。在MC38模型中，在接種後第19天，CD80 ECD Fc分子展示腫瘤生長抑制降低約80%，相比之下，較高劑量之抗CTLA4僅為21%腫瘤生長且較低抗CTLA4劑量為無腫瘤生長抑制。在B16模型中，CD80 ECD Fc融合分子展示在接種後第13天腫瘤生長抑制41%，而任一劑量之抗CTLA4抗體均不抑制腫瘤生長。(參見圖7-9。)

基於此等研究，CD80 ECD融合分子可經至少兩週時段(例如在用腫瘤細胞接種小鼠後約兩週時)具有特定百分比之腫瘤生長抑制，且用融合分子給藥後，在處理小鼠中觀測到約所述百分比之平均腫瘤生長抑制。CD80 ECD融合分子可經兩至三週時段(例如在用腫瘤細胞接種小鼠後約兩至三週時)具有特定百分比之腫瘤生長抑制，且用融合分子給藥後，在處理小鼠中觀測到約所述百分比之平均腫瘤生長抑制。

實例6及7亦展示來自用CD80 ECD融合分子處理之CT26模型的多個小鼠經此兩至三週時段具有完全腫瘤消退。此外，相較於用比較處理，用具有較高SA含量之CD80 ECD融合分子使較大百分比之小鼠具有完全腫瘤消退，且相較於用抗CTLA4抗體，用CD80 ECD融合分子使較大百分比之小鼠具有完全腫瘤消退。因此，在一些實施例中，用CD80 ECD融合分子處理，諸如用0.3 mg/kg至0.6 mg/kg CD80 ECD融合分子或用0.3 mg/kg至3.0 mg/kg CD80 ECD融合分子，可在同基因型或異種移植模型(諸如CT26、MC38或B16)之小鼠中產生完全腫瘤消退。

例示性Fc域融合搭配物

在一些實施例中，CD80 ECD融合分子具有Fc域作為融合搭配物。在一些實施例中，Fc域衍生自人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些實施例中，Fc域具有野生型序列，諸如野生型人類IgG1或IgG2 (例如IgG2a)序列。在其他實施例中，Fc域為天然或經工程改造之變異體。在一些實施例中，選擇Fc與一或多種Fc γ 受體具有改變之相互作用的Fc域。在一些實施例中，選擇Fc與一或多種補體因子具有改變之相互作用的Fc域。在一些實施例中，選擇Fc與一或多種Fc γ 受體具有改變之相互作用且與一或多種補體因子具有改變之相互作用的Fc域。

在一些實施例中，Fc域包含如WO 2014/144960中所述之至少一種點突變。在一些實施例中，Fc域為在位置E233、L234、L235、P238、D265、N297、A327、P329或P331 (其中此等位置之編號根據Kabat中之EU索引)中之一或多者處具有取代的人類Fc域。在一些實施例中，Fc域為在L234、L235及/或P331具有突變之人類Fc域。在一些實施例中，Fc域為具有取代L234F、L235E及P331S之人類Fc域。(參見例如SEQ ID NO:12。) 在一些

實施例中，Fc域在位置N297具有胺基酸取代。(參見例如SEQ ID NO:13。)

在一些實施例中，Fc域包含C237S突變。(參見例如SEQ ID NO:9。)

在一些實施例中，突變Fc融合搭配物產生CD80 ECD Fc融合分子以相較於除Fc域突變以外具有相同胺基酸序列之CD80 ECD融合分子與一或多種Fcγ受體具有改變之相互作用。在一些實施例中，相較於野生型Fc域，Fc對Fcγ受體(諸如FcRN、RI、RIIA、RIIB及RIII中之一或多者)具有降低之親和力。在一些實施例中，相較於野生型Fc域，Fc對所有FcRN、RI、RIIA、RIIB及RIII具有降低之親和力。

在一些實施例中，突變Fc融合搭配物產生CD80 ECD Fc融合分子以與一或多種補體因子(諸如C1、C2、C3、C4)及其裂解產物(諸如C4a、C4b、C2a、C2b、C3a及C3b)具有改變之相互作用。在一些實施例中，突變Fc融合搭配物產生CD80 ECD Fc融合分子以相較於除Fc域突變以外具有相同胺基酸序列的CD80 ECD融合分子與一或多種補體因子具有改變之相互作用。

在一些實施例中，CD80 ECD與融合搭配物(諸如Fc融合搭配物)直接連接，以使得Fc之N末端或C末端恰在CD80 ECD序列之N末端或C末端之前或之後。(參見例如SEQ ID NO:20及21。)在其他實施例中，CD80 ECD與融合搭配物藉由連接分子接合，諸如藉由連接肽序列，諸如藉由GS連接序列。

治療組合物及方法

治療癌症之方法

在一些實施例中，提供治療癌症之方法，其包含投與有效量之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。

在一些實施例中，癌症可為良性(亦稱為良性腫瘤)、前惡性或惡性的。在一些實施例中，癌症可包含實體癌細胞(亦即「實體腫瘤」)或者其可包含白血病性癌細胞。在一些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子有效降低人類或動物個體中或所治療癌症之小鼠同基因型或異種移植模型中之癌症生長。在一些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子有效降低諸如在所治療癌症之小鼠同基因型或異種移植模型中之腫瘤體積。

可治療之特定癌症的實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。更特定而言，此類癌症之非限制性實例包括(但不限於)鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食道癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌(包括鱗狀細胞非小細胞肺癌)、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、腎細胞癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌、胃癌、黑色素瘤及各種類型之頭頸癌(包括頭部及頸部之鱗狀細胞癌)。

在以上方法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可經1週、10天、2週或3週之時段使小鼠同基因型異種移植癌症模型中之腫瘤生長抑制例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在一些實施例中，CD80 ECD融合分子可在接種後兩週或三週使CT26小鼠異種移植腫瘤模型中之腫瘤生長抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在一些此類情況下，融合分子可以0.3至3 mg/kg (諸

如0.3至0.6 mg/kg)給與一至三次。在以上方法實施例中之任一者中，投與個體CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可例如經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使人類或動物個體中之至少一種腫瘤之體積降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在一些情況下，CD80 ECD Fc融合分子可在小鼠腫瘤模型(諸如CT26模型)中，例如在大部分測試小鼠(諸如至少40%或至少50%小鼠)中產生完全腫瘤消退。

在此等方法中之任一者中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可為CD80 ECD Fc，其每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域為人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包含SEQ ID NO:20或21之胺基酸序列。

用包括PD-1/PD-L1抑制劑之免疫刺激劑組合治療

在一些實施例中，將CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與有效量之至少一種免疫刺激劑組合投與以治療以上癌症中之一者。免疫刺激劑可包括例如小分子藥物或生物。生物免疫刺激劑之實例包括(但不限於)抗體、抗體片段、受體或配位體多肽之片段(例如阻斷受體-配位體結合之片段)、疫

苗及細胞激素。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含免疫刺激分子(包括共刺激分子)之促效劑，而在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含免疫抑制分子(包括共抑制分子)之拮抗劑。在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含免疫細胞(諸如T細胞)上所發現之免疫刺激分子(包括共刺激分子)之促效劑。在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含免疫細胞(諸如T細胞)上所發現之免疫抑制分子(包括共抑制分子)的拮抗劑。在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含參與先天性免疫之細胞(諸如NK細胞)上所發現之免疫刺激分子(包括共刺激分子)的促效劑。在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含參與先天性免疫之細胞(諸如NK細胞)上所發現之免疫抑制分子(包括共抑制分子)的拮抗劑。在一些實施例中，該組合增強所治療個體中的抗原特異性T細胞反應及/或增強個體之先天性免疫反應。在一些實施例中，相較於單獨投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子或免疫刺激劑，該組合使動物癌症模型(諸如同基因型或異種移植模型)中之抗腫瘤反應改良。在一些實施例中，相較於單獨投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子或免疫刺激劑，該組合在動物癌症模型(諸如同基因型或異種移植模型)中引起協同反應。

在以上組合療法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與免疫刺激劑(諸如PD-1/PD-L1抑制劑)之組合可經1週、10天、2週或3週之時段使小鼠同基因型或異種移植癌症模型中之腫瘤生長抑制例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在以上組合療法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與免疫

刺激劑(諸如PD-1/PD-L1抑制劑)之組合可例如經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使個體或動物模型中至少一種腫瘤之體積降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

在組合療法中之任一者中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可為每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA (諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA)之CD80 ECD Fc。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域為人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包含SEQ ID NO:20或21之胺基酸序列。

在某些實施例中，免疫刺激劑靶向作為免疫球蛋白超家族(IgSF)成員的刺激或抑制分子。舉例而言，免疫刺激劑可為的靶向(或特異性結合於)多肽之B7家族之另一成員的藥劑。免疫刺激劑可為靶向膜結合配位體之TNF家族成員的藥劑，或特異性地結合於TNF家族成員的共刺激或共抑制受體。免疫刺激劑可靶向的例示性TNF及TNFR家族成員包括CD40及CD40L、OX-40、OX-40L、GITR、GITRL、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137 (4-1BB)、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、

TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT β R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素 α /TNF β 、TNFR2、TNF α 、LT β R、淋巴毒素 α 1 β 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY及NGFR。

在一些實施例中，免疫刺激劑可包含(i)抑制T細胞活化之蛋白質(例如免疫檢查點抑制劑)的拮抗劑，該蛋白質諸如CTLA-4、LAG-3、TIM3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1、TIM-4及ILT4，及/或可包含(ii)刺激T細胞活化之蛋白質的促效劑，該蛋白質諸如B7-2、CD28、4-1BB (CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、CD40L、DR3及CD28H。

在一些實施例中，免疫刺激劑可包含抑制細胞激素或為細胞激素之拮抗劑的藥劑，該細胞激素抑制T細胞活化(例如IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF及其他免疫抑制性細胞激素)，且在一些實施例中，免疫刺激劑可包含作為刺激T細胞活化之細胞激素之促效劑的藥劑，該細胞激素諸如IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21及IFN α (例如細胞激素自身)。在一些實施例中，免疫刺激劑可包含趨化因子之拮抗劑，該趨化因子諸如CXCR2 (例如MK-7123)、CXCR4 (例如AMD3100)、CCR2或CCR4 (莫格利珠單抗(mogamulizumab))。

在一些實施例中，免疫刺激劑可包括NK細胞上之抑制性受體的拮抗劑或NK細胞上之活化受體的促效劑。舉例而言，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可與KIR之拮抗劑組合。

免疫刺激劑亦可包括抑制TGF- β 信號傳導的藥劑、提高腫瘤抗原呈現的藥劑(例如樹突狀細胞疫苗、分泌GM-CSF的細胞疫苗、CpG寡核苷酸及咪喹莫特(imiquimod))，或提高腫瘤細胞免疫原性的療法(例如蒽環黴素(anthracycline))。

免疫刺激劑亦可包括某些疫苗，諸如靶向間皮素的疫苗或減毒的李斯特菌癌症疫苗，諸如CRS-207。

免疫刺激劑亦可包含耗乏或阻斷Treg細胞的藥劑，諸如特異性結合於CD25的藥劑。

免疫刺激劑亦可包含抑制新陳代謝酶(諸如吲哚胺雙加氧酶(indoleamine dioxygenase; IDO)、雙加氧酶、精胺酸酶或氧化氮合成酶)的藥劑。

免疫刺激劑亦可包含抑制腺苷形成或抑制腺苷A_{2A}受體的藥劑。

免疫刺激劑亦可包含逆轉/防止T細胞失能或衰竭的藥劑及在腫瘤位點觸發先天性免疫活化及/或發炎的藥劑。

在一些實施例中，免疫刺激劑可包含CD40促效劑，諸如CD40促效抗體。CD80 ECD或CD80 ECD融合分子亦可與靶向免疫路徑之多個要素的組合方法組合，諸如以下中之一或多者：至少一種提高腫瘤抗原呈現的藥劑(例如樹突狀細胞疫苗、分泌GM-CSF的細胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特)；至少一種抑制負向免疫調節的藥劑，例如藉由抑制CTLA-4路徑及/或耗乏或阻斷Treg或其他免疫抑制細胞；刺激正向免疫調節的療法，例如使用刺激CD-137、OX-40及/或GITR路徑及/或刺激T細胞效應功能的促效劑；至少一種全身性地提高抗腫瘤T細胞出現率的藥劑；耗乏或抑制Treg(諸如腫瘤中之Treg)的療法，例如使用CD25拮抗劑(例如達利珠單抗

(daclizumab))或藉由離體抗CD25珠粒耗乏；至少一種影響腫瘤中之抑制性骨髓細胞之功能的藥劑；提高腫瘤細胞免疫原性的療法(例如蔥環黴素)；授受性T細胞或NK細胞轉移，包括經遺傳修飾之細胞，例如藉由嵌合抗原受體修飾之細胞(CAR-T療法)；至少一種抑制新陳代謝酶(諸如吲哚胺雙加氧酶(IDO)、雙加氧酶、精胺酸酶或氧化氮合成酶)的藥劑；至少一種逆轉/防止T細胞失能或衰竭的藥劑；在腫瘤位點觸發先天性免疫活化及/或發炎的療法；投與免疫刺激性細胞激素或阻斷免疫抑制性細胞激素。

舉例而言，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可與以下一起使用：一或多種連接正向共刺激受體的促效劑；一或多種經由抑制性受體減弱信號傳導的拮抗劑(阻斷劑)，諸如克服腫瘤微環境內之不同免疫抑止路徑的拮抗劑；一或多種全身性地增加抗腫瘤免疫細胞(諸如T細胞)出現率、耗乏或抑制Treg (例如藉由抑制CD25)的藥劑；一或多種抑制代謝酶(諸如IDO)的藥劑；一或多種逆轉/防止T細胞失能或衰竭的藥劑；及一或多種在腫瘤位點觸發先天性免疫活化及/或發炎的藥劑。

在一個實施例中，至少一種免疫刺激劑包含CTLA4拮抗劑，諸如拮抗性CTLA4抗體。適合CTLA4抗體包括例如YERVOY (伊匹單抗(ipilimumab))或曲美單抗(tremelimumab)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含LAG-3拮抗劑，諸如拮抗性LAG-3抗體。適合LAG-3抗體包括例如BMS-986016 (WO10/19570、WO14/08218)或IMP-731或IMP-321 (WO08/132601、WO09/44273)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含CD137 (4-1BB)促效劑，諸如促效性CD137抗體。適合CD137抗體包括例如優瑞路單抗(urelumab)及PF-05082566 (WO12/32433)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含GITR促效劑，諸如促效性GITR抗體。適合GITR抗體包括例如TRX-518 (WO06/105021、WO09/009116)、MK-4166 (WO11/028683)或WO2015/031667中所揭示的GITR抗體。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含OX40促效劑，諸如促效性OX40抗體。適合OX40抗體包括例如MEDI-6383、MEDI-6469或MOXR0916 (RG7888；WO06/029879)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含CD27促效劑，諸如促效性CD27抗體。適合CD27抗體包括例如瓦里木單抗(varlilumab)(CDX-1127)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含靶向B7H3的MGA271 (WO11/109400)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含KIR拮抗劑，諸如利瑞路單抗(lirilumab)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含IDO拮抗劑。IDO拮抗劑包括例如INCB-024360 (WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642)、因多莫得(indoximod)、NLG-919 (WO09/73620、WO09/1156652、WO11/56652、WO12/142237)或F001287。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含Toll樣受體促效劑，例如TLR2/4促效劑(例如卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin)；TLR7促效劑(例如希托洛(Hiltonol)或咪喹莫特(Imiquimod))；TLR7/8促效劑(例如雷西莫特(Resiquimod))；或TLR9促效劑(例如CpG7909)。

在一些實施例中，至少一種免疫刺激劑包含TGF- β 抑制劑，例如

GC1008、LY2157299、TEW7197或IMC-TR1。

在一些實施例中，與有效量之PD-1/PD-L1抑制劑組合投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子以治療以上癌症中之一者。

例示性PD-1/PD-L1抑制劑

PD-1/PD-L1抑制劑包括抗體、融合蛋白及肽。作為PD-1/PD-L1抑制劑的非限制性例示性融合蛋白為AMP-224(Amplimmune, GlaxoSmithKline)。作為PD-1/PD-L1抑制劑之非限制性例示性肽為AUR-012。其他例示性PD-1/PD-L1抑制劑包括抑制PD-1之抗體，諸如抗PD-1抗體及抗PD-L1抗體。此類抗體可為人類化抗體、嵌合抗體、小鼠抗體及人類抗體。

在一些實施例中，相較於單獨投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子或PD-1/PD-L1抑制劑，該組合在動物癌症模型(諸如異種移植模型)中產生改良之抗腫瘤反應。在一些實施例中，相較於單獨投與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子或PD-1/PD-L1抑制劑，該組合可在動物癌症模型(諸如異種移植模型)中產生協同反應。

PD-1為活化T及B細胞表現之關鍵免疫檢查點受體且介導免疫抑制。PD-1為CD28受體家族之成員，該受體家族包括CD28、CTLA4、ICOS、PD-1及BTLA。已鑑別PD-1之兩種細胞表面糖蛋白配位體，程式化死亡配位體1 (PD-L1)及程式化死亡配位體2 (PD-L2)。此等配位體表現於抗原呈現細胞以及多種人類癌症上且已展示在結合於PD-1後下調T細胞活化及細胞激素分泌。PD-1/PD-L1相互作用之抑制介導臨床前模型中的有效抗腫瘤活性。

以高親和力特異性結合於PD-1之人類單株抗體(HuMAb)已揭示於美

國專利第6,984,720號及第8,008,449號中。其他抗PD-1 mAb描述於例如美國專利第6,808,710號、第7,488,802號、第8,168,757號及第8,354,509號及PCT公開案第WO 2012/145493號中。美國專利第8,008,449號中所揭示之抗PD-1 HuMAb各：(a)如藉由表面電漿子共振使用Biacore生物感測器系統所測定，以 1×10^{-7} M或小於 1×10^{-7} M之 K_D 結合於人類PD-1；(b)實質上不結合於人類CD28、CTLA-4或ICOS；(c)提高混合淋巴細胞反應(MLR)分析中之T細胞增殖；(d)提高MLR分析中之干擾素- γ 產生；(e)提高MLR分析中之IL-2分泌；(f)結合於人類PD-1及獼猴PD-1；(g)抑制PD-L1及/或PD-L2與PD-1之結合；(h)刺激抗原特異性記憶反應；(i)刺激抗體反應；及/或(j)抑制活體內腫瘤細胞生長。本發明中可使用之抗PD-1抗體包括特異性地結合於人類PD-1且展現前述特徵(a)至(j)中至少一者、至少兩者、至少三者、至少四者或至少五者的抗體。

在一個實施例中，抗PD-1抗體為尼沃單抗。尼沃單抗(亦稱為「Opdivo[®]」，以前稱為5C4、BMS-936558、MDX-1106或ONO-4538)為全人類IgG4 (S228P) PD-1免疫檢查點抑制抗體，其選擇性阻止與PD-1配位體(PD-L1及PD-L2)之相互作用，從而阻斷抗腫瘤T細胞功能之下調(美國專利第8,008,449號；Wang等人, 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56)。

在另一實施例中，抗PD-1抗體為派立珠單抗。派立珠單抗(亦稱為「Keytruda[®]」、拉立珠單抗及MK-3475)為針對人類細胞表面受體PD-1(程式化死亡-1或程式化細胞死亡-1)的人類化單株IgG4抗體。派立珠單抗描述於例如美國專利第8,900,587號中；亦參見如下位址之站點：「[www](http://www.fda.gov/drugs/infomation/ondansetron/ondansetron.htm)」.「[cancer](http://www.fda.gov/drugs/infomation/ondansetron/ondansetron.htm)」.「[gov](http://www.fda.gov/drugs/infomation/ondansetron/ondansetron.htm)」/「[drugdictionary?cdrid=695789](http://www.fda.gov/drugs/infomation/ondansetron/ondansetron.htm)」(最後一次訪問：2014年12月14日)。FDA已批准派立珠單抗用於治療復發性或難治癒黑色素瘤。

在其他實施例中，抗PD-1抗體為MEDI0608 (以前之AMP-514)，其為針對PD-1受體之單株抗體。MEDI0608描述於例如美國專利第8,609,089,B2號中或如下站點：[www「.」cancer「.」gov「/」drugdictionary?cdrid=756047](http://www.fda.gov/cancer/drugdictionary?cdrid=756047)」(最後一次訪問：2014年12月14日)。

在一些實施例中，抗PD-1抗體為皮立珠單抗(CT-011)，其為人類化單株抗體。皮立珠單抗描述於美國專利第8,686,119 B2號或WO 2013/014668 A1中。

所揭示方法中可使用的抗PD-1抗體亦包括特異性結合於人類PD-1且與尼沃單抗交叉競爭結合於人類PD-1之經分離抗體(參看例如美國專利第8,008,449號；WO 2013/173223)。抗體交叉競爭結合於抗原之能力指示此等抗體結合於抗原之相同抗原決定基區域且空間上阻礙其他交叉競爭抗體與特定抗原決定基區域之結合。藉助於結合於PD-1之相同抗原決定基區域，此等交叉競爭抗體之功能性特性預期與尼沃單抗極類似。基於在標準PD-1結合分析(諸如Biacore分析、ELISA分析或流式細胞術(參見例如WO 2013/173223))中與尼沃單抗交叉競爭之能力，可容易地鑑別交叉競爭抗體。

在某些實施例中，與尼沃單抗交叉競爭結合於人類PD-1或結合於人類PD-1之與尼沃單抗相同的抗原決定基區域的抗體為單株抗體。為向人類個體投與，此等交叉競爭抗體可為嵌合抗體，或可為人類化或人類抗體。

可用於所揭示發明之方法中的抗PD-1抗體亦包括以上抗體之抗原結合部分。實例包括(i) Fab片段，一種由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 C_{H1} 域組成之單價片段；(ii) F(ab')₂片段，一種包含在鉸鏈區藉由二硫橋連接之兩個Fab片段之二價片段；(iii)由 V_H 及 C_{H1} 域組成之Fd片段；及(iv)由抗體之單臂之 V_L 及

V_H 域組成的Fv片段。

與免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑組合投與CD80 ECD或CD80 ECD融合蛋白

在一些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑同時投與。在一些實施例中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑依序投與。在一些實施例中，在投與免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑前，投與至少一次、至少兩次、至少三次劑量、至少五次劑量或至少十次劑量的CD80 ECD或CD80融合分子。在一些實施例中，在投與CD80 ECD或CD80融合分子前，投與至少一次、至少兩次、至少三次劑量、至少五次劑量或至少十次劑量的免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑。在一些實施例中，在第一次劑量之CD80 ECD或CD80融合分子前至少一天、兩天、三天、五天或十天或一週、兩週、三週、五週、十二週或二十四週，投與最後一次劑量之免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑。在一些其他實施例中，在第一次劑量之免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑前至少一天、兩天、三天、五天或十天或一週、兩週、三週、五週、十二週或二十四週，投與最後一次劑量之CD80 ECD或CD80融合分子。在一些實施例中，個體已接受或正接受免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑療法，且將CD80 ECD或CD80融合分子添加至治療方案中。

在一些實施例中，個體為免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑反應不足者(亦即對一或多種免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑展示耐藥性)。為PD-1/PD-L1抑制劑反應不足者之個體例如先前對PD-1/PD-L1抑制劑可具有反應，但可能對PD-1/PD-L1抑制劑之反應性變小，或個體可從未對PD-1/PD-L1抑制劑具有反應。對免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑反應不

足意謂預期標準劑量之PD-1/PD-L1抑制劑後改良的病狀並未改良及/或改良僅在投與大於標準劑量時發生的態樣。在一些實施例中，免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑反應不足者在接受標準劑量至少兩週、至少三週、至少四週、至少六週或至少十二週之後已經歷或正經歷對該藥物反應不足。「標準」劑量之免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑可藉由醫學專業人員測定，且可取決於個體之年齡、體重、健康史、疾病嚴重性、給藥頻率等。在一些實施例中，免疫刺激劑或PD-1/PD-L1抑制劑反應不足者已經歷或正經歷對抗PD-1抗體及/或抗PD-L1抗體反應不足。在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑反應不足者已經歷或正經歷對AMP-224反應不足。在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑反應不足者已經歷或正經歷對選自尼沃單抗及派立珠單抗之PD-1/PD-L1抑制劑反應不足。

在以上實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與PD-1/PD-L1抑制劑之組合可經1週、10天或2週之時段使小鼠同基因型或異種移植癌症模型中之腫瘤生長抑制例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。在以上組合療法實施例中之任一者中，投與個體之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與PD-1/PD-L1抑制劑之組合可例如經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使個體或動物模型中至少一種腫瘤之體積降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。

在此等組合療法中之任一者中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可為每莫耳CD80 ECD Fc包含10-60 mol SA (諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA)之CD80 ECD Fc。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol

SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域為人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包含SEQ ID NO:20或21之胺基酸序列。

投與途徑及載劑

在各種實施例中，多肽及融合分子可藉由各種途徑活體內投與，包括(但不限於)經口、動脈內、非經腸、鼻內、靜脈內、肌肉內、心內、室內、氣管內、經頰、經直腸、腹膜內、皮內、局部、經皮及鞘內，或者藉由移植或吸入。本發明組合物可調配成呈固體、半固體、液體或氣體形式的製劑；包括(但不限於)錠劑、膠囊、粉末、顆粒、軟膏、溶液、栓劑、灌腸劑、注射劑、吸入劑及氣溶膠。如文獻(參見例如Tang等人, *Nature* 356:152-154 (1992))中所述，編碼多肽之核酸分子可塗佈於金微粒子上且藉由粒子轟擊裝置或「基因槍(gene gun)」皮內傳遞。可根據預期應用選擇適當調配物及投與途徑。

在各種實施例中，將包含多肽之組合物係與各種醫藥學上可接受之載劑一起提供於調配物中(參見例如Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 第20版 (2003)；Ansel等人, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 第7版, Lippencott Williams and Wilkins (2004)；Kibbe等人,

Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, Pharmaceutical Press (2000))。可使用各種醫藥學上可接受之載劑，其包括媒劑、佐劑及稀釋劑。此外，亦可使用各種醫藥學上可接受之輔助物質，諸如pH調節及緩衝劑、張力調節劑、穩定劑、濕潤劑及其類似物質。非限制性例示性載劑包括生理食鹽水、緩衝生理食鹽水、右旋糖、水、丙三醇、乙醇及其組合。

在各種實施例中，包含多肽及融合分子之組合物可經調配以藉由將其溶解、懸浮或乳化於水性或非水性溶劑(諸如植物或其他油、合成之脂族酸甘油酯、高級脂族酸酯或丙二醇)中；且必要時與習知添加劑(諸如增溶劑、等張劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑及防腐劑)一起而用於注射，包括皮下投與。在各種實施例中，可例如使用諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮其及其類似物之可接受之加壓推進劑調配用於吸入之組合物。在各種實施例中，組合物亦可調配成持續釋放型微膠囊，諸如使用可生物降解或不可生物降解聚合物。非限制性例示性可生物降解調配物包括聚乳酸-乙醇酸聚合物。非限制性例示性非可生物降解調配物包括聚甘油脂肪酸酯。製備此類調配物之某些方法描述於例如EP 1 125 584 A1中。

亦提供包含一或多個容器之醫藥封裝及套組，其各自含有一或多次劑量之多肽或多肽組合。在一些實施例中，提供一種單位劑量，其中單位劑量含有預定量之包含多肽或多肽組合之組合物，其有或無一或多種其他藥劑。在一些實施例中，此類單位劑量係於注射用之單次使用預填充注射器中供應。在各種實施例中，單位劑量中所含有之組合物可包含生理食鹽水、蔗糖或其類似物；緩衝液，諸如磷酸鹽或其類似物；及/或在穩定及有效pH範圍內調配。或者，在一些實施例中，組合物可以凍乾粉末形式提供，其可在添加適當液體(例如無菌水)後復原。在一些實施例中，組合物包含一

或多種抑制蛋白質凝集之物質，其包括(但不限於)蔗糖及精胺酸。在一些實施例中，本發明之組合物包含肝素及/或蛋白聚醣。

醫藥組合物以有效治療或預防特定適應症之量投與。治療有效量通常取決於所治療個體之體重、其生理或健康狀況、所治療病狀之擴散情況或所治療個體之年齡。在一些實施例中，將PD-1/PD-L1抑制劑(諸如抗體或融合蛋白)以1至4 mg/kg之劑量與CD80 ECD或CD80 ECD融合分子一起投與。在一些實施例中，PD-1/PD-L1抑制劑以1、2、3或4 mg/kg之劑量投與。

可由熟習此項技術者，諸如主治醫師，基於所治療病狀、所治療個體之年齡、所治療病狀之嚴重性、所治療個體之一般健康狀況及其類似因素的考慮因素來決定投與頻率。在一些實施例中，投與個體有效劑量之CD80 ECD或CD80 ECD融合分子一或多次。在各種實施例中，每個月一次、每個月少於一次(諸如每兩個月一次或每三個月一次)向個體投與有效劑量。在其他實施例中，每個月多於一次(諸如每三週一次、每兩週一次或每週一次)投與有效劑量。在一些實施例中，每1、2、3、4或5週一次投與有效劑量。在一些實施例中，每週兩次或三次投與有效劑量。至少一次投與個體有效劑量。在一些實施例中，可多次投與有效劑量，包括持續至少一個月、至少六個月或至少一年的時段。

其他組合療法

CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可單獨投與，與PD-1/PD-L1抑制劑一起及/或與其他治療模式一起投與。CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可在其他治療模式之前、實質上同時或之後提供，其他治療模式例如手術、化學療法、放射療法或投與另一生物製劑。在一些實施例中，癌症在選自手術、化學療法及放射療法或其組合之療法之後復發或進展。

為治療癌症，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可與一或多種其他抗癌劑(諸如化學治療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑及/或抗贅生性組合物)結合投與。可與本發明之抗體組合使用的化學治療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑、抗癌劑及抗贅生性組合物之非限制性實例提供於以下定義中。

在以上組合療法實施例中之任一者中，投與個體之療法可經1週、10天或2週之時段使小鼠同基因型或異種移植癌症模型中腫瘤生長抑制例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在以上組合療法實施例中之任一者中，投與個體之療法可例如經一個月、兩個月、三個月、六個月或一年之時段使個體或動物模型個體中至少一種腫瘤之體積降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%。

在此等其他組合療法中之任一者中，CD80 ECD或CD80 ECD融合分子可為每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA (諸如每莫耳蛋白質15-60 mol SA)的CD80 ECD Fc。在一些實施例中，含量為每莫耳蛋白質10-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質15-40 mol SA，諸如每莫耳蛋白質20-40 mol SA、每莫耳蛋白質20-30 mol SA、每莫耳蛋白質15-25 mol SA、每莫耳蛋白質15-30 mol SA或每莫耳蛋白質30-40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質至少15 mol SA，諸如至少20、至少25、至少30、至少35或至少40 mol SA。在一些實施例中，SA含量為每莫耳蛋白質15、20、25、30、35或40 mol SA。在一些實施例中，Fc域為人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc域。在一些實施例中，Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在一些實施例中，融合分子包含SEQ ID NO:20或21之胺基酸序列。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括(但不限於)烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及Cytosan[®]環磷醯胺；磺酸烷酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲基三聚氰胺；多聚乙醯(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚抑素(bryostatin)；海洋抑素(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；隱藻素(cryptophycin)(尤其克瑞托欣(cryptophycin) 1及克瑞托欣8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；沙考地汀(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲氮芥(mechlorethamine)、甲氮芥氧化物鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新氮芥(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ 1I及卡奇黴素 ω 1I(參見例如 Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))；達內黴素

(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白發色團及相關色蛋白烯二炔(抗生素發色團))、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放射菌素(actinomycin)、安耒黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、Adriamycin[®]小紅莓(包括嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓及去氧小紅莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫米嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡魯寧酮

(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)、辜內酯(testolactone)；抗腎上腺，諸如胺格魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；艾弗鳥胺酸(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；蘑菇多醣(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；二胺硝吡啶(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；鬼臼酸；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK[®]多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西索菲蘭(sizofiran)；鍺螺旋胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、黏液黴素A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine)；尿烷；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇，例如Taxol[®]太平洋紫杉醇(Bristol-Myers Squibb

Oncology, Princeton, N.J.)、Abraxane[®]太平洋紫杉醇之無Cremophor且經白蛋白工程改造之奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及Taxotere[®]多西他賽(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥(chloranbucil)；Gemzar[®]吉西他濱(gemcitabine)；6-硫代鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16))；異環磷醯胺(ifosfamide)；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；Navelbine[®]長春瑞賓(vinorelbine)；米托蒽醌(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基喋呤；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan)(Camptosar, CPT-11)(包括伊立替康與5-FU及甲醯四氫葉酸之治療方案)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO))；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；考布他汀(combretastatin)；甲醯四氫葉酸(leucovorin)(LV)；奧沙利鉑(oxaliplatin)，包括奧沙利鉑治療方案(FOLFOX)；降低細胞增殖之PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR(例如埃羅替尼(erlotinib) (Tarceva[®]))及VEGF-A之抑制劑及以上各者中之任一者的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

其他非限制性例示性化學治療劑包括用於調節或抑制對癌症之激素作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括Nolvadex[®]他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)

及Fareston®托瑞米芬(toremifene)；抑制酶芳香酶之芳香酶抑制劑，其調節腎上腺中之雌激素產生，諸如4(5)-咪唑、胺格魯米特(aminoglutethimide)、Megase®乙酸甲地孕酮、Aromasin®依西美坦(exemestane)、福美斯坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、Rivisor®伏羅唑(vorozole)、Femara®來曲唑(letrozole)及Arimidex®阿那曲唑(anastrozole)；及抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他濱(troxacitabine) (1,3-二氧雜環戊烷核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制異常細胞增殖中涉及之信號傳導路徑中的基因表現者，諸如PKC- α 、Raf及H-Ras；核糖核酸酶，諸如VEGF表現抑制劑(例如Angiozyme®核糖核酸酶)及HER2表現抑制劑；疫苗，諸如基因療法疫苗，例如Allovectin®疫苗、Leuvectin®疫苗及Vaxid®疫苗；Proleukin® rIL-2；Lurtotecan®拓撲異構酶1抑制劑；Abarelix® rmRH；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

「抗血管生成劑」或「血管生成抑制劑」係指直接或間接抑制血管生成(angiogenesis)、血管生成(vasculogenesis)或非所要之血管滲透性的小分子量物質、聚核苷酸(包括例如抑制性RNA (RNAi或siRNA))、多肽、經分離蛋白質、重組蛋白質、抗體或其結合物或融合蛋白。應瞭解，抗血管生成劑包括結合及阻斷血管生成因子或其受體之血管生成活性的藥劑。舉例而言，抗血管生成劑為血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如VEGF-A之抗體(例如貝伐單抗(bevacizumab)(Avastin®))或VEGF-A受體(例如KDR受體或Flt-1受體)之抗體；抗PDGFR抑制劑，諸如Gleevec®(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate))；阻斷VEGF受體信號傳導之小分子(例如

PTK787/ZK2284、SU6668、Sutent[®]/SU11248 (蘋果酸舒尼替尼(sunitinib malate))、AMG706或例如國際專利申請案WO 2004/113304中所述的彼等藥劑。抗血管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑，例如血管抑素、內皮生長抑素等。參見例如Klagsbrun及D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39；Streit及Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (例如列出惡性黑色素瘤中之抗血管生成療法的表3)；Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364；Tonini等人, (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (例如列出已知抗血管生成因子的表2)；及Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (例如列出臨床試驗中所用抗血管生成劑的表1)。

如本文所用，「生長抑制劑」係指活體外或活體內抑制細胞(諸如表現VEGF之細胞)生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S期細胞(諸如表現VEGF之細胞)百分比之藥劑。生長抑制劑之實例包括(但不限於)阻斷細胞週期進程(除S期以外的位置)之藥劑，諸如誘發G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春花(長春新鹼及長春花鹼)、紫杉烷及II型拓撲異構酶抑制劑，諸如小紅莓、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博萊黴素。阻滯G1之藥劑亦深入到S期阻滯，例如DNA烷基化劑，諸如他莫昔芬、潑尼松、達卡巴嗪、甲氮芥、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他資訊可見於Mendelsohn及Israel編, *The Molecular Basis of Cancer*, 第1章，標題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」, Murakami等人(W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), 例如第13頁。紫杉烷(太平洋紫杉醇及多西他賽)為來源於紫杉樹之抗癌藥物。多西他賽(Taxotere[®], Rhone-Poulenc Rorer)來源於歐洲紫杉，為太平洋紫杉醇(Taxol[®], Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。太平洋紫杉醇

及多西他賽促進微管自微管蛋白二聚物組裝且藉由防止解聚合穩定微管，從而抑制細胞中之有絲分裂。

術語「**抗贅生性組合物**」係指適用於治療癌症的包含至少一種活性治療劑之組合物。治療劑之實例包括(但不限於)例如化學治療劑；生長抑制劑；細胞毒性劑；放射療法中使用之藥劑；抗血管生成劑；除PD-1/PD-L1抑制劑以外的其他癌症免疫治療劑；細胞凋亡劑；抗微管蛋白劑；及治療癌症之其他藥劑，諸如抗HER-2抗體；抗CD20抗體；表皮生長因子受體(EGFR)拮抗劑(例如酪胺酸激酶抑制劑)；HER1/EGFR抑制劑(例如埃羅替尼(erlotinib)(Tarceva[®]))；血小板衍生生長因子抑制劑(例如Gleevec[®] (甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate)))；COX-2抑制劑(例如塞內昔布(celecoxib))；干擾素；CTLA-4抑制劑(例如抗CTLA抗體伊匹單抗(YERVOY[®]))；PD-L2抑制劑(例如抗PD-L2抗體)；TIM3抑制劑(例如抗TIM3抗體)；細胞激素；結合於以下標靶中之一或多者的拮抗劑(例如中和抗體)：ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA、PD-L2、CTLA-4、TIM3或VEGF受體、TRAIL/Apo2；及其他生物活性及有機化學藥劑等。其組合亦包括於本發明中。

實例

下文所述之實例僅欲為本發明之例示，且不應視為以任何方式限制本發明。該等實例不欲表示下述實驗為所進行之所有實驗或唯一實驗。已努力確保關於所用數量(例如量、溫度等)的精確度，但應說明存在一些實驗性誤差及偏差。除非另外指示，否則份數為重量份，分子量為重量平均分子量，溫度以攝氏度為單位，且壓力為大氣壓或近大氣壓。

實例1：CD80 ECD Fc融合分子降低植入有鼠類結腸直腸癌細胞株CT26

之小鼠中之腫瘤生長

七週齡雌性BALB/c小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應兩週。以 1.0×10^6 個細胞/200 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株CT26皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且以每毫升 5×10^6 個細胞再懸浮於無血清RPMI 1640與Matrigel[®]之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。第7天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至處理組。入選至處理組的所有動物之平均腫瘤體積為175 mm³。向小鼠投與生理食鹽水或經由RIPPSSM投與質體DNA。經由RIPPSSM投與之質體DNA含有針對鼠類CD80或CTLA4之胞外域(ECD)以及人類IgG2a之Fc域的序列。每週至少兩次持續量測腫瘤直至腫瘤體積超出動物體重之10%，或為約2000 mm³。

藉由相對於用CT26細胞接種動物後之天數繪製平均腫瘤體積來展示腫瘤尺寸變化。(圖1A。)相較於生理食鹽水對照，在第11天開始，具有小鼠CD80 ECD之RIPPS顯著降低腫瘤生長($p < 0.05$)。(圖1A-B。)對研究每日之計算腫瘤體積使用不配對雙尾t檢驗分析來計算P值(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$)。相較於生理食鹽水對照，CD80 ECD之腫瘤生長抑制經測定為78.8%，其以 $100 \times (1 - (\text{使用CD80之平均腫瘤體積變化} / \text{使用生理食鹽水之平均腫瘤體積變化}))$ 方式計算。亦如圖1A中所示，相較於生理食

鹽水對照，具有小鼠CTLA4-ECD Fc之RIPPS實際上提高腫瘤生長。此結果之一個解釋為CTLA4-ECD Fc構築體可用作CD80之配位體陷阱，從而阻止CD80結合於CD28及刺激針對腫瘤細胞之T細胞活性。

實例2：CD80 ECD Fc融合分子與抗PD-1抗體之組合降低植入有鼠類結腸直腸癌細胞株CT26之小鼠中之腫瘤生長

七週齡雌性BALB/c小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應12天。以 1.0×10^6 個細胞/200 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株CT26皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且以每毫升 5×10^6 個細胞再懸浮於無血清RPMI 1640與Matrigel[®]之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。第7天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至處理組。入選至處理組的所有動物之平均腫瘤體積為約150 mm³。經由RIPPSSM投與小鼠質體DNA，其編碼小鼠CD80 ECD加上來自人類IgG2a之Fc或僅Fc (陰性對照)。投與針對抗PD1 (純系RMP1-14)或大鼠IgG2a (純系2A3，陰性對照)之蛋白質。給藥組如下：1) Fc RIPPSSM加上大鼠IgG2a，2) CD80 RIPPSSM加上大鼠IgG2a，3) Fc RIPPSSM加上抗PD1，或4) CD80 RIPPSSM加上抗PD1。每週至少兩次持續量測腫瘤直至腫瘤體積超出動物體重之10%，或為約2000 mm³。

藉由在研究結束時繪製所有組之平均腫瘤重量展示腫瘤尺寸變化。

(圖2A。) 具有小鼠CD80 ECD之RIPPSSM或投與抗PD1相較於對照降低腫瘤生長。(圖2A-B。) 相較於單獨之CD80 (在第9天後開始 $p<0.01$)或抗PD-1 (在第14天 $p<0.01$)，CD80 RIPPSSM與抗PD1之組合在處理後九天開始顯著降低腫瘤生長($p<0.05$)。對量測每日之計算腫瘤體積使用不配對雙尾t檢驗分析計算P值。

藉由CD80 ECD及抗PD1達成之腫瘤生長抑制(TGI)經測定相較於對照分別為28.7%及41.5%。藉由CD80 ECD與抗PD1之組合達成之TGI經測定為83%。(參見圖2B。)使用下式計算TGI： $100 \times (1 - (\text{處理組之平均}\Delta\text{體積} / \text{生理食鹽水組之平均}\Delta\text{體積}))$ 。

實例3：比較具有野生型與突變人類IgG1 Fc融合多肽序列之CD80 ECD Fc融合分子的活性

七週齡雌性BALB/c小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應兩週。以 1.0×10^6 個細胞/200 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株CT26皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且以每毫升 5×10^6 個細胞再懸浮於無血清RPMI 1640與Matrigel[®]之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。第5天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至處理組。入選至處理組的所有動物之平均腫瘤體積為175 mm³。向小鼠投與生理食鹽水或經由RIPPSSM投與質體DNA。經由RIPPSSM投與之質體

DNA含有針對鼠類CD80之胞外域(ECD)以及人類IgG1之Fc域的序列。經由RIPPSSM投與兩種純系，一種具有野生型人類IgG1 Fc (CD80-IgG1 WT)，且另一種具有含有三個突變胺基酸(L234F/L235E/P331S)之此Fc以改變Fc與Fc γ 受體之相互作用(CD80-IgG1 MT)。每週至少兩次持續量測腫瘤直至腫瘤體積超出動物體重之10%，或為約2000 mm³。

藉由相對於用CT26細胞接種動物後之天數繪製平均腫瘤體積來展示腫瘤尺寸變化。(圖3A-B。)相較於生理食鹽水對照，在第14天開始，具有CD80-IgG1 WT之RIPPSSM顯著降低腫瘤生長($p<0.05$)。相較於CD80-IgG1 WT，在第14天開始，CD80-IgG MT顯著降低腫瘤生長($p<0.01$)。對研究每日之計算腫瘤體積使用不配對雙尾t檢驗分析來計算P值(* $p<0.05$ ，** $p<0.01$)。相較於生理食鹽水對照，藉由CD80-IgG1 WT達成之腫瘤生長抑制(TGI)經測定為69.4%，相比之下，CD80-IgG MT之TGI經計算為98%。(參見圖3B。)使用下式計算TGI： $100 \times (1 - (\text{處理組之平均}\Delta\text{體積} / \text{生理食鹽水組之平均}\Delta\text{體積}))$ 。

實例4：具有野生型及突變人類IgG1 Fc融合多肽序列之CD80 ECD Fc融合分子對CT26腫瘤中浸潤性T細胞的作用

進行各別活體內研究以分析治療初期CD80-IgG1 WT及CD80-IgG1 MT對CT26腫瘤中浸潤性T細胞的作用。

七週齡雌性BALB/c小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應兩週。以 1.0×10^6 個細胞/200 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株CT26皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到

80-85%匯合時，收集細胞且以每毫升 5×10^6 個細胞再懸浮於無血清RPMI 1640與Matrigel[®]之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm^3) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。在第5天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至處理組(n=5隻小鼠/組)。入選至處理組的所有動物之平均腫瘤體積為72 mm^3 。投與小鼠生理食鹽水、具有野生型人類IgG1 Fc之鼠類CD80胞外域(ECD) (CD80-IgG1 WT)或具有突變人類IgG1 Fc以改變與Fc γ 受體之相互作用的鼠類CD80 ECD (CD80-IgG1 MT，突變L234F/L235E/P331S)。在第5天及第11天量測腫瘤。

在第12天，用CO₂將小鼠安樂死且灌注磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(pH 7.4)。簡言之，快速打開小鼠胸部，且使用具有20號針之注射器經由左心室中之切口向主動脈注入40 mL PBS。血液及PBS經由右心房中之開口離開。移去腫瘤且在4°C下浸沒在10%中性緩衝福馬林(formalin)中。2小時後，用PBS沖洗組織3次，隨後轉移於30%蔗糖之PBS溶液中隔夜。第二天，於OCT化合物中冷凍腫瘤且儲存在-80°C下。

將冷凍切片切成20- μm 厚。將切片在Superfrost[®] Plus蓋玻片上乾燥1至2小時。用含有0.3% Triton[®] X-100之PBS滲透試樣且在室溫下在含5%正常山羊血清之PBS 0.3% Triton[®] X-100 (阻斷溶液)中培育1小時以阻斷非特异性抗體結合。為偵測T細胞，將切片與均用阻斷溶液1:500稀釋之大鼠-抗CD4 (GK1.5/eBiosciences)及兔抗CD3抗體(SP7/Thermo Scientific)一起培育隔夜。在替代初級抗體之5%正常血清中培育對照試樣相同時段。用含有0.3% Triton[®] X-100之PBS沖洗後，在室溫下將試樣與用PBS 1:400稀

釋之Alexa[®] 594標記之山羊抗大鼠及Alexa[®] 488標記之山羊抗兔二次抗體(Jackson ImmunoResearch)一起培育4小時。用含有0.3% Triton[®] X-100之PBS沖洗試樣，固定在1%多聚甲醛(PFA)中，再次用PBS沖洗，且封固於具有DAPI之Vectashield抗衰減封固劑(Vector laboratories)中。

用配備有AxioCam[®] HRc攝影機之Zeiss Axiophot[®] 2 plus螢光顯微鏡檢驗試樣。收集展示腫瘤內CD3⁺及CD4⁺細胞之量及分佈的各實驗組之代表性影像且展示於圖4A及4B中。

相較於生理食鹽水，用CD80-IgG1 WT或CD80-IgG1 MT處理增加腫瘤內CD3⁺及CD4⁺細胞之數目(圖4A及4B)。儘管CD80-IgG1 WT或CD80-IgG1 MT處理腫瘤之間的CD4⁺細胞之量類似，但用CD80-IgG1 MT處理使得腫瘤浸潤性CD3⁺ T細胞相較於CD80-IgG1 WT大大增加(圖4B)。相較於CD80-IgG1 WT，使用CD80-IgG1 MT時CD3⁺與CD4⁺細胞之比率增加。

實例5：CD80 ECD Fc融合分子之細胞激素釋放作用

方法

蛋白質處理

在含有RPMI 1640、100 IU青黴素/100 µg/ml鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸、100 nM非必需胺基酸、55 µM 2-巰基乙醇及10%超低-IgG胎牛血清之T細胞增殖培養基中，使人類CD80 ECD IgG1 Fc融合分子(CD80-Fc)結合於磁性蛋白-A珠粒(Life Technologies)。在96孔平底組織培養盤中以每孔100 µl之體積進行結合反應，其中珠粒濃度為每毫升3百萬個珠粒。以如下系列濃度使CD80-Fc結合於珠粒：10、1、0.1 µg/ml。亦藉由添加3 ng/ml OKT3-scFv進行其他組結合反應。使蛋白質在室溫下在搖盪之平台上結合1

小時，隨後將100 μ l 20 μ g/ml (最終濃度10 μ g/ml)無Fc IgG1 (FPT)添加至各孔中且使其再結合一小時以阻斷珠粒上之任何未佔據蛋白-A結合位點。隨後使用磁性96孔盤座用PBS洗滌充分負載及阻斷之珠粒3次以移除未結合之蛋白質。隨後將100 μ l濃度為 1×10^6 個細胞/毫升的人類泛T細胞添加至經乾燥洗滌之珠粒的各孔中。各條件以一式三份進行測試。

細胞

使用Ficoll[®] (Biochrom)梯度密度離心自分離前約18小時由健康供體收集的清除術富集之血液(白血球層)分離人類PBMC。隨後使用人類泛T細胞分離套組(Miltenyi)自PBMC分離泛T細胞。將T細胞以1百萬個細胞/毫升之密度接種於T225組織培養瓶中之補充有8 ng/ml IL-2及人類T細胞活化劑Dynabeads[®] (Life Tech)(1個珠粒/個細胞)的增殖培養基(以上)中。接種後，向細胞饋入新鮮IL-2且藉由每2天添加一次新鮮增殖培養基而持續保持在0.3百萬個細胞/毫升之濃度下。將細胞保持在維持在5% CO₂下的37°C水有夾套培育箱中。擴增6天後，使用磁性管架移去活化劑-珠粒且將細胞以1百萬個細胞/毫升之濃度再懸浮於無IL-2之新鮮增殖培養基中。24小時後，將細胞與蛋白-A珠粒固定之蛋白質一起用於分析中。

細胞激素量測

用蛋白-A珠粒固定之蛋白質處理細胞後24小時，根據製造商之說明於上清液中使用HTRF-ELISA套組(Cisbio)量測可溶性干擾素 γ (IFN- γ)及腫瘤壞死因子 α (TNF- α)含量。

結果

如藉由可溶性細胞激素產生所量測，單獨的珠粒固定之CD80-Fc不產生顯著人類T細胞活化(圖5A及C)。然而，在少量OKT3-scFv與CD80-Fc

一起固定時，觀測到穩固CD80依賴性IFN- γ 及TNF- α 釋放(圖5B及D)。此處所用之OKT3-scFv之量過低以使得不能自行引起T細胞刺激，因此所要存在CD80作為共刺激蛋白。其此等結果證實此分析中所用之CD80-Fc實際上為生物學上活性的。

儘管此分析中釋放IFN- γ 及TNF- α 展示CD80-Fc為生物學上活性的，但過度釋放細胞激素(諸如IFN- γ 及TNF- α)可為有害的。因此，為解決CD80 ECD Fc治療之可能安全性，將此等結果與用TGN1412早期公開之結果比較，TGN1412為展示為T細胞「超促效劑」且在人類個體中釋放過多及有害量之細胞激素(諸如IFN- γ 及TNF- α)的單株抗CD28抗體。

單獨的經固定TGN1412呈現出比單獨的人類CD80顯著更有效地誘導自人類T細胞釋放細胞激素。Findlay等人, *J. Immunological Methods* 352: 1-12 (2010)報導1微克/孔TGN1412引起穩固TNF α 釋放，約2000 pg/ml，且Vessillier等人, *J. Immunological Methods* 424: 43-52 (2015)報導相同量之TGN1412產生穩固IFN- γ ，約10000 pg/ml。在吾等分析中，相同量之經固定CD80-Fc未引起任一細胞激素顯著釋放。此等結果表明，CD80-Fc誘導細胞激素釋放之有效性為TGN1412之至少1/1000，因此相較於TGN1412在人類中具有顯著較低誘發細胞激素風暴之風險。

實例6：CD80 ECD Fc融合分子對活體內CT26腫瘤之作用，其中Fc域具有不同唾液酸(SA)含量

在CT26腫瘤中進行活體內研究以分析三個不同批次之CD80 ECD與具有不同唾液酸(SA)含量之野生型人類IgG1 Fc之融合物的作用。特定言之，批次E之CD80 ECD Fc每莫耳蛋白質含有20 mol SA，批次D每莫耳蛋白質含有15 mol SA，且批次A每莫耳蛋白質含有5 mol SA。

七週齡雌性BALB/c小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應一週。以 1.0×10^6 個細胞/200 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株CT26皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且以每毫升 5×10^6 個細胞再懸浮於無血清RPMI 1640與Matrigel®之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。在第7天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至七個處理組(n=10隻小鼠/實驗組)。入選之所有動物的平均腫瘤體積為94 mm³。第一組向尾部靜脈中靜脈內(i.v.)注射200 μ l PBS(對照)。第二組以靜脈內給與之方式注射0.3 mg/kg每莫耳蛋白質含有20 mol SA之CD80 ECD Fc (批次E)。第三組以靜脈內給與之方式注射0.6 mg/kg每莫耳蛋白質含有20 mol SA之CD80 ECD Fc (批次E)。第四組以靜脈內給與之方式注射0.3 mg/kg每莫耳蛋白質含有15 mol SA之CD80 ECD Fc (批次D)。第四組以靜脈內給與之方式注射0.6 mg/kg每莫耳蛋白質含有15 mol SA之CD80 ECD Fc (批次D)。第六組以靜脈內給與之方式注射0.3 mg/kg每莫耳蛋白質含有5 mol SA之CD80 ECD Fc (批次A)。第七組以靜脈內給與之方式注射0.6 mg/kg每莫耳蛋白質含有5 mol SA之CD80 ECD Fc (批次A)。在第10、14、16、18、22、24天量測腫瘤。

相較於對照，用以0.3或0.6 mg/kg給與之每莫耳蛋白質含20 mol SA之CD80 ECD Fc (批次E)處理使腫瘤生長抑制93%及98% (P<0.001)。相較

於對照，用以0.3或0.6 mg/kg給與之每莫耳蛋白質含15 mol SA之CD80 ECD Fc (批次D)處理使腫瘤生長抑制93%及95% ($P<0.001$)。藉由比較，相較於對照，用0.3 mg/kg之CD80 ECD Fc批次A (每莫耳蛋白質具有5 mol SA)處理並不抑制腫瘤生長，且在以0.6 mg/kg給與時其僅誘導70%抑制 ($P<0.001$)(圖6)。

在第37天分析無腫瘤小鼠之發生率。用以0.3或0.6 mg/kg給與之CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA (批次E)處理在8/10 (80%)或10/10 (100%)小鼠中產生完全腫瘤消退。用以0.3或0.6 mg/kg給與之CD80 ECD-Fc 15 mol/mol SA (批次D)處理在9/10 (90%)小鼠中產生完全腫瘤消退。藉由比較，如下表所示，用以0.6 mg/kg給與之CD80 ECD-Fc批次A處理僅在1/10 (10%)小鼠中誘導腫瘤消退。

處理組	第37天之無腫瘤小鼠
生理食鹽水	0% (0/10小鼠)
CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol (批次E)，1劑0.3 mg/kg	80% (8/10小鼠)
CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol (批次E)，1劑0.6 mg/kg	100% (10/10小鼠)
CD80 ECD-Fc SA 15 mol/mol (批次D)，1劑0.3 mg/kg	90% (9/10小鼠)
CD80 ECD-Fc SA 15 mol/mol (批次D)，1劑0.6 mg/kg	90% (9/10小鼠)
CD80 ECD-Fc SA 5 mol/mol (批次A)，1劑0.3 mg/kg	0% (0/10小鼠)
CD80 ECD-Fc SA 5 mol/mol (批次A)，1劑0.6 mg/kg	10% (1/10小鼠)

實例7：鼠類CD80 ECD-鼠類Fc融合分子對三種不同同基因型腫瘤模型中之腫瘤生長的作用

使用包含連接於小鼠IgG2a野生型之Fc域的鼠類CD80之胞外域(ECD)的小鼠替代物(鼠類CD80 ECD-Fc)進行活體內研究。在如下三種不同同基因型腫瘤模型中，將鼠類CD80 ECD-Fc之作用與抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)比較：CT26結腸癌、MC38結腸癌及B16黑色素瘤模型。

CT26腫瘤模型

七週齡雌性BALB/c小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應一週。以 1.0×10^6 個細胞/200 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株CT26皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且再懸浮於無血清RPMI 1640與基質膠之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。在第7天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至七個處理組(n=15隻小鼠/實驗組)。入選之所有動物的平均腫瘤體積為96 mm³。在第4天、第7天及第11天給與小鼠3次。第一組以腹膜內給與之方式注射10 mg/kg小鼠IgG2b (mIgG2b)(對照)。第二組以靜脈內給與之方式注射0.3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA。第三組以腹膜內給與之方式注射1.5 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)。第四組以腹膜內給與之方式注射10 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)。在第10、13、17、19、21、24天量測腫瘤。

在第21天(此時所有對照仍在研究中)，相較於對照，用以0.3 mg/kg給與之鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA處理使腫瘤生長抑制90% (P<0.001)。相較於對照，用10 mg/kg抗CTLA4抗體處理使腫瘤生長抑制75% (P<0.001)。藉由比較，用1.5 mg/kg抗CTLA4抗體處理僅誘導53%腫瘤生長抑制(P<0.001)(圖7)。在第21天，用以0.3 mg/kg給與之鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA處理對腫瘤生長的影響顯著大於以1.5 mg/kg

($P < 0.001$)或10 mg/kg ($P = 0.009$)給與之抗CTLA4抗體。

在第37天分析無腫瘤小鼠之發生率。用以0.3 mg/kg給與之鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA處理在7/15 (47%)小鼠中產生完全腫瘤消退。用10 mg/kg抗CTLA4抗體處理在3/15 (20%)小鼠中產生完全腫瘤消退。用1.5 mg/kg抗CTLA4抗體處理之小鼠均無完全腫瘤消退。

MC38腫瘤模型

七週齡雌性C57Bl/6小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應一週。以 0.5×10^6 個細胞/100 μ l/小鼠將鼠類結腸直腸癌細胞株MC38皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且再懸浮於無血清RPMI 1640與基質膠之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。在第7天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至七個處理組(n=15隻小鼠/實驗組)。入選之所有動物的平均腫瘤體積為78 mm³。在第7天、第10天及第14天給與小鼠3次。第一組以腹膜內給與之方式注射10 mg/kg小鼠IgG2b (mIgG2b)(對照)。第二組以靜脈內給與之方式注射3 mg/kg鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA。第三組以腹膜內給與之方式注射1.5 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)。第四組以腹膜內給與之方式注射10 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)。在第11天、第14天、第17天及第19天量測腫瘤。

在第19天(此時所有對照仍在研究中)，相較於對照，用以3 mg/kg給與之鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA處理使腫瘤生長抑制79% ($P<0.001$)。此外，相較於抗CTLA4抗體，鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA對腫瘤生長具有較大影響($P<0.001$)。相較於對照，用10 mg/kg抗CTLA4抗體處理使腫瘤生長降低21% ($P=0.05$)，而1.5 mg/kg之抗CTLA4抗體不會顯著影響腫瘤尺寸(圖8)。在第21天，用以3 mg/kg給與之鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA處理對腫瘤生長的影響顯著大於以1.5 mg/kg ($P<0.001$)或10 mg/kg ($P=0.009$)給與之抗CTLA4抗體。

儘管將3 mg/kg劑量之CD80 ECD-Fc用於此等實驗，但0.3 mg/kg劑量之CD80 ECD-Fc亦降低MC38腫瘤模型中之腫瘤細胞生長(資料未示)。

B16腫瘤模型

七週齡雌性C57Bl/6小鼠購自Charles River Laboratories (Hollister, CA)且在開始研究前適應一週。以 0.5×10^6 個細胞/100 μ l/小鼠將鼠類黑色素瘤細胞株B16-F10皮下植入小鼠的右側腹。在接種之前，細胞在補充有10%熱滅活胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩醯胺酸之DMEM培養基中培養不超過三代。使細胞在37°C下在具有5% CO₂之潮濕氛圍中生長。當達到80-85%匯合時，收集細胞且再懸浮於無血清DMEM與基質膠之1:1混合物中。

在植入細胞之後，每週監測小鼠之腫瘤生長兩次。對於腫瘤量測，使用測徑規量測各腫瘤之長度及寬度且根據下式計算體積：腫瘤體積(mm³) = (寬度(mm) × 長度(mm))²/2。在第7天，量測所有腫瘤，且將小鼠隨機分配至七個處理組(n=15隻小鼠/實驗組)。入選之所有動物的平均腫瘤體積為70 mm³。在第3天、第6天及第10天給與小鼠3次。第一組以腹膜內給與之方式注射10 mg/kg小鼠IgG2b (mIgG2b)(對照)。第二組以靜脈內給與之方式注

射3 mg/kg 鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA。第三組以腹膜內給與之方式注射1.5 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)。第四組以腹膜內給與之方式注射10 mg/kg抗CTLA4抗體純系9D9 (IgG2b)。在第10、13、15、16、17天量測腫瘤。

在第13天(此時所有對照仍在研究中)，相較於對照，用以3 mg/kg給與之鼠類CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA處理使腫瘤生長抑制41% (P<0.001)。相較於對照，用10 mg/kg或1.5 mg/kg抗CTLA4抗體處理並不顯著影響腫瘤生長(圖9)。

序列表

下表提供本文中提及之某些序列之清單。

SEQ. ID. NO.	描述	序列
1	人類 CD80 前驅物(含有信號序列)胺基酸序列	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHV TKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL T MMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGT YECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFE IPTSNIRRIJCSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQ DPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF NWNTTKQEHFPDNLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFA PRCRERRRNERLRRESVRPV
2	小鼠 CD80 前驅物(含有信號序列)胺基酸序列	MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSDV DEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDK V VVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSD RGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNIT ESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINT TISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSE DFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVVIVVIK CFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTVFL

3	人類 CD80 同功異型物2 (無信號序列)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKK MVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSI SDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTT VSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVN QTFNWNTSFAPRCRERRRNERLRRESVRPV		
4	人類 CD80 同功異型物3 (無信號序列)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKK MVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKGFAPRCR ERRRNERLRRESVRPV		
5	人類 CD80 ECD 序列 (無信號序列)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKK MVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSI SDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTT VSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVN QTFNWNTTKQEHFPDN		
6	小鼠 CD80 ECD 序列 (無信號序列)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHD KVVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLS DRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNI TESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGIN TTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVS EDFTWEKPPEDPPDSKN		
7	人類 CD80 信號序列	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSG		
8	小鼠 CD80 信號序列	MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSD		
9	Fc C237S	EPKSSDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP
		KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
		NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV
		LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
		ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSRD	ELTKNQVSLT
		CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTTP

		VLDS DGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	Fc	ERKCCVEC PP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
11	Fc	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK
12	人類 IgG1 Fc L234F, L235E, P331S突變體	EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
13	人類 IgG1 Fc N297突變體	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
14	Fc人類IgG1	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

		ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
15	Fc人類IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP PMLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEAL HNRFTQKSLSLSPGK
16	Fc人類IgG4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK
17	小 鼠 CD80 ECD 小 鼠 Fc IgG2a (Fc部分 加下劃線)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHD KVVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLS DRGTYSVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNI TESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGIN TTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVS EDFTWEKPPEDPPDSKNEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG <u>GPSVFIFPPKIKDVLMI</u> <u>SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS</u> <u>WVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHOD</u> <u>WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVY</u> <u>VLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK</u> <u>TELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS</u> <u>YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</u>
18	小 鼠 CD80 ECD 人 類 Fc IgG1 WT (Fc 部分加下劃	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHD KVVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLS DRGTYSVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNI TESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGIN

	線)	TTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVS EDFTWEKPPEDPPDSKNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	小 鼠 CD80 ECD Fc IgG1 MT (234, 235, 331)(Fc部分加 下劃線；突變 部分以粗體展 示)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHD KVVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIHLGLVLS DRGTYS CVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNI TESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGIN TTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVS EDFTWEKPPEDPPDSKNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	人 類 CD80 ECD 人 類 Fc IgG1 WT (Fc 部分加下劃 線)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTIRIYWQKEKK MVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSI SDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTT VSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLRVN QTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	人 類 CD80 ECD 人 類 Fc IgG1 L234F,	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTIRIYWQKEKK MVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSI

	L235E, P331S MT (Fc部分加 下劃線；突變 部分以粗體展 示)	<u>SDFEIPTSNIIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTT</u> <u>VSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHILRVN</u> <u>QTFNWNTTKQEHFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG</u> <u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF</u> <u>SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>		
22	人類PD-1前驅 物(含有信號 序 列) UniProtKB/Sw iss-Prot: Q15116.3, 01-OCT-2014	MQIPQAPWPV PWNPPTFSPA ESFVLNWYRM QDCRFRVTQL YLCGAISLAP VPTAHPSPSP LVLLVWVLAV EDPSAVPVFS CVPEQTEYAT PRSAQPLRPE	VWAVLQLGWR LLVVTEGDNA SPSNQTDKLA PNGRDFHMSV KAQIKESLRA RPAGQFQTLV ICSRAARGTI VDYGELDFQW IVFPSGMGTS DGHCSWPL	PGWFLDSPDR TFTCSFSNTS AFPEDRSQPG VRARRNDSGT ELRVTERRAE VGVVGGLLGS GARRTGQPLK REKTPEPPVP SPARRGSADG
23	人類PD-1 (成 熟，無信號序 列)	PGWFLDSPDR TFTCSFSNTS AFPEDRSQPG VRARRNDSGT ELRVTERRAE VGVVGGLLGS GARRTGQPLK REKTPEPPVP SPARRGSADG	PWNPPTFSPA ESFVLNWYRM QDCRFRVTQL YLCGAISLAP VPTAHPSPSP LVLLVWVLAV EDPSAVPVFS CVPEQTEYAT PRSAQPLRPE	LLVVTEGDNA SPSNQTDKLA PNGRDFHMSV KAQIKESLRA RPAGQFQTLV ICSRAARGTI VDYGELDFQW IVFPSGMGTS DGHCSWPL
24	人類PD-L1前 驅物(含有信 號 序 列) UniProtKB/Sw iss-Prot: Q9NZQ7.1, 01-OCT-2014	MRIFAVFIFM EYGSNMTIEC DKNIIQFVHG QLSLGNAALQ ADYKRITVKV HELTCAEGY TTNSKREEKL	TYWHLLNAFT KFPVEKQLDL EEDLKVQHSS ITDVKLQDAG NAPYNKINQR PKAEVIWTSS FNVSTSLRIN	VTVPKDLYVV AALIVYWEME YRQRARLLKD VYRCMISYGG ILVDPVTSE DHQVLGSKTT TTTNEIFYCT

		FRRLDPEENH TAE LVIPELP LAHPPNER TH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
25	人 類 PD-L1 (成熟，無信號 序列)	FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTSLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPELP LAHPPNER TH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

【序列表】

<110> 美商戊瑞治療有限公司

<120> CD80胞外域多肽及其用於癌症治療

<130> 01134-0047-00TW

<150> US 62/249,836

<151> 2015-11-02

<150> US 62/373,654

<151> 2016-08-11

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(288)

<223> 人類CD80前驅物(含有信號序列)

<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> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(306)
<223> 小鼠CD80前驅物(含有信號序列)

<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> 222
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(222)
<223> 人類CD80同功異型物2 (無信號序列)

<400> 3

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Ser Phe Ala Pro Arg Cys Arg Glu Arg
195 200 205

Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
210 215 220

<210> 4
<211> 128
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(128)
<223> 人類CD80同功異型物2 (無信號序列)

<400> 4

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Gly Phe Ala Pro Arg Cys Arg
100 105 110

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
115 120 125

<210> 5
<211> 208
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(208)
<223> 人類CD80 ECD序列(無信號序列)

<400> 5

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
195 200 205

<210> 6
<211> 209
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(209)
<223> 小鼠CD80 ECD序列(無信號序列)

<400> 6

Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro
1 5 10 15

Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu
35 40 45

Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His
85 90 95

Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn
100 105 110

Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys
115 120 125

Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg
165 170 175

Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser
180 185 190

Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys
195 200 205

<400> 7

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

Ser Gly

<400> 8

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

Gln Val Ser Ser Asp
35

<210> 9

<211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc C2375

<400> 9

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 10
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc

<400> 10

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 11
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc

<400> 11

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 12
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類IgG1 Fc L234F, L235E, P331S突變體

<400> 12

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 13
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類IgG1 Fc N297突變體

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20										25										30									
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val														
	35						40					45																	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val														
	50					55					60																		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln														
65					70					75					80														
Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln														
				85					90					95															
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala														
			100					105					110																
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro														
		115					120					125																	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr														
	130					135					140																		
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser														
145					150					155					160														
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr														
				165					170					175															
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr														
			180					185					190																
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe														
		195					200					205																	
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys														
	210					215					220																		

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 14
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc人類IgG1

<400> 14

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130

135

140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 15
<211> 279
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc人類IgG3

<400> 15

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
50 55 60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
65 70 75 80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn
210 215 220

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser

245

250

255

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
260265270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275

<210> 16
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc人類IgG4

<400> 16

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
151015

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
202530

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
354045

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
505560

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65707580

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
859095

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100105110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 17
<211> 442
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(442)
<223> 小鼠CD80 ECD小鼠Fc IgG2a

<400> 17

Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro
1 5 10 15

Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu
35 40 45

Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His
85 90 95

Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn
100 105 110

Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys
115 120 125

Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg
165 170 175

Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser
180 185 190

Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys
195 200 205

Asn Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys

210	215	220
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
225	230	235 240
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys		
	245	250 255
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp		
	260	265 270
Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg		
	275	280 285
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln		
	290	295 300
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn		
	305	310 315 320
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly		
	325	330 335
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu		
	340	345 350
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met		
	355	360 365
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu		
	370	375 380
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe		
	385	390 395 400
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn		
	405	410 415

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
420 425 430

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440

<210> 18
<211> 441
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(441)
<223> 小鼠CD80 ECD人類Fc IgG1 WT

<400> 18

Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro
1 5 10 15

Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu
35 40 45

Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His
85 90 95

Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn
100 105 110

Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys
115 120 125

Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg
165 170 175

Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser
180 185 190

Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys
195 200 205

Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
210 215 220

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 19
<211> 441
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(441)
<223> 小鼠CD80 ECD Fc IgG1 MT (234, 235, 331)

<400> 19

Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro
1 5 10 15

Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu
35 40 45

Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His
85 90 95

Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn
100 105 110

Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys
115 120 125

Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg
165 170 175

Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser
180 185 190

Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys
195 200 205

Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
210 215 220

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

385

390

395

400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

405410415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

420425430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435440

<210> 20

<211> 440

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(440)

<223> 人類CD80 ECD人類Fc IgG1 WT

<400> 20

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

151015

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

202530

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

354045

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

505560

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr

65707580

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His

				85					90				95				
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser		
			100					105					110				
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys		
		115					120					125					
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn		
	130					135					140						
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu		
145					150					155					160		
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr		
				165					170					175			
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn		
			180					185					190				
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn		
		195					200					205					
Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala		
	210					215					220						
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro		
225					230					235					240		
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val		
				245					250					255			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val		
			260					265					270				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		
		275					280					285					

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
305 310 315 320

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

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

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 21
<211> 440
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(440)

<223> 人類CD80 ECD人類Fc IgG1 L234F, L235E, P331S MT

<400> 21

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
50 55 60

Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
65 70 75 80

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
305 310 315 320

Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

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

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 22
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(288)
<223> 人類PD-1前驅物(含有信號序列)

<400> 22

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

260265270

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

275280285

<210> 23
<211> 268
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(268)
<223> 人類PD-1 (成熟，無信號序列)

<400> 23

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr

151015

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe

202530

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

354045

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

505560

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu

65707580

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

859095

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

100105110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg

115								120								125
Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Gly	
130						135					140					
Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	Ser	Arg	Ala	Ala	
				165					170					175		
Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Asp	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	
		195					200					205				
Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Cys	Val	Pro	Glu	
	210					215					220					
Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	Met	Gly	Thr	Ser	
225					230					235					240	
Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Ala	Gln	Pro	
			245						250					255		
Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu					
			260				265									

- <210> 24
- <211> 290
- <212> PRT
- <213> 智人

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(290)
- <223> 人類PD-L1前驅物(含有信號序列)

<400> 24

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> 25
<211> 272
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(272)
<223> 人類PD-L1 (成熟，無信號序列)

<400> 25

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	
		35					40					45				
Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	Tyr	Arg	
	50					55					60					
Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala	
65				70						75					80	
Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Arg	Cys	
				85					90					95		
Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Lys	Val	
			100					105					110			
Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Pro	
		115					120					125				
Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Lys	
	130					135					140					
Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	
145					150					155					160	
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	
				165					170					175		
Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr	
			180					185					190			
Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	
		195					200					205				
Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	His	Leu	Val	
	210					215					220					

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
 245 250 255

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
 260 265 270

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種CD80胞外域(ECD)融合分子，其包含人類CD80 ECD多肽及人類IgG1 Fc域，其中該CD80 ECD融合分子每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含10-60 mol SA，其中該分子能夠經至少兩週使至少一種小鼠同基因型或異種移植癌症模型中之腫瘤細胞生長抑制至少80%，諸如至少90%，諸如至少95%，諸如至少98%。

【第2項】

如請求項1之CD80胞外域(ECD)融合分子，其中該分子每莫耳蛋白質包含至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA。

【第3項】

如請求項1或2之CD80 ECD Fc融合分子，其中該分子每莫耳蛋白質包含15-30 mol SA。

【第4項】

如請求項1或2之CD80 ECD Fc融合分子，其中該分子每莫耳蛋白質包含15-25 mol SA。

【第5項】

如請求項1或2之CD80 ECD Fc融合分子，其中該分子每莫耳蛋白質包含20-30 mol SA。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之CD80 ECD Fc融合分子，其中該Fc域包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之CD80 ECD Fc融合分子，其中該分子能夠經兩或三週之時段使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低至少80%，諸如至少90%，至少95%或至少98%。

【第8項】

如請求項7之CD80 ECD Fc融合分子，其中給與該小鼠一次、兩次或三次劑量之0.3至0.6 mg/kg該ECD Fc融合分子。

【第9項】

一種組合物，其包含如請求項1至8中任一項之CD80 ECD融合分子，且進一步包含至少一種醫藥學上可接受之載劑。

【第10項】

如請求項9之組合物，其進一步包含其他治療劑。

【第11項】

如請求項10之組合物，其中該其他治療劑為至少一種免疫刺激劑。

【第12項】

如請求項11之組合物，其中該至少一種免疫刺激劑包含程式化細胞死亡1 (PD-1)/程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)抑制劑。

【第13項】

如請求項12之組合物，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為抗體。

【第14項】

如請求項13之組合物，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-1抗體。

【第15項】

如請求項14之組合物，其中該抗PD-1抗體包含選自尼沃單抗(nivolumab)、皮立珠單抗(pidilizumab)及派立珠單抗(pembrolizumab)之

抗體的重鏈及輕鏈CDR。

【第16項】

如請求項14之組合物，其中該抗PD-1抗體包含選自尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗之抗體的重鏈及輕鏈可變區。

【第17項】

如請求項14之組合物，其中該抗PD-1抗體係選自尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗。

【第18項】

如請求項12之組合物，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-L1抗體。

【第19項】

如請求項18之組合物，其中該抗PD-L1抗體包含選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈CDR。

【第20項】

如請求項18之組合物，其中該抗PD-L1抗體包含選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈可變區。

【第21項】

如請求項18之組合物，其中該抗PD-1抗體係選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C。

【第22項】

如請求項12之組合物，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為PD-1融合分子。

【第23項】

如請求項22之組合物，其中該融合分子為AMP-224。

【第24項】

如請求項12之組合物，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為諸如AUR-012之多肽。

【第25項】

一種治療個體之癌症的方法，其包含投與該個體有效量之如請求項1至8中任一項之CD80胞外域(ECD)融合分子或如請求項9之組合物。

【第26項】

如請求項25之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【第27項】

如請求項26之方法，其中該癌症係選自結腸直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、頭部及頸部之鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌及子宮內膜癌。

【第28項】

如請求項25至27中任一項之方法，其中該癌症在選自手術、化學療法、放射療法或其組合之療法之後復發或進展。

【第29項】

如請求項25至28中任一項之方法，其中該CD80 ECD融合分子為如下CD80 ECD Fc融合分子，其中：(a)該CD80 ECD Fc融合分子經至少兩週之時段使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低之程度大於胺基酸序列相同但每莫耳CD80 ECD Fc蛋白質包含少於10 mol SA的CD80 ECD Fc蛋白質，及/或(b)該CD80 ECD Fc融合分子經至少兩週之時段使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低之程度大於抗CTLA4抗體。

【第30項】

如請求項29之方法，其中該融合分子每莫耳蛋白質包含至少15 mol

SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA。

【第31項】

如請求項29之方法，其中該融合分子每莫耳蛋白質包含15-40、15-30、15-25或20-30 mol SA。

【第32項】

一種提高CD80 ECD融合蛋白在治療個體之癌症中之功效的方法，其包含藉由投與該個體包含增加之唾液酸(SA)含量的該CD80 ECD融合蛋白增加該CD80 ECD融合蛋白中SA之含量。

【第33項】

如請求項32之方法，其中每莫耳CD80 ECD蛋白質該SA含量增加5、10、20、30、40或50 mol。

【第34項】

如請求項32或33之方法，其中提高之功效以如下形式量測：相較於投與SA含量未增加之該CD80 ECD融合分子，在小鼠同基因型或異種移植模型中整體存活率增加、無疾病存活期增加或至少一種腫瘤之生長大大降低。

【第35項】

如請求項32至34中任一項之方法，其中該提高之功效以如下形式量測：相較於投與SA含量未增加之該CD80 ECD融合分子，在諸如CT26小鼠模型之小鼠同基因型或異種移植模型中腫瘤生長大大降低，或在動物或人類個體中之清除速率降低。

【第36項】

如請求項32至35中任一項之方法，其中該提高之功效以如下形式量測：(a)相較於投與SA含量未增加之該CD80 ECD融合分子，動物或人類個

體中至少一種腫瘤之腫瘤生長進一步降低，及/或(b)相較於投與SA含量未增加之該CD80 ECD融合分子，小鼠同基因型或異種移植模型中之腫瘤生長進一步降低，且其中相較於投與SA含量未增加之該CD80 ECD融合分子，在投與SA含量增加之該CD80 ECD融合分子後，該腫瘤生長進一步降低至少10%，諸如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

【第37項】

一種治療個體之癌症的方法，其包含投與該個體有效量的CD80胞外域(ECD)或CD80 ECD融合分子與程式化細胞死亡1 (PD-1)/程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)抑制劑之組合。

【第38項】

如請求項37之方法，其中相較於用該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子或該PD-1/PD-L1抑制劑單獨治療，該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與該PD-1/PD-L1抑制劑之組合以協同或加成方式降低小鼠同基因型或異種移植模型中之腫瘤生長。

【第39項】

如請求項38之方法，其中該小鼠模型為包含鼠類結腸直腸癌CT26細胞之結腸直腸癌模型。

【第40項】

如請求項37或38之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【第41項】

如請求項37至40中任一項之方法，其中該癌症係選自結腸直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、頭部及頸部之鱗狀細胞癌、卵巢癌、

胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌及子宮內膜癌。

【第42項】

如請求項37至41中任一項之方法，其中該癌症在選自手術、化學療法、放射療法或其組合之療法之後復發或進展。

【第43項】

如請求項37至42中任一項之方法，其中該組合包含CD80 ECD融合分子與選自IgG Fc域、白蛋白及PEG之融合搭配物。

【第44項】

如請求項43之方法，其中該融合搭配物為Fc域，諸如包含SEQ ID NO:9-16中之一者的Fc域。

【第45項】

如請求項37至44中任一項之方法，其中該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子包含選自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5之胺基酸35至末端的胺基酸序列，或包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21之序列。

【第46項】

如請求項37至45中任一項之方法，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-1抗體。

【第47項】

如請求項46之方法，其中該抗PD-1抗體包含選自尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗之抗體的重鏈及輕鏈CDR。

【第48項】

如請求項47之方法，其中該抗PD-1抗體包含選自尼沃單抗、皮立珠單

抗及派立珠單抗之抗體的重鏈及輕鏈可變區。

【第49項】

如請求項48之方法，其中該抗PD-1抗體係選自尼沃單抗、皮立珠單抗及派立珠單抗。

【第50項】

如請求項37至49中任一項之方法，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為抗PD-L1抗體。

【第51項】

如請求項50之方法，其中該抗PD-L1抗體包含選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈CDR。

【第52項】

如請求項51之方法，其中該抗PD-L1抗體包含選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C之抗體的重鏈及輕鏈可變區。

【第53項】

如請求項52之組合物，其中該抗PD-1抗體係選自BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及MSB0010718C。

【第54項】

如請求項37至45中任一項之方法，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為PD-1融合分子。

【第55項】

如請求項54之方法，其中該融合分子為AMP-224。

【第56項】

如請求項37至45中任一項之方法，其中該PD-1/PD-L1抑制劑為諸如

AUR-012之多肽。

【第57項】

如請求項37至56中任一項之方法，其中該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子及該PD-1/PD-L1抑制劑係同時或依序投與。

【第58項】

如請求項57之方法，其中在投與該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子前投與一或多次劑量之該PD-1/PD-L1抑制劑。

【第59項】

如請求項58之方法，其中在投與該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子前，該個體接受PD-1/PD-L1抑制劑療法之完整療程。

【第60項】

如請求項58之方法，其中在PD-1/PD-L1抑制劑療法之第二療程期間投與該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。

【第61項】

如請求項58至60中任一項之方法，其中在投與該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子前，該個體接受至少一次、至少兩次、至少三次或至少四次劑量之該PD-1/PD-L1抑制劑。

【第62項】

如請求項58至61中任一項之方法，其中將至少一次劑量之該PD-1/PD-L1抑制劑與該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子同時投與。

【第63項】

如請求項37至62中任一項之方法，其中在投與PD-1/PD-L1抑制劑前投與一或多次劑量之該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。

【第64項】

如請求項63之方法，其中在投與該PD-1/PD-L1抑制劑前，該個體接受至少兩次、至少三次、至少三次或至少四次劑量之該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。

【第65項】

如請求項63或64之方法，其中將至少一次劑量之該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子與該PD-1/PD-L1抑制劑同時投與。

【第66項】

如請求項37至65中任一項之方法，其中該個體對用PD-1/PD-L1抑制劑治療具有耐藥性。

【第67項】

如請求項66之方法，其中該個體先前已接受PD-1/PD-L1抑制劑療法。

【第68項】

如請求項37至67中任一項之方法，其中投與該個體至少一種其他治療劑，諸如至少一種化學治療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑及/或抗贅生性組合物。

【第69項】

如請求項37至68中任一項之方法，其中該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子為每莫耳CD80 ECD蛋白質包含10-60 mol唾液酸(SA)之CD80 ECD融合分子。

【第70項】

如請求項69之方法，其中該CD80 ECD融合分子每莫耳蛋白質包含至少15 mol SA，諸如每莫耳蛋白質至少20 mol SA。

【第71項】

如請求項69之方法，其中該CD80 ECD融合分子每莫耳蛋白質包含15-30 mol SA。

【第72項】

如請求項69之方法，其中該CD80 ECD融合分子每莫耳蛋白質包含15-25 mol SA。

【第73項】

如請求項72之方法，其中該CD80 ECD融合分子每莫耳蛋白質包含20-30 mol SA。

【第74項】

如請求項69至73中任一項之方法，其中該CD80 ECD融合分子包含Fc域作為融合搭配物。

【第75項】

如請求項74之方法，其中該融合搭配物為野生型IgG1 Fc域。

【第76項】

如請求項37至75中任一項之方法，其中該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子能夠經兩或三週之時段使至少一種小鼠同基因型或異種移植模型中之腫瘤細胞之生長降低至少50%、60%、70%、80%或90%。

【第77項】

如請求項76之方法，其中該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子能夠經兩或三週之時段使小鼠中CT26腫瘤細胞之生長降低至少95%，諸如至少98%。

【第78項】

如請求項77之方法，其中給與小鼠一次、兩次或三次劑量之0.3至0.6 mg/kg該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子。

【第79項】

如請求項37至78中任一項之方法，其中該CD80 ECD或CD80 ECD融合分子為如請求項1至8中任一項之CD80 ECD Fc融合分子。

【第80項】

一種CD80胞外域(ECD)融合分子，其包含人類CD80 ECD多肽及具有L234F、L235E及P331S胺基酸取代之人類IgG1 Fc域。

【第81項】

如請求項80之CD80 ECD融合分子，其包含選自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:21之胺基酸序列。

【第82項】

如請求項80或81之CD80 ECD融合分子，其中該Fc域胺基酸序列直接連接於該CD80 ECD胺基酸序列之C末端胺基酸。

【第83項】

如請求項80或81之CD80 ECD融合分子，其中該Fc域胺基酸序列經由連接肽，諸如GS連接子連接於該CD80 ECD胺基酸序列之C末端胺基酸。

【第84項】

一種組合物，其包含如請求項80至83中任一項之CD80 ECD融合分子，且進一步包含至少一種醫藥學上可接受之載劑。

【第85項】

如請求項84之組合物，其進一步包含其他治療劑，諸如至少一種免疫刺激劑。

【第86項】

如請求項85之組合物，其中該至少一種免疫刺激劑包含程式化細胞死亡1 (PD-1)/程式化細胞死亡配位體1 (PD-L1)抑制劑，諸如PD-1融合分子(亦即AMP 224)，諸如多肽(亦即AUR-012)，或諸如抗體，諸如抗PD-1抗體(亦即尼沃單抗、皮立珠單抗或派立珠單抗)或抗PD-L1抗體(亦即BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736或MSB0010718C)。

【第87項】

一種治療個體之癌症的方法，其包含投與該個體有效量之如請求項80至83中任一項之CD80胞外域(ECD)融合分子或如請求項84至86中任一項之組合物。

【第88項】

如請求項87之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【第89項】

如請求項88之方法，其中該癌症係選自結腸直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、頭部及頸部之鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌及子宮內膜癌。

【第90項】

如請求項87至89中任一項之方法，其中該癌症在選自手術、化學療法、放射療法或其組合之療法之後復發或進展。

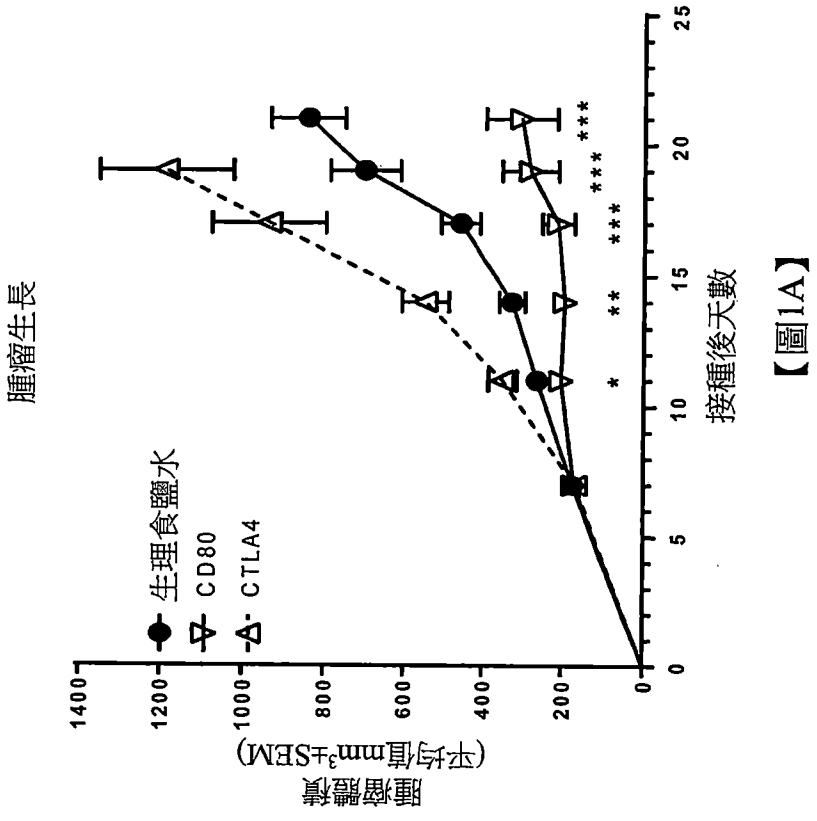
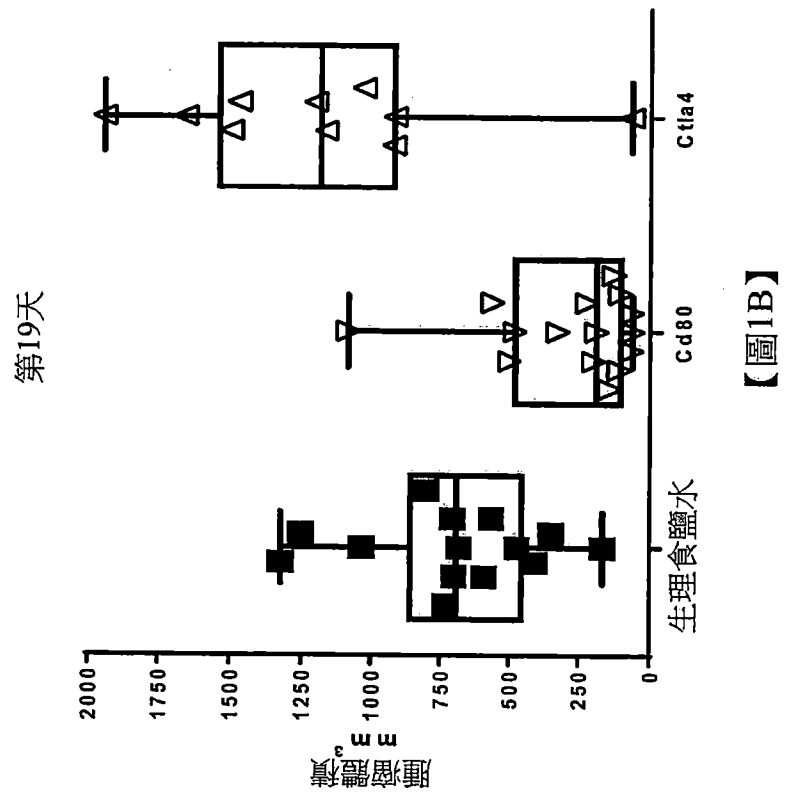
【第91項】

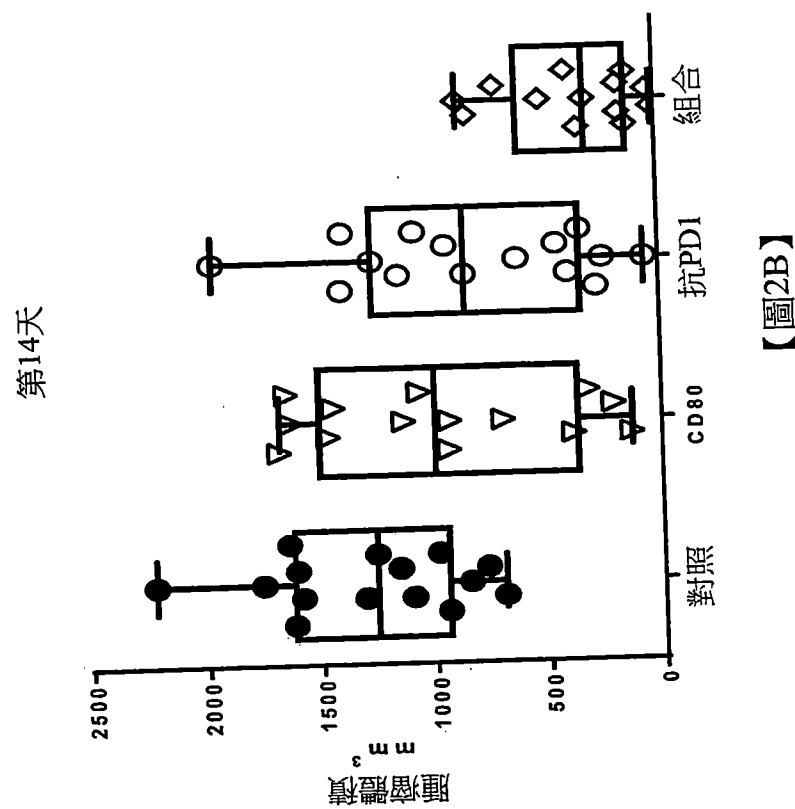
如請求項87至90中任一項之方法，其中該CD80 ECD融合分子或組合物係與至少一種諸如根據請求項86之藥劑的其他治療劑組合投與。

【第92項】

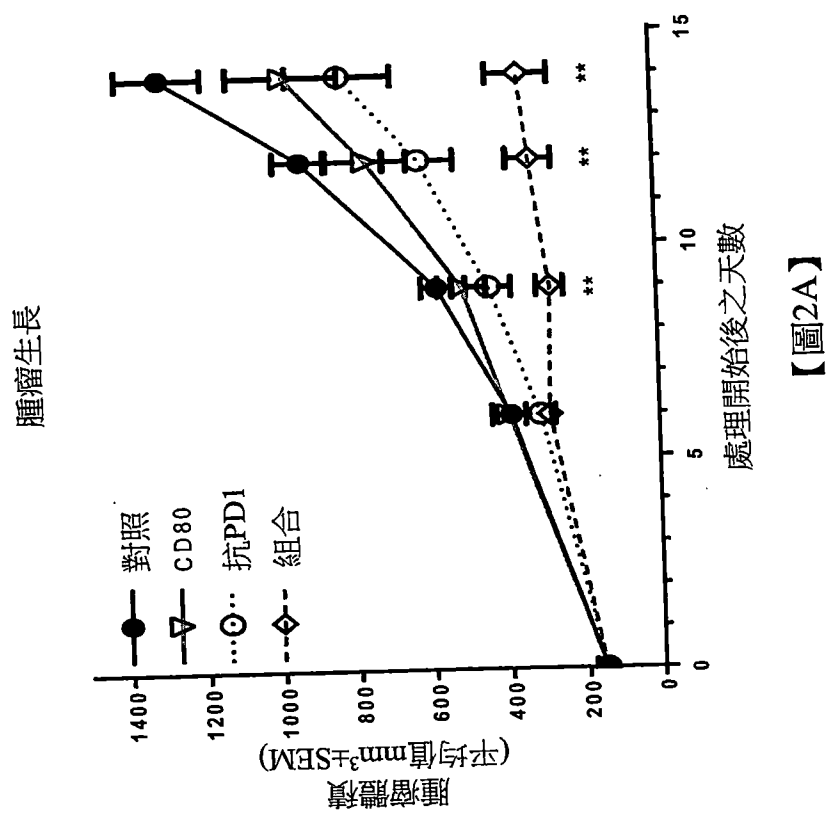
如請求項91之方法，其中該其他治療劑包含至少一種化學治療劑、生長抑制劑、抗血管生成劑及/或抗贅生性組合物。

【發明圖式】

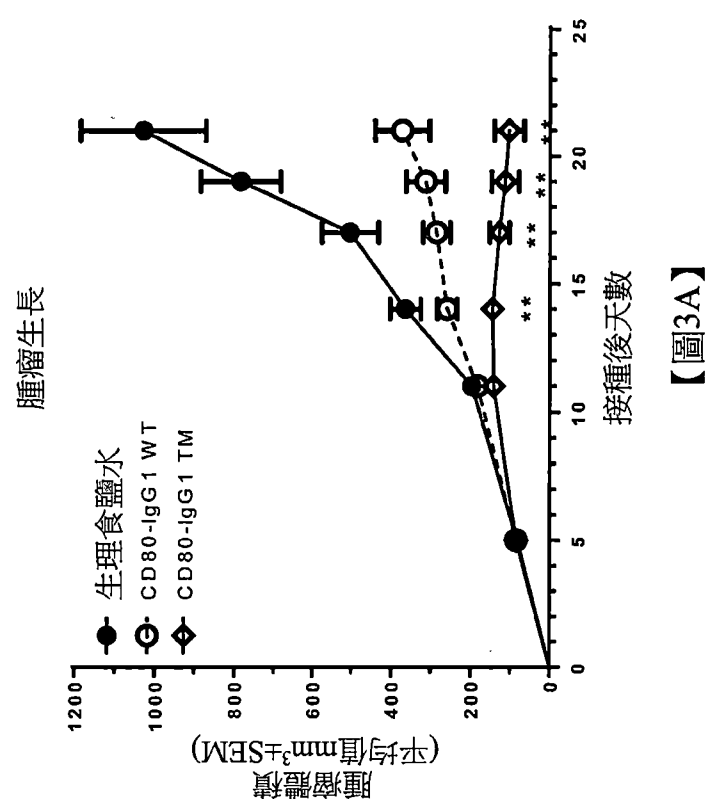
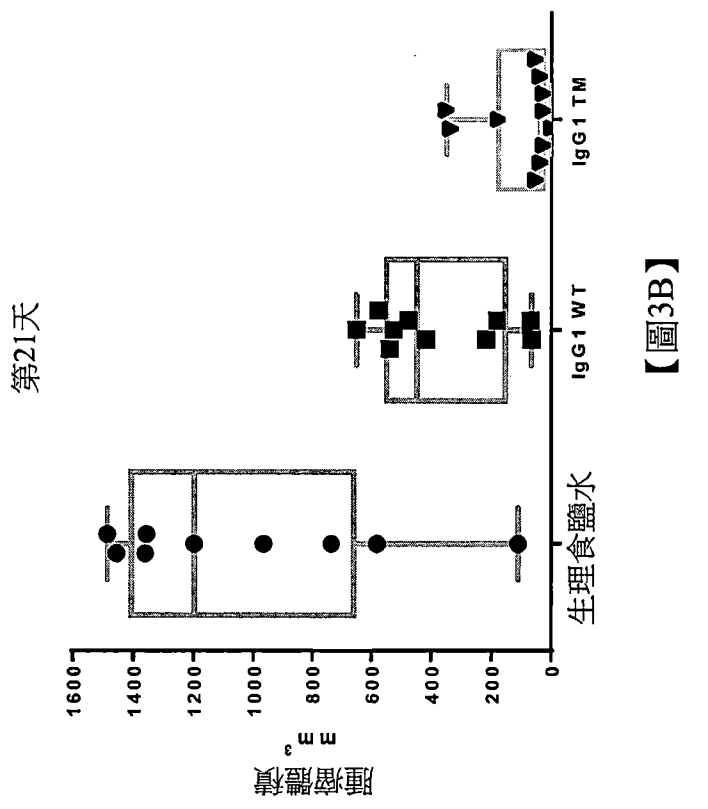


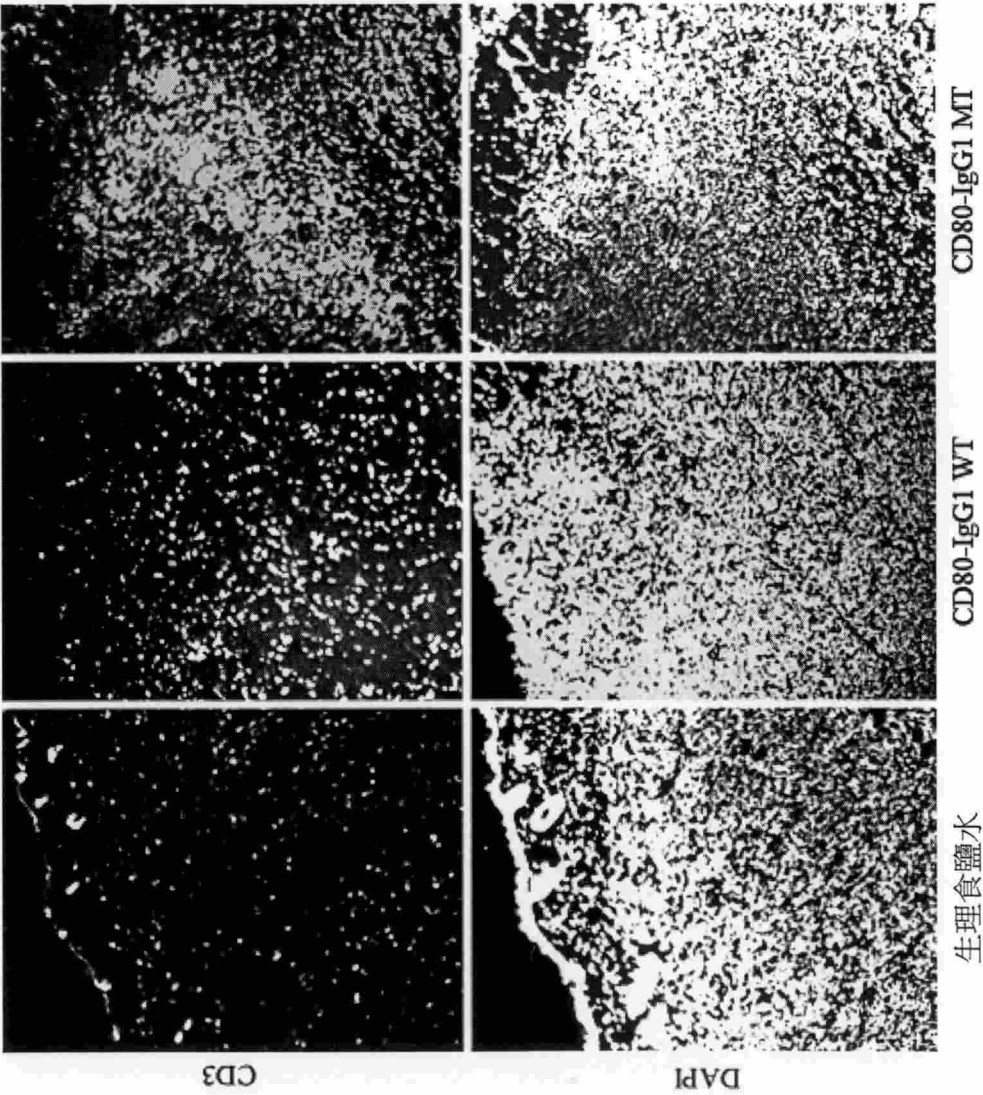


【圖2B】

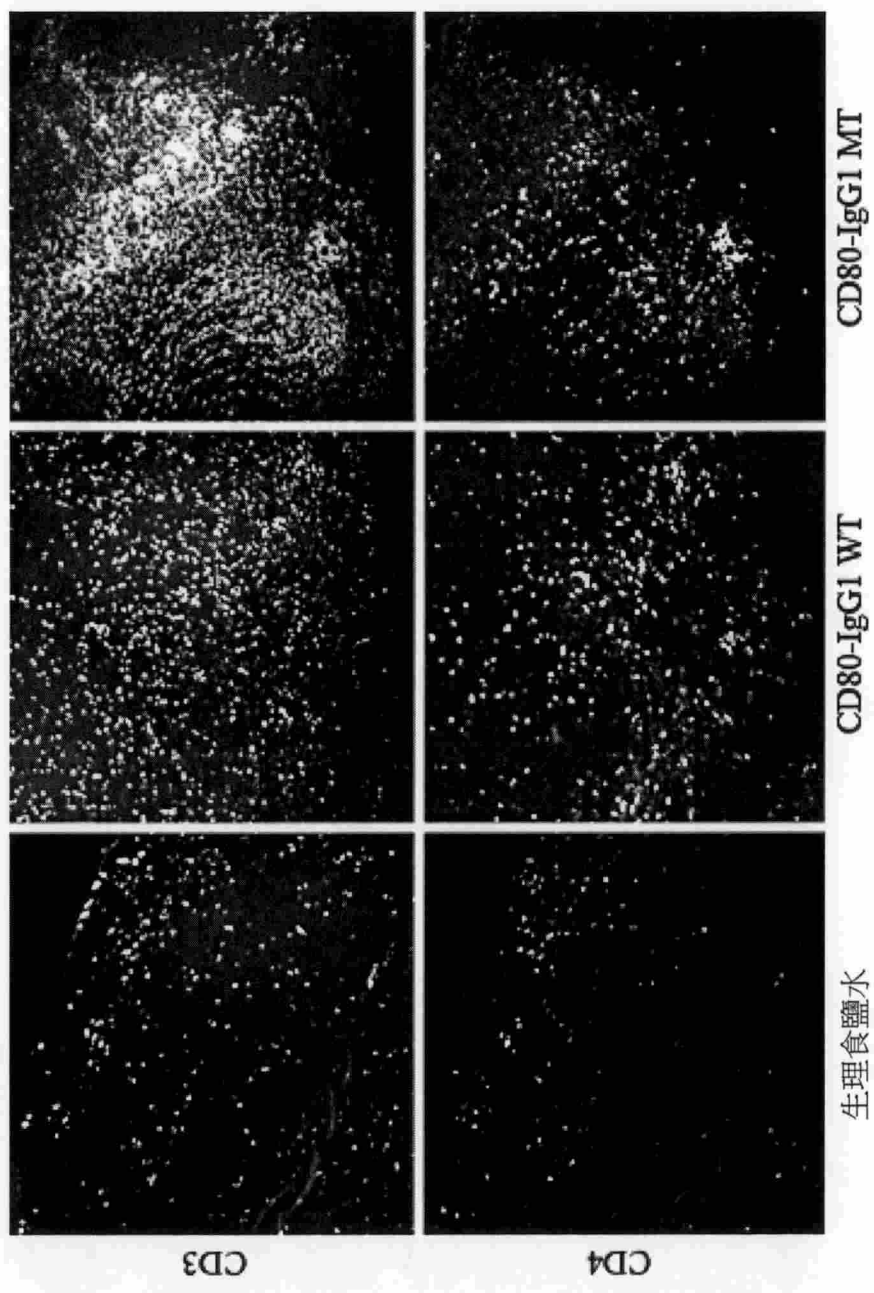


【圖2A】

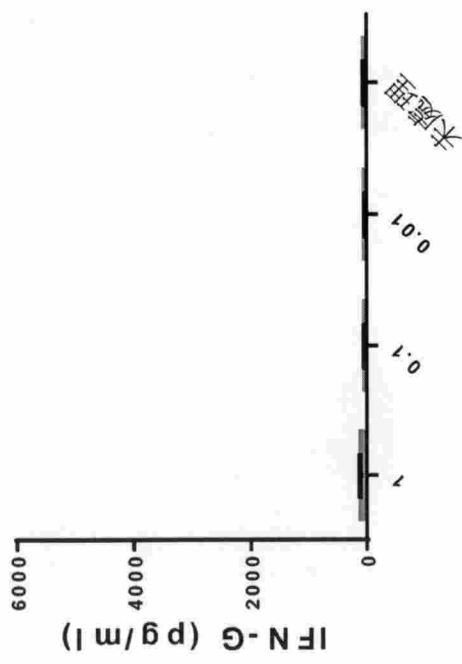




【圖4A】

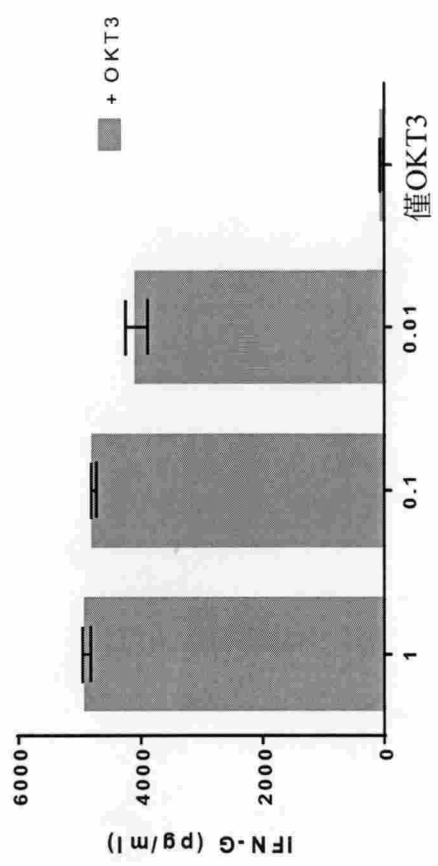


【圖4B】



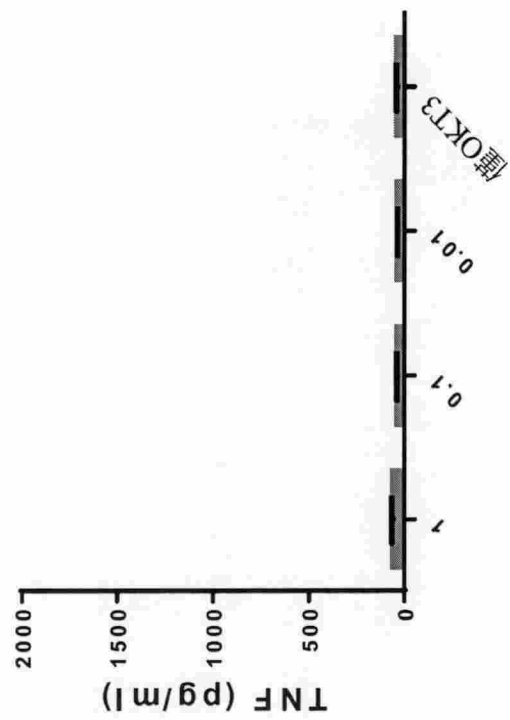
微克/孔經固定CD80-Fc

【圖5A】



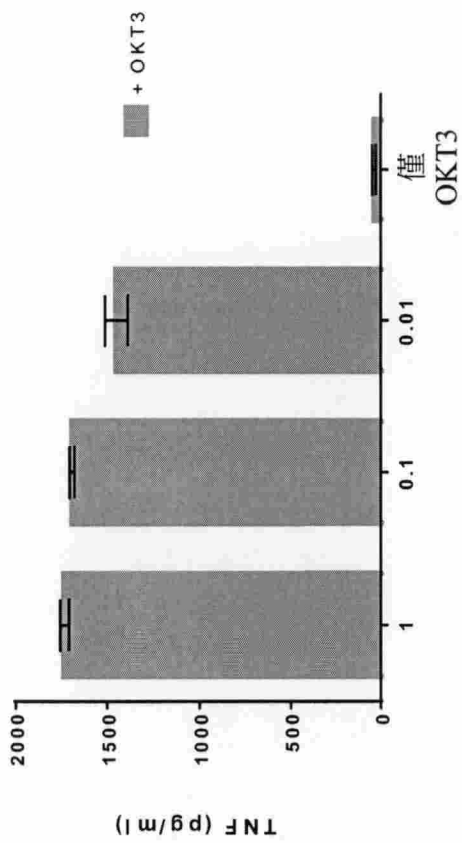
微克/孔經固定CD80-Fc

【圖5B】



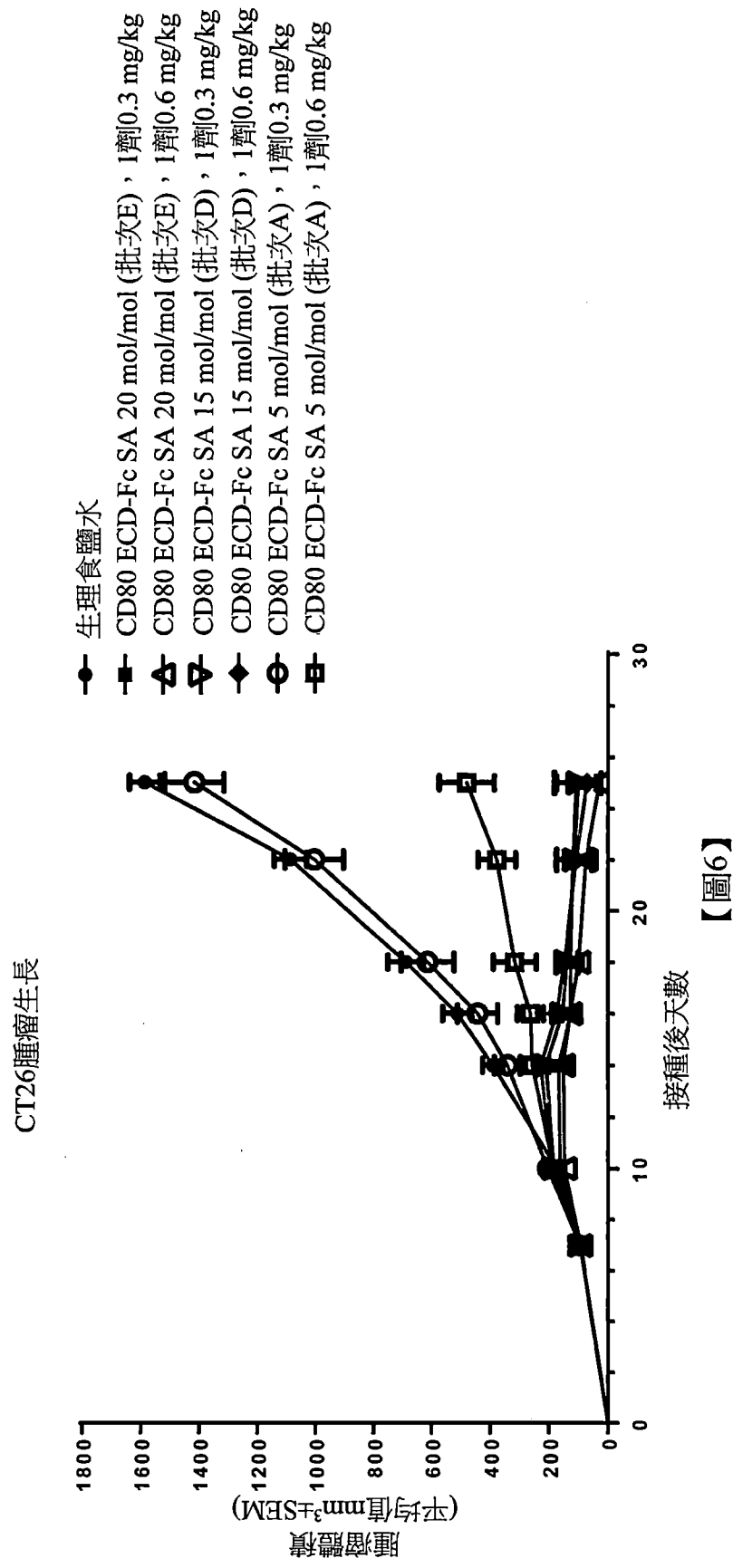
微克/孔經固定CD80-Fc

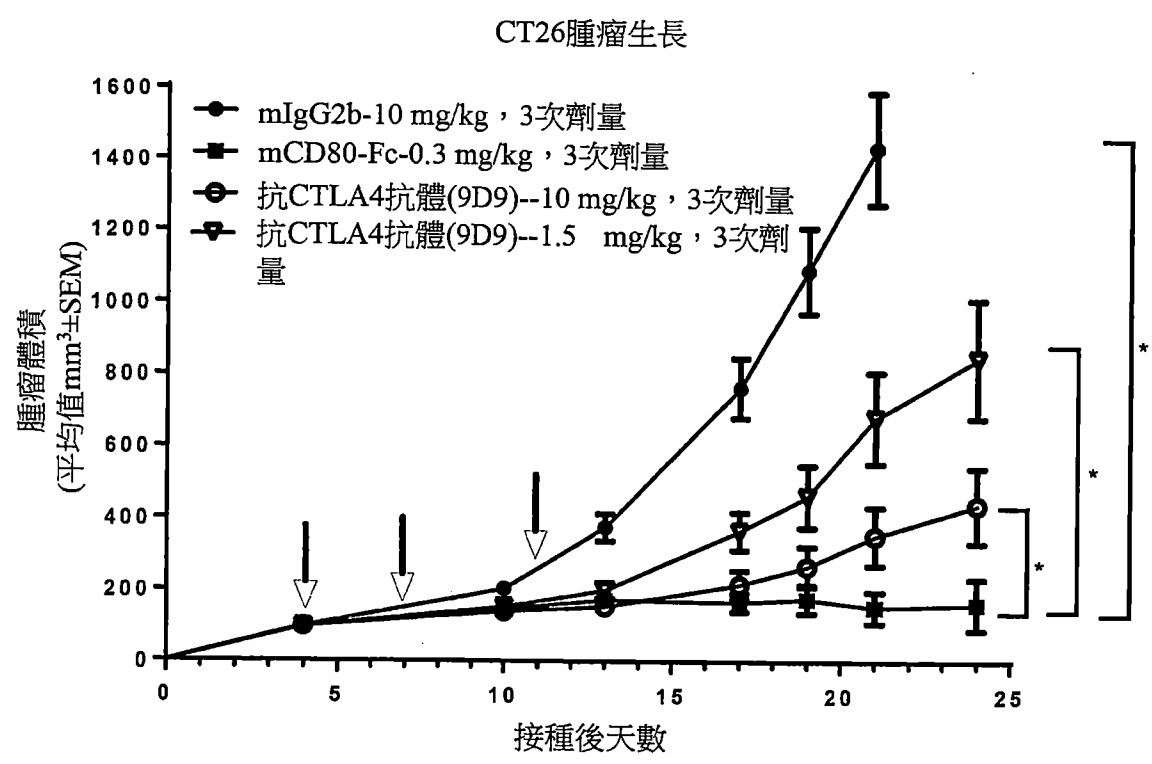
【圖5C】



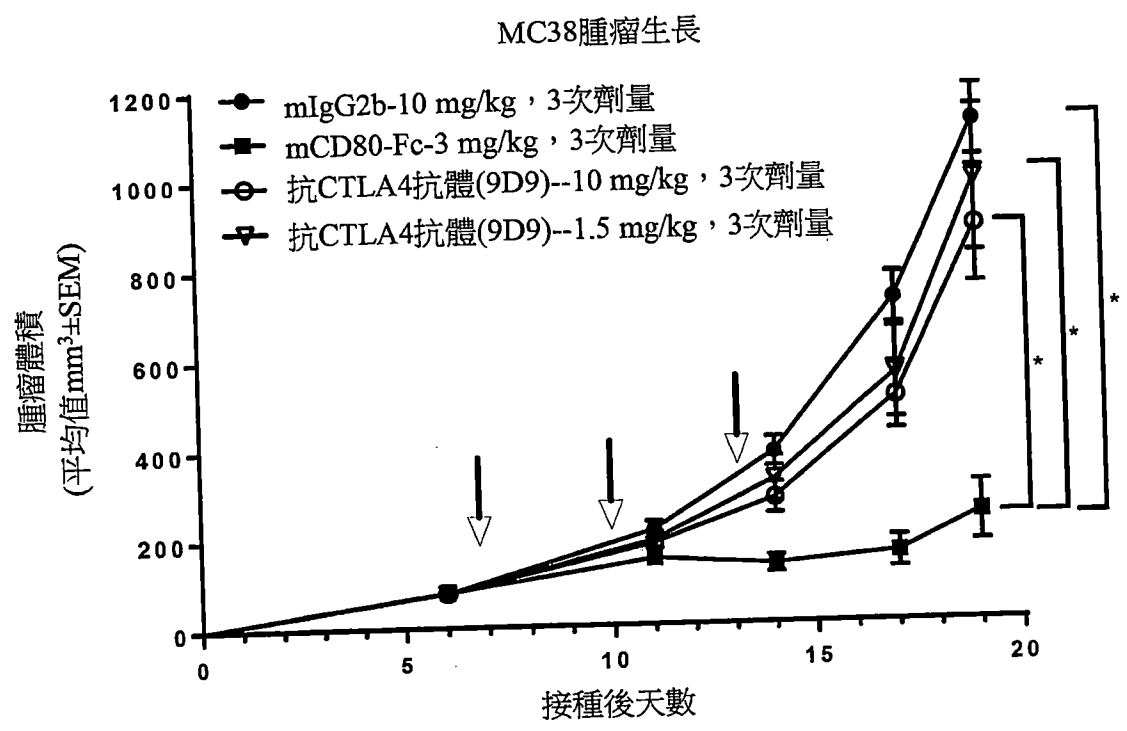
微克/孔經固定CD80-Fc

【圖5D】

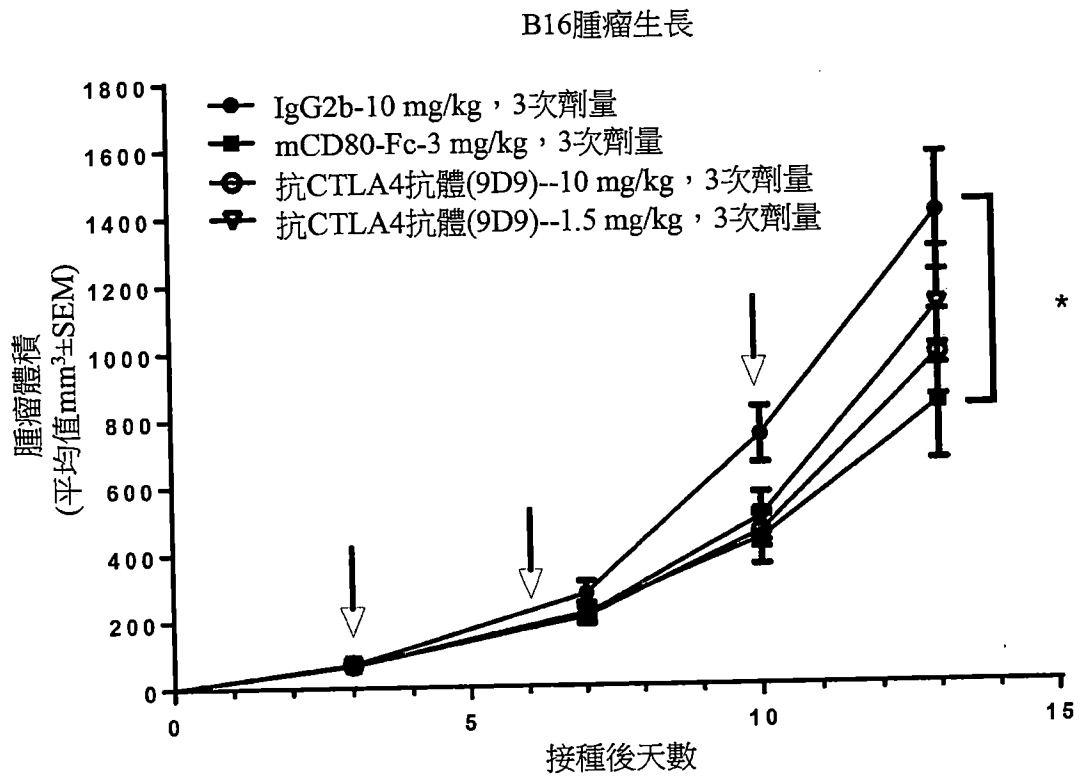




【圖7】



【圖8】



【圖9】