(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：200936607
(43)公開日：中華民國98(2009)年9月1日

(21)申請案號：097141645　(22)申請日：中華民國97(2008)年10月29日

(51)Int. Cl.：　C07K16/28 (2006.01)　C07K14/705 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)　A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權主張：2007/11/01　美國　60/984,631
2008/05/07　美國　61/051,215
2008/10/15　美國　12/251,960
2008/10/15　世界智慧財產權組織　PCT/US08/79981

(71)申請人：麥克斯金公司 MAXYGEN, INC.
美國

(72)發明人：卡爾　艾瑞克 KARRER, ERIK；佩德溫蓋特　瑪丹 PAIDHUNGAT, MADAN；貝斯　史蒂芬 BASS, STEVEN；奈柏斯　瑪格麗特 NEIGHBORS, MARGARET；普諾恩　裘哈 PUNNONEN, JUHA；查平　史蒂芬 CHAPIN, STEVEN；費許華那森　瑞哈 VISHWANATHAN, SRIDHAR；拉森　布蘭特 LARSEN, BRENT

(72)代理人：鄭智陽

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：365 項　圖式數：15　共 1075 頁

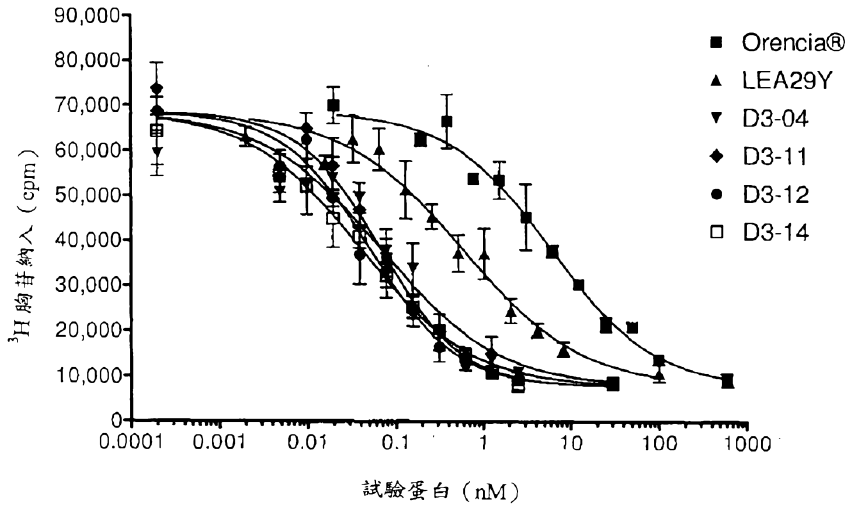
(54)名稱

免疫抑制多肽及核酸

IMMUNOSUPPRESSIVE POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS

(57)摘要

本發明提供免疫抑制性多肽以及編碼此等多肽之核酸。在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4多肽以及編碼突變CTLA-4多肽之核酸。其亦提供組合物以及使用此等多肽及核酸之方法。



(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：200936607
(43)公開日：中華民國98(2009)年9月1日

(21)申請案號：097141645　(22)申請日：中華民國97(2008)年10月29日

(51)Int. Cl.：　C07K16/28 (2006.01)　C07K14/705 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)　A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權主張：2007/11/01　美國　60/984,631
2008/05/07　美國　61/051,215
2008/10/15　美國　12/251,960
2008/10/15　世界智慧財產權組織　PCT/US08/79981

(71)申請人：麥克斯金公司 MAXYGEN, INC.
美國

(72)發明人：卡爾　艾瑞克 KARRER, ERIK；佩德溫蓋特　瑪丹 PAIDHUNGAT, MADAN；貝斯　史蒂芬 BASS, STEVEN；奈柏斯　瑪格麗特 NEIGHBORS, MARGARET；普諾恩　裘哈 PUNNONEN, JUHA；查平　史蒂芬 CHAPIN, STEVEN；費許華那森　瑞哈 VISHWANATHAN, SRIDHAR；拉森　布蘭特 LARSEN, BRENT

(72)代理人：鄭智陽

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：365 項　圖式數：15　共 1075 頁

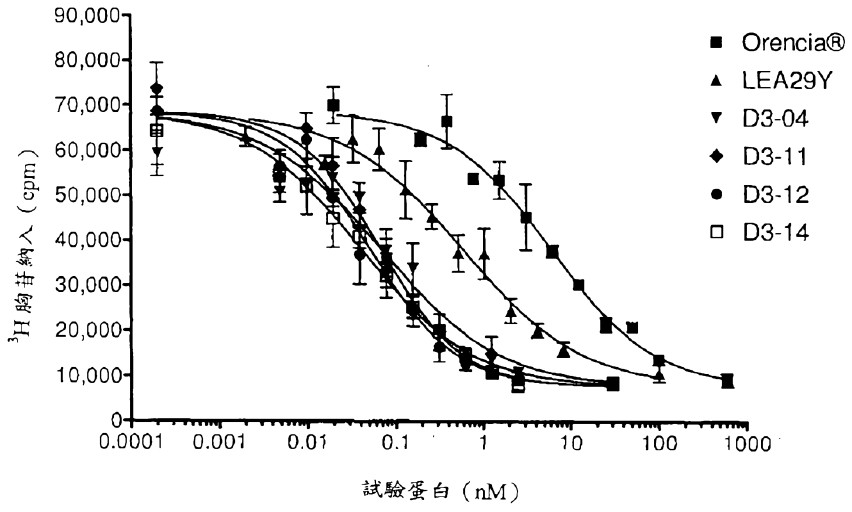
(54)名稱

免疫抑制多肽及核酸

IMMUNOSUPPRESSIVE POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS

(57)摘要

本發明提供免疫抑制性多肽以及編碼此等多肽之核酸。在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4多肽以及編碼突變CTLA-4多肽之核酸。其亦提供組合物以及使用此等多肽及核酸之方法。



六、發明說明：

相關申請案之交叉參照

本申請案陳請美國專利申請案序號12/251,960號（2008年10月15日申請）、國際專利申請案PCT/US08/79981號（2008年10月15日申請）、美國臨時專利申請案序號60/984,631號（2007年11月1日申請）、以及美國臨時專利申請案序號61/051,215號（2008年5月7日申請）之優先權以及權益，各個此等申請案之揭示內容為所有目的而以其全文併入本文作為參考。

智慧財產權註記

遵照37 C.F.R. 1.71（e），申請人註記，此揭示內容之部份含有受到智慧財產權保護之材料。有關任何人對於存在於專利及商標局（Patent and Trademark Office）之專利檔案或記錄中之該專利文件或專利揭示內容之傳真複製，該智慧財產權之擁有者並無任何反對，但在其他方面則保留所有之智慧財產權權利。

【發明所屬之技術領域】

本發明概略係關於一種可結合CD80及/或CD86之新穎多肽，編碼此等多肽之核酸，以及製備及使用此等多肽及核酸之方法。

【先前技術】

T細胞在免疫反應之起始及調控中扮演重要角色。為產生T細胞之完全活化，其需要至少兩種迥異之信號傳導事件。第一信號係藉著表現於T細胞表面之T細胞受體（TCR）與呈遞於表現在抗原呈遞細胞（APCs）上之主要組織相容性複合體（MHC）分子中之特定抗原（Ag）間之作用而產生。第二（共刺激）信號係由表現在APCs上之共刺激性配位體與其表現在T細胞上之對應受體間之作用而產生。其中一種優勢共刺激途徑

涉及表現在APCs上之CD80 （B7-1或B7.1）及CD86 （B7-2或B7.2）配位體與主要表現在T細胞上之CD28及CTLA-4 （亦稱為CD152）間之作用。CTLA-4 （胞毒性T淋巴細胞抗原4）及CD28係作為CD80及CD86配位體之受體。

正向信號傳導係經由CD28受體中介。CD80及/或CD86配位體與CD28之結合可藉著促進免疫突觸之形成而降低T細胞活化之閾值（Viola A. et al., Science 283:680-682 （1999））。此外，CD28之共刺激可活化或增進對於T細胞之增殖及存活具有重要性之因子的形成，諸如，間白素-2（IL-2）、NF-Kb及Bcl-XL（Norton S. D. et at., J. Immunol. 149:1556-1561 （1992）; Vella A. T. et al., J. Immunol. 158: 4714-4720 （1997））。在活體內，CD28-缺陷小鼠為嚴重免疫不全，並顯示不良之抗原專一性T細胞反應（Green, J. M. et al., Immunity 1:501-508 （1994））。當T細胞在無共刺激性信號存在下活化時，其可造成T細胞乏力或耐受。

負向信號傳導係經由CTLA-4受體中介。CD80及CD86配位體各以高結合性結合CTLA-4，並可平衡衍生自CD28信號傳導之免疫增生性反應。CTLA-4信號傳導之潛在機制包括競爭結合共刺激性分子CD80/CD86 （Masteller, E. M. et al., J. Immunol. 164:5319 （2000））、藉著觸誘對於免疫突發之磷酸酶而抑制TCR信號傳導（Lee K. M. et al., Science 282:2263 （1998））、以及破壞免疫突觸（Pentcheva-Hoang T. et al., Immunity 21:401 （2004）; Chikuma S. et al., J. Exp. Med 197:129 （2003）; Schneider H. et al., Science 313: 1972 （2006））。在活體內，CTLA-4缺陷小鼠顯示深度之自體免疫表型，其特徵為大量之組織浸潤以及器官破壞（Waterhouse P. et al., Science 270:985 （1995））。

設計用以拮抗CD80/CD86共刺激途徑之療劑，諸如，可溶性人類CTLA-4-Ig，具有治療自體免疫疾病及病症之可能。本發明提供具有調控或抑制經由CD80/CD86共刺激途徑之信號

傳導之改良能力的優異分子，並提供使用此等分子以對T細胞反應進行選擇及差式操縱之方法。此等分子在如下文詳細討論之各種應用中具有有益之用途。

【發明內容】

在第一態樣中，本發明提供一種分離或重組之CTLA-4多肽，其包含與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有最多15個胺基酸殘基差異之多肽序列，其中該分離或重組之CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

根據本發明第一態樣之多肽可與SEQ ID NO:36之多肽序列具有至少90%之序列相同性，或是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。根據本發明第一態樣之多肽可包含SEQ ID NO:36之多肽序列。

根據本發明第一態樣之多肽可與SEQ ID NO:50之多肽序列具有至少90%之序列相同性，或是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。根據本發明第一態樣之多肽可包含SEQ ID NO:50之多肽序列。

根據本發明第一態樣之多肽可具有結合人類CD80或人類CD86或是其任一者之胞外域的能力。

根據本發明第一態樣之多肽可包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

根據本發明第一態樣之多肽可包含一個胺基酸取代，該取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

根據本發明第一態樣之多肽可包含二、三或四個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代，諸如取代S70F。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代，諸如取代L104E。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代，諸如取代T30N/D/A或取代T30N。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代，諸如取代S64P。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代，諸如取代A50M。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代，諸如取代M54K/V或取代M54K。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代，諸如取代I65S。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代，諸如取代N56D。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代，諸如取代G55E。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代，諸如取代M85A。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代，諸如取代A24E/S或取代A24E。

根據本發明第一態樣之多肽可具有對於CD86或其胞外域之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD86或CD86胞外域之結合親和力。

根據本發明第一態樣之多肽可具有對於CD80或其胞外域之結合親和力，其係大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD80或

CD80胞外域之結合親和力。

根據本發明第一態樣之多肽可具有抑制免疫反應的能力。

根據本發明第一態樣之多肽可具有抑制T細胞活化或T細胞增殖的能力。

在第二態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽多聚體，其包含至少兩個本發明第一態樣之多肽。

在第三態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白，其包含（a）根據本發明第一態樣之多肽，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，且其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

在第四態樣中，本發明提供一種分離或重組之二聚體融合蛋白，其包含兩個根據本發明第三態樣之單體融合蛋白。

在第五態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、以及本發明第四態樣之二聚體融合蛋白。

在第六態樣中，本發明提供一種載體，其包含本發明第五態樣之核酸。

在第七態樣中，本發明提供一種分離或重組之宿主細胞，其包含本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸及/或本發明第六態樣之載體。

在第八態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑、醫藥可接受之載體或醫藥可接受之稀釋劑，以及下列之一或多種：本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞。

在第九態樣中，本發明提供一種抑制免疫反應之方法，該

方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者以抑制免疫反應：本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞，其中免疫反應因此受到抑制。

在第十態樣中，本發明提供一種本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞以用於抑制免疫反應。

在第十一態樣中，本發明提供一種使用本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞於製造用於抑制免疫反應之藥物之用途。

在第十二態樣中，本發明提供一種複合物，其包含本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白或本發明第四態樣之二聚體融合蛋白，以及共價連附於此種多肽、多聚體、融合蛋白或二聚體融合蛋白之非多肽分子部分，其中該複合物具有抑制免疫反應的能力。

本發明之其他態樣述於下文。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域（ECD），及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽具有對於人類CD86胞外域或人類

CD80胞外域之結合親和力，其分別係約等於或大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域或人類CD80胞外域之結合親和力，且其中該多肽視情況具有抑制免疫反應的能力。部分此等多肽具有對於人類CD86胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域之結合親和力。部分此等多肽具有對於人類CD80胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD80胞外域之結合親和力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其(a) 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及(b) 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含 (i) 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及(ii) 位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可壓抑或抑制免疫反應，其中該多肽包含多肽序列，其 (a) 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及 (b) 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一

個胺基酸取代包含S70F，其中該胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過11、10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基位置，其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%

之相同性，以及（b） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS: 74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，各個單體融合蛋白包含：（1）多肽，其包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，且其中在該多肽序列中位於位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，其中各個單體融合蛋白包含：（1） 突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（i）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，及（ii） 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置；以及（2） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。部分此等融合蛋白二聚體在對應於相對SEQ ID NO:159之胺基酸位置包含一或多個

取代，選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群；以及（2） Ig Fc多肽，該Ig Fc多肽視情況係IgG2 Fc多肽，其中該突變CTLA-4-Ig二聚體可結合hCD80或hCD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:56所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽（i） 可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或（ii） 可抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽（i） 可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，（ii） 可結合CD80-Ig融合蛋白及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或（iii） 可抑制免疫反應。

其亦提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199及SEQ ID NO:200所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有（i） 結合CD80及/或CD86以及/或是CD80及/或CD86之胞外域的能力，（ii） 結合CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或（iii） 具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222所組成之

群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含：(a) 聚核苷酸序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性；(b) (a)之互補聚核苷酸序列；或是(c) (a)或(b)之任何聚核苷酸序列之片段，其中該核酸編碼多肽，該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，(a) 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基(如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基)之差異，且(b) 其中在該多肽序列中位於位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，其(a) 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基(如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基)之差異，及(b) 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其任一者之胞外域的能

力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，具有（i）與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii）位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80/或hCD86或是其ECD，及/或可抑制免疫反應，其中該胺基酸取代視情況包含S70F，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼重組多肽二聚體，其包含兩個多肽，其中各個此種多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，以及（b）Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ

ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種表現載體，其包含：(i) 第聚核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該第多肽可結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，以及 (ii) 第二聚核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含一免疫球蛋白(Ig)多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之宿主細胞，其經編碼一融合蛋白之核酸轉染，該核酸包含：(i) 第一核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該第多肽具有結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有抑制免疫反應的能力；以及 (ii) 第二核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含一免疫球蛋白 (Ig) 多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽，其中該宿主細胞可表現該融合蛋白。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制免疫反應之方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞以抑制免疫反應，其中免疫反應因此受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種調控表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使

B7-陽性細胞接觸有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞以調控B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用，其中B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用因此受到調控。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，其中CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用因此受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制對象體內CD28-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含對一對象投予有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，其中該對象體內之內源性CD28-陽性T細胞與內源性B7-陽性細胞之作用受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種治療具有由內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞之作用所調控之免疫系統疾病或病症之對象的方法，該方法包含對需要此種治療之對象投予治療有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，其中在該內源性T細胞與表現該CD80及/或該CD86之內源性細胞間之該（等）作用受到抑制，因而治療該對象體內之免疫系統疾病或病症。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織或器官移植之排斥的方法，該方法包含對於需要之接受者對象投予治療有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，因而抑制接受者對象對於該組織或器官移植之排斥。

在另一態樣中，本發明提供一種製備融合蛋白之方法，該方法包含：(1) 在培養基中培養經一核酸轉形之宿主細胞，其中該核酸包含：(i) 第一核苷酸序列，編碼第多肽，其與SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列具有至少95%、96%、

97%、98%、99%或100%之相同性，該多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是CD86或CD80中任一者之胞外域，以及(ii) 第二核苷酸序列，編碼Ig多肽，其包含鉸鏈區、CH2域及CH3域，因而表現該核酸並產生融合蛋白；以及(2) 回收該融合蛋白。

其亦提供一種生產多肽之方法，其包含在一種群之細胞中引入本發明之核酸，其中該核酸以可操作之方式連結可有效生產由該核酸所編碼之多肽的調控序列；在培養基中培養該等細胞以生產該多肽；以及自該等細胞或培養基中分離該多肽。

其亦提供組合物，其包含本發明之分子(如，突變CTLA-4分子)以及賦形劑、載體或稀釋劑。其亦包括醫藥組合物，其包含本發明之分子以及醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑。

本發明之其他態樣述於下文。

【實施方式】

定義

亦須明瞭，本文所用之辭彙僅係為敘述特定之聚體實例且不係意欲進行限制。除非另外定義，本文中所用之所有技術及科學辭彙具有一般熟習本發明所屬技藝者所通常明瞭之相同意義。

名辭「核酸」及「聚核苷酸」在本文中係交互使用以指稱單或雙股形式之核酸殘基(如，去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合物。除非明確限定，該等名辭涵括含有天然核苷酸之已知類似物之核酸，其與參照核酸具有類似之結合特性，並可以類似天然核苷酸之方式進行代謝。除非另有明示，特定之核酸序列亦暗含其保守性修飾變體(如，簡併密碼子取代物)及互補核苷酸序列，以及該明確指明之序列。特定言之，簡併密碼子取代物可藉由產生其中一或多個所選(或全部)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列而達成(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)；Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605 2608 (1985)；及Cassol et al.

（1992）；Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91 98 （1994））。名辭核酸或聚核苷酸係與cDNA或是由基因編碼之mRNA交互使用。

名辭「基因」廣泛係指與生物功能相關之任何核酸節段（如，DNA）。基因可包括其表現所需之編碼序列及/或調控序列。基因亦可包括未經表現之DNA核酸節段，其，例如，形成其他蛋白之辨識序列（如，啟動子、增強子或其他調控區域）。基因可自各種不同之來源取得，包括，自目標來源選殖，或是由已知或預測之序列資訊而合成，且其可包括一或多個經設計以具有所欲參數之序列。

名辭「多肽」、「肽」或「蛋白」係交互使用以指稱胺基酸殘基之聚合物。該等名辭可應用於其中一或多個胺基酸殘基係對應天然胺基酸之人工化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天然胺基酸聚合物及非天然胺基酸聚合物。在本文中，該等名辭涵括任何長度之胺基酸鏈，包括全長蛋白（亦即，抗原），其中該等胺基酸殘基係由共價肽鍵連結。

特定胺基酸聚合物或核酸聚合物之編號係「對應」或「相對」所選胺基酸聚合物或核酸聚合物之編號，當任何特定聚合物組成份（如，胺基酸、核苷酸，亦通稱為「殘基」）之位置係藉由參照所選胺基酸或核酸聚合物之相同或相當位置而指明，而非由該組成份在該特定聚合物中之實際編號位置指明。因此，舉例而言，特定胺基酸位置在特定多肽序列中之編號係對應於作為參照序列之所選多肽中的該相同或相當胺基酸位置。

名辭「相當位置」（例如，「相當胺基酸位置」或「相當核酸位置」或「相當殘基位置」）在本文中係定義為在使用本文所述之排比算法進行排比時（較佳係最適排比），與參照多肽（或試驗聚核苷酸）序列之對應位置對準之試驗多肽（或試驗聚核苷酸）序列位置（諸如胺基酸位置或核酸位置或殘基位置）。試驗多肽之相當胺基酸位置並不需要具有與該試驗多肽

之對應位置具有相同之數字位置編號。同樣，試驗聚核苷酸之相當核酸位置並不需要具有與該試驗聚核苷酸之對應位置具有相同之數字位置編號。

「突變」多肽包含與母體或參照多肽（諸如，如，野生型（WT）多肽序列）之多肽序列具有一或多個胺基酸殘基差異之多肽序列。在一態樣中，突變多肽包含與母體或參照多肽之多肽序列具有該母體或參照多肽序列殘基總數之自約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、30%、40%、50%或以上差異之多肽序列。在另一態樣中，突變多肽包含與母體或參照多肽之多肽序列具有至少約50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性之多肽序列。在另一態樣中，突變多肽包含與母體或參照多肽之多肽序列具有自1至100個或以上之胺基酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之胺基酸殘基）差異之多肽序列。突變多肽可包含與母體或參照多肽之多肽序列具有由一或多個胺基酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之胺基酸殘基）之，如，缺失、添加或取代，或是此（等）缺失、添加及/或取代之任何組合所造成差異之多肽序列。該參照或母體多肽本身可為突變多肽。

「突變」核酸包含與母體或參照核酸（諸如，如，WT核酸）之核苷酸序列具有一或多個核酸殘基差異之核苷酸序列。在一態樣中，突變核酸包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有該母體或參照核苷酸序列殘基總數之自約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、30%、40%、50%或以上差異之核苷酸序列。在另一態樣中，突變核酸包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有至少約50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性之核苷酸序列。在另一態樣中，突變核酸包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有自1至100個或以上之核苷酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之核苷酸殘基）差異之核苷酸序列。突變核酸可包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有由一或多個核苷酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之核苷酸殘基）之，如，缺失、添加或取代，或是此（等）缺失、添加及/或取代之任何組合所造成差異之核苷酸序列。該參照或母體核酸本身可為突變核酸。

「天然」在應用於物件時意味該物件係在自然中發現而不同於由人類人工製造。「非天然」在應用於物件時意味該物件並非天然存在（亦即，該物件不可在自然中發現）。舉例而言，非天然之多肽係指由人製備之多肽，諸如，舉例而言，藉由活體外合成或是人工製備。

目標序列之「亞序列」或「片段」係該完整序列之任何部分，其最多直到但不包括該完整目標序列。

核酸、蛋白或其他組成份係經「分離」，當其部分或完全與其正常相連之組成份分離（其他蛋白、核酸、細胞、合成試劑等）。在莫耳基礎上，經分離之種類較組合物中之其他種類更為大量。舉例而言，該經分離之種類可包含所有存在巨分子種類之至少約50%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%（在莫耳基礎上）。較佳者，該目標種類係經純化至本質上均質性（亦即，已習知之偵測方法無法在組合物中偵測到污染種類）。純度及均質性可使用技藝中所熟知之諸多技術判定，諸如，蛋白或核酸樣本之瓊脂糖或聚丙烯醯胺凝膠電泳，接著再染色進行顯像。如需要，可使用高解析技術，諸如，高效液相層析（HPLC）或類似方式而純化該材料。

名辭「純化」在應用於核酸或多肽時一般而言代表以技藝中所熟知之分析技術判定為本質上不含其他組成份之核酸或多肽（如，經純化之多肽或聚核苷酸在電泳膠、層析溶析液及/或進行密度梯度離心之媒質中形成不連續之條帶）。舉例而言，在凝膠電泳中產生本質上一道條帶之核酸或多肽為經「純化」。經純化之核酸或多肽係至少約50%純度，通常係至少約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或以上純度（在莫耳基礎上之重量百分比）。

在相關之概念上，本發明提供使組合物富含一或多種本發明分子之方法，諸如本發明之一或多種多肽或聚核苷酸。當在應用純化或富集技術之後，該分子之濃度具有實質上之增加時，組合物即富含該分子。實質上純性之多肽或聚核苷酸一般而言將會包含以特定組合物中所有巨分子種類重量計（在莫耳基礎上）之至少約55%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98、99%、99.5%或以上。

核酸或多肽係為「重組」，當其係人工或經工程處理，或是衍生自人工或經工程處理之蛋白或核酸。

名辭「重組」在用於參照細胞時，一般而言係指該細胞可複製異源核酸或是表現由異源核酸編碼之多肽。重組細胞可包含不可在天然（非重組）形式之該細胞中發現之基因。重組細胞亦包括諸等包含可在天然（非重組）形式之該細胞中發現之基因，但該等基因係經修飾或是以人工方式重新引入該細胞中者。該名辭亦涵括該等包含對於該細胞為內源性之核酸，但該等核酸已在未將該核酸自該細胞移出之情形下經修飾者；此等修飾包括該等由基因置換、定位突變、以及熟習技藝者已知之相關技術所取得者。重組DNA技術包括用於在活體外生產重組DNA，並將該重組DNA傳遞至其可經表現或擴增之細胞中，因而生產重組多肽之技術。

「重組表現基因盒」或簡稱為「表現基因盒」係一種核酸建構物，其可由重組或合成產生，具有可在與該等序列相容之宿主中造成結構基因表現之核酸元件。表現基因盒至少包括啟動子及視情況之轉錄終止信號。一般而言，重組表現基因盒包括待轉錄之核酸（如，編碼所欲蛋白之核酸）以及啟動子。其他進行表現所需或有助之因子亦可如本文所述使用。舉例而言，表現基因盒亦可包括編碼可指引經表現蛋白由宿主細胞分泌之信號序列的核苷酸序列。轉錄終止信號、增強子、以及其他可影響基因表現之核酸序列亦可包括於表現基因盒中。

「外源核酸」、「外源DNA節段」、「外源序列」或「異源核酸」在本文中係源自於對特定宿主細胞而言為外來之來源者，或者，如係來自相同來源，係自其原始形式而經修飾者。因此，宿主細胞中之異源基因包括該等對於該特定宿主細胞為內源性但已經修飾者。在本文所述應用中之異源序列修飾一般而言係經由使用定向分子進化法而產生。因此，該名辭係指一DNA節段，其對於該細胞係外來或外源，或是對於該細胞為同源，但其在該宿主細胞核酸中之位置係原始無法發現該元件者。外源核酸或外源DNA經表現以產生外源多肽。

「載體」可為任何可在宿主細胞中傳遞或維持核酸之試劑，例如，但不限於，質體（如，DNA質體）、裸核酸、病毒載體、病毒、具有一或多種多肽或其他分子之核酸複合物、以及固定於固態顆粒上之核酸。載體在下文詳細敘述。載體可作為在宿主細胞中傳遞或維持外源基因及/或蛋白之試劑。載體可轉導、轉染或轉形細胞，因而造成該細胞複製或表現對於該細胞而言非屬天然之核酸及/或蛋白，或是以該細胞而言非屬天然之方式複製或表現核酸及/或蛋白。載體可包括用以協助達成核酸進入細胞之材料，諸如，病毒顆粒、脂質體、蛋白殼或其類似者。可使用任何可將核酸傳遞至細胞中之方法；除非另有明示，名辭載體並非意指任何用以將核酸傳遞至細胞中之特定方法，或是意指任何特定細胞類型係轉導之對象。本發明

並不限於用以傳遞或維持本發明任何核酸之任何特定載體，該核酸包括，編碼可結合D80及/或CD86或其片段（如，CD80 ECD或CD86 ECD）之本發明突變CTLA-4多肽或其片段（如，突變CTLA-4 ECD）之核酸。

名辭「表現載體」一般而言係指核酸建構物或序列，其可由重組或合成產生，具有一系列之特定核酸元件，其可容許特定核酸在宿主細胞中之轉錄。表現載體一般而言包括以可操作之方式連結啟動子之待轉錄核酸。名辭「表現」包括任何涉及多肽生產之步驟，其包括，但不限於，轉錄、後轉錄修飾、轉譯、後轉譯修飾及/或分泌。

「信號肽」係一種肽（或胺基酸）序列，其一般而言係位於目標多肽前面，且其與該多肽共同轉譯，並指引或協助該多肽進入分泌系統。信號肽一般而言係與該目標多肽之胺端共價連結或融合，並可協助該目標多肽自宿主細胞分泌。信號肽一般而言在轉譯之後由該目標多肽切除。

名辭「編碼」係指核苷酸編碼一或多個胺基酸之能力。該名辭並不需要起始或中止密碼子。胺基酸序列可由聚核苷酸序列及其互補體所提供之六種不同讀框中之任一者而編碼。

名辭「控制序列」在本文中係定義為包括對於表現本發明之多肽而言係需要或是有利之所有組成份。各個控制序列可為對於編碼該多肽之核苷酸序列而言係天然或外來者。此等控制序列包括，但不限於，引導序列、聚腺苷序列、原肽、信號肽序列、以及轉錄終止子。在最小限度，控制序列包括啟動子，以及轉錄及轉譯中止信號。控制序列可與連接子共同提供，以引入可協助該等控制序列與編碼多肽之核苷酸序列編碼區域接合之特定限制位點。

名辭「編碼序列」係指可直接指定其蛋白產物胺基酸序列之核苷酸序列。編碼序列之邊界一般而言係由開放讀框（ORF）決定，其可起始於ATG起始密碼子。

核酸係「以可操作之方式連結」另一核酸序列，當其係被

置入與另一核酸序列之功能性關係中。舉例而言，啟動子或增強子係以可操作之方式連結編碼序列，如其可指引該編碼序列之轉錄。以可操作之方式連結意謂該等經連結之DNA序列一般而言係毗連者，且在必須結合兩個蛋白編碼區域時，其係毗連且符合讀框者。然而，由於增強子一般而言係在距離啟動子數千個鹼基時作用，且內含子序列可具有不同長度，部分之聚核苷酸元件可係以可操作之方式連結但並非毗連。

「宿主細胞」係任何易於經核酸轉形之細胞。

「聚核苷酸序列之實質上全長」或「多肽序列之實質上全長」分別係指聚核苷酸序列或多肽序列長度之至少約50%、60%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或以上。

「抗原」係指一種物質，其可與由特定免疫原所激發免疫反應之該（等）產物反應。參見，如，Julius Cruse et al., Atlas of Immunology 60（1999）; Richard Coico et al., Immunology: A Short Course 27-30 （5th ed. 2003）。免疫反應可包含體液反應及/或細胞中介性免疫反應（如，胞毒性T淋巴細胞（CTLs））。免疫反應之產物可包括抗體及/或CTLs。抗原一般而言係巨分子（如，多肽、核酸、碳水化合物複合物、磷脂、多醣），其對於該宿主而言係外來者；稱為抗原決定區之抗原部分可反應（如，結合）免疫反應之該（等）產物，諸如，抗體或是位於T淋巴細胞上之專一性T細胞受體。抗原可（但非必須）誘發免疫反應以及與該免疫反應之該（等）產物反應。「抗原性」係指為具抗原性之狀態或特性—亦即，具有抗原之特性。抗原之專一性可在抗原對其抗體或是相反之關係中顯示；抗原一般而言可以高度專一之方式與其對應抗體反應，且並不會以相同程度之關一性與由該免疫原所誘發之其他抗體反應。「抗原量」係以可偵測之方式與由特定免疫原所激發免疫反應之該（等）產物反應之抗原量。

「免疫原」係指一種物質，其可誘發免疫反應而非免疫耐受。參見，如，Julius Cruse et al., 上述文獻於60-61；Richard Coico, 上述文獻於27-30。免疫原亦可反應（如，結合）該經誘發免疫反應之該（等）產物，該（等）產物係已經專一誘發而對抗該等抗原者。因此，所有之免疫原皆係抗原。「免疫原性」係指為具免疫原性之狀態或特性—亦即，具有免疫原之特性。「免疫原量」係可在對象體內有效誘發可偵測性免疫反應之免疫原量。免疫原可在對象體內激發強免疫反應，諸如對於至少一種病原之至少部分或完整之保護性免疫力。

「免疫調控劑」或「免疫調控性」分子，諸如，免疫調控性多肽或核酸，可調控免疫反應。「調控」免疫反應係意欲改變該免疫反應。舉例而言，在對象體內「調控」免疫反應一般而言意謂在該對象體內激發、誘發、抑制、降低、壓抑、增加、增強或以其他方式改變免疫反應。免疫反應之此種修飾可以熟習技藝者已知之方法評估，包括述於下文者。「免疫抑制劑」係一種分子，諸如多肽或核酸，其可抑制免疫反應。

在本文中，「抗體」（縮寫為「Ab」）係指一種免疫球蛋白（縮寫為「Ig」），不論係天然或是全部或部分合成製備。該名辭包括其保有抗原專一性結合能力之所有衍生物。該名辭亦涵括具有與免疫球蛋白結合域同源或大量同源之結合域的任何蛋白。此等蛋白可衍生自天然來源，或是部分或全部合成製備。抗體可為單株或多株。抗體可為任何免疫球蛋白類型之成員，包括五種人之類型中之任一者：IgA （其包括亞型IgA1及IgA2）、IgD、IgE、IgG （其包括亞型IgG1、IgG2、IgG3及IgG4）及IgM。抗體包含配對之重及輕多肽鏈，且各個此種鏈係由個別之免疫球蛋白域構成。各鏈包括恆定（C）區及可變（V）區。典型之抗體結構單元包含四聚體。各個四聚體係由兩組相同配對之多肽鏈構成，各組配對具有一條「輕」鏈（約25 kDa）及一條「重」鏈（約50-70 kDa）。根據抗體類型，重鏈以五種主要類型（γ、μ、δ、α及ε）存在，且含有約450-600

個胺基酸殘基。輕鏈共有兩種主要類型（λ及κ），且其含有約230個胺基酸殘基。舉例而言，IgG抗體係一種四聚蛋白，其包含兩條重鏈及兩條輕鏈。各條IgG重鏈含有以N-端至C-端順序連結之四個免疫球蛋白域：V_H-C_H1-C_H2-C_H3 （有時亦縮寫為VH-CH1-CH2-CH3）。此等縮寫分別係指重鏈可變域、重鏈恆定域1、重鏈恆定域2及重鏈恆定域3。重鏈亦可以抗體類型指稱，諸如，如，Cγ1，其代表IgG抗體之加瑪（γ）重鏈之第一恆定域。各條IgG輕鏈包含以N-至C-端順序連結之兩個免疫球蛋白域：V_H-C_L，其中V_H及C_L分別係指輕鏈可變域及輕鏈恆定域。

抗體之可變區（其一般而言在各條多肽鏈之N-端包含約100至110個或以上之胺基酸）包括抗原結合決定區，且因此主要負責抗原辨識及專一性。抗體間之最大程度胺基酸序列變異係存在於該可變區。大部分之序列變異存在於位在可變區中之互補決定區（CDRs）。總計共有六個CDRs，三個CDRs在各條重鏈中，而三個CDRs在各條輕鏈中，其共同形成抗原結合位點。重鏈CDRs稱為V_H CDR1、V_H CDR2及V_H CDR3，而輕鏈稱為V_L CDR1、V_L CDR2及V_L CDR3。位於CDRs外之區域稱為框架（FR）區。不同抗體之框架區可具有胺基酸殘基之差異，但其胺基酸變異性程度並不及於不同抗體可變區間所存在者。在諸多情形下，框架區為由CDRs所提出之胺基酸變異性提供了穩定或恆定的架構。

名辭「抗體片段」係指小於全長之任何抗體衍生物。抗體片段之實例包括，但不限於，含有V_H-C_H1及V_H-C_L之抗原結合片段（Fab）、含有V_H及V_L之可變片段（Fv）、含有共同連結於一條鏈中之V_H及V_L的單鏈可變片段（scFv）、以及其他V區片段，諸如，Fab'、F（ab）$_2$、F（ab'）$_2$、dsFv雙特異性單鏈抗體（diabody）、Fc及Fd多肽片段。參見Scott, T.A. and Mercer, E.I., Concise Encyclopedia: Biochemistry and Molecular Biology （de Gruyter, 3d ed. 1997），以及Watson, J.D. et al., Recombinant

DNA （2d ed. 1992） （後文稱為“Watson”）。

抗體片段可以技藝中已知之任何方法製備。舉例而言，抗體片段可藉著切斷完整抗體而進行酶性或化學製備，或者其可由編碼該部分抗體序列之基因而進行重組製備。舉例而言，抗體之片段可藉著以肽酶進行消化切割而製備。舉例而言，胃蛋白酶可在鉸鏈區中於雙硫鍵以下之位置消化切割抗體以產生F（ab'）$_2$，其係一種Fab片段之二聚體，該Fab片段本身係由雙硫鍵結合V_H-C_H1之輕鏈。F（ab'）$_2$可在溫和條件下還原以破壞鉸鏈區之雙硫鍵，因而將該（Fab'）$_2$二聚體轉化成為Fab'單體。Fab'單體本質上係具有部分鉸鏈區之Fab片段。就關於抗體及抗體片段之更詳細敘述，參見，Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. （1993）。盡管各種抗體片段係藉由完整抗體之消化切割而定義。熟習技藝者將可明瞭，此等Fab'片段可藉由化學或使用重組DNA方法而重新合成。因此，該名辭亦包括藉由修飾全抗體而製備或是使用重組DNA方法而重新合成之抗體片段。

或者，該抗體片段可為全部或部分合成製備者。該抗體片段可視情況為單鏈抗體片段。或者，該片段可包含彼此連結之多鏈，例如，藉由雙硫鍵連結。該片段亦可視情況為多分子複合物。功能性之抗體片段一般而言將會包含至少約50個胺基酸，且更一般而言將會包含至少約200個胺基酸。

免疫球蛋白或抗體分子之Fc區域或蛋白域（亦稱為Ig Fc多肽或Fc多肽）大半對應於免疫球蛋白重鏈之恆定區，且係負責各種功能，包括抗體之效應子功能。舉例而言，IgG分子之Ig Fc區域包含免疫球蛋白域CH2及CH3以及導向進入CH2之N-端鉸鏈區。鉸鏈區係位於Fc及CH1間之重鏈部分，其含有重鏈間雙硫鍵，並給予抗體分子撓性。Fc區域之恆定域可與免疫系統之細胞作用。Fc受體係可結合抗體Fc區域之蛋白。其中一種IgG抗體類型之重要Fc受體家族包括Fc加瑪受體（FcγR）。抗體對於細胞上Fc受體之結合可中介諸多抗體功能。不同之

IgG亞型對於Fc加瑪受體具有不同之親和力。一般而言，IgG1及IgG3可以高於IgG2及IgG4之親和力結合該等受體。Fc受體表現於各種不同之細胞上，其包括，如，B細胞、單核細胞、樹狀細胞、嗜中性細胞及某些淋巴細胞。Ig Fc與其受體之結合可將此等效應子細胞帶至該經結合抗原之位點，最後造成信號傳導及免疫反應，包括B細胞活化、發炎反應、胞毒反應及吞噬反應。

Ig Fc融合物係一種分子，其包含以可操作之方式連結免疫球蛋白或抗體之Fc區域的一或多個多肽（或是一或多個小分子）。參見，如，Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol. 14:52-60。因此，Ig Fc融合蛋白係一種分子，其包含以可操作之方式連結Ig Fc區域的一或多種多肽。Ig Fc融合蛋白可包含，例如，抗體之Fc區域（其可協助效應子之功能及藥物動力學），以及受體蛋白或配位體蛋白或其他蛋白或其片段之結合區或結合域。該結合區或結合域可中介目標受體或配位體之辨識（相當於抗體之抗體可變區對於抗原之辨識）。Ig Fc區域可間接或直接連結一或多個多肽或小分子（融合配對物）。可使用各種技藝中已知且如下文詳述之連接子，使Ig Fc連接融合配對物以產生Ig Fc融合物。Ig Fc融合蛋白一般而言包含直接或間接共價連結至少一個多肽之Ig Fc區域，該多肽一般而言可結合目標配位體或受體。

單株或多株抗體可以技藝中已知之任何技術製備（參見，如，Kohler & Milstein, Nature 256:495 497 （1975）; Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 （1983）; Cole et al., pp. 77 96於Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy （1985））。可修改製備單鏈抗體之技術（美國專利第4,946,778號）以產生對於本發明多肽之抗體。此外，可使用轉基因小鼠或其他生物體，包括哺乳動物，以表現人類化之抗體。可使用噬菌體展示技術以辨識可專一結合所選抗原之抗體及雜聚性Fab片段（參見，如，McCafferty et al., Nature 348:552 554 （1990）; Marks et al.,

Biotechnology 10:779 783 （1992））。

名辭「抗原表位」係指可專一結合抗體部分之抗原決定區。抗原表位通常係由分子之化學活性表面群集所構成，諸如，胺基酸或糖側鏈，且通常具有特定之三維結構特性，以及特定之電荷特性。構形性及非構形性抗原表位之差異在於前者之結合會在變性溶劑之存在下喪失而後者不會。

兩分子（如，配位體及受體）間之「專一性結合親和力」意謂一分子對於另一分子之偏好結合。分子之結合一般而言係被視為具專一性，如其平衡結合常數（如，K_A）係約$1 \times 10^2\ M^{-1}$至約$1 \times 10^{13}\ M^{-1}$或以上，其包括約10^4至$10^{13}\ M^{-1}$、約10^6至$10^{12}\ M^{-1}$、約$10^8\ M^{-1}$至$10^{11}\ M^{-1}$或約10^8至$10^{10}\ M^{-1}$。抗原及抗體間結合作用之K_A值一般而言係介於自約$10^5\ M^{-1}$至約$10^{12}\ M^{-1}$，通常係約$10^7\ M^{-1}$至約$10^{11}\ M^{-1}$，且常係約$10^8\ M^{-1}$至約$10^{10}\ M^{-1}$。K_A（M^{-1}）係藉由計算k_a/k_d而判定，其中k_a係結合速率常數且k_d係解離速率常數。k_a及k_d之單位分別係$M^{-1}\ s^{-1}$及s^{-1}。平衡解離常數K_D係K_A之倒數。$K_D = k_d/k_a$。就反應A + B <=> AB而言（代表單一配位體對單一目標蛋白（如，受體）之結合），K_D等於（[A]・[B]）/[AB]。以測量結合親和力及/或分子結合性之既已熟知技術的非限制性實例包括，如，Biacore™技術（GE Healthcare），如本文他處所討論，等溫滴定微量熱法（isothermal titration microcalorimetry）（MicroCal LLC, Northampton, MA USA）、ELISA及螢光激活細胞分選（FACS）法。舉例而言，可使用FACS或其他分選法以選擇可專一結合相關結合配對成員（諸如，受體，如，可溶性受體）之分子群（諸如，例如，細胞表面展示性配位體）。配位體-受體複合物可由，如，螢光偵測及分選（如，藉著使該複合物與可辨識該複合物之螢光抗體反應）。集合可結合相關結合配對成員（如，受體）之目標分子，再在較低濃度受體之存在下進行再次分選。藉著在漸低濃度受體之存在下進行多輪之分選（例示性之濃度範圍係由10^{-6} M降至10^{-13} M，亦即，由1微莫耳濃度（μM）降至1納莫

耳濃度（nM）或是以下（如，10^{-11} M或10^{-12} M），根據該配位體-受體作用之性質而定），可分離出對於該受體具有專一結合親和力之目標分子群。

在指稱蛋白時，語句「專一（或選擇性）結合」抗體或是「專一（或選擇性）免疫反應」係指一種結合反應，其係該蛋白存在於異質性蛋白群及其他生物製劑中之判定指標。因此，在指定之免疫分析條件下，該等經指明之抗體可以背景值之至少兩倍結合特定蛋白，且不會以顯著之量實質上結合該樣本中之其他蛋白。抗體在此等條件下之專一性結合可能需要因其對於特定蛋白之專一性而選擇之抗體。可使用各種免疫分析形式以選擇可與特定蛋白專一免疫反應之抗體。舉例而言，其慣常使用固相ELISA免疫分析而選擇可與蛋白專一免疫反應之抗體（參見，如，Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual（1988），有關可用以判定專一免疫反應性之免疫分析形式及條件之敘述）。通常而言，專一性或選擇性之反應將係背景信號或雜訊之至少兩倍，且更一般而言係超過背景值之10至100倍。

名辭「細胞因子」包括，如，但不限於，間白素、干擾素（IFN）、趨化因子、造血生長因子、腫瘤壞死因子（TNF）、以及轉形生長因子。一般而言，此等細胞因子係小分子量之蛋白，其可調控免疫系統細胞之成熟、活化、增殖及分化。

名辭「篩選」一般而言係敘述一種流程，其可辨識本發明之最佳分子，諸如，如，包括，本發明之多肽，以及包含其之相關融合蛋白，以及編碼所有此等分子之核酸。可在選擇及篩選中使用各分子之數種特性，例如，各分子在試驗系統或是在試管中、活體外或活體內之應用中誘發或改變所欲免疫反應之能力。「選擇」係一種形式之篩選，其中可藉由選擇標記之表現同時達成辨識及物理分離，其在部分基因情形下，可在其他細胞死亡時容許表現該標記之細胞存活（或是相反情形）。篩選標記包括，例如，螢光素酶、β-半乳糖苷酶、以及綠色螢光

蛋白、反應受質及其類似者。另一種選擇方式涉及根據可偵測事件之物理分選，諸如，配位體與受體之結合、受質與酶之反應或任何其他能夠直接（如，藉由使用呈色性受質或配位體）或間接（如，藉著與呈色性次級抗體反應）產生可偵測信號之物理反應。以物理分選進行之選擇可以各種不同之方法達成，其包括，但不限於，如，全細胞或微滴形式之FACS。

由於在活體外研究初級免疫反應之限制，體內試驗係部份有用之篩選方法。在部分此等試驗中，其首先將本發明之聚核苷酸或多肽引入試驗對象體內（如，哺乳動物，諸如，動物），再接著藉由分析該經免疫動物體內之免疫反應類型（如，經免疫動物血清中之抗體生產，T細胞之增殖），或是藉由研究該經免疫動物體內經誘發免疫反應之品質或強度（如，經誘發之抗體效價水準），研究經誘發之免疫反應。

名辭「對象」在本文中包括，但不限於，生物或動物，包括哺乳動物及非哺乳動物。哺乳動物包括，如，但不限於，人類、非人類靈長類（如，狒狒、紅毛猩猩、猴、大猩猩）、小鼠、狗、豬、牛、山羊、貓、兔、大鼠、天竺鼠、倉鼠、馬、綿羊或其他非人類哺乳動物。非哺乳動物包括，如，但不限於，非哺乳動物無脊椎動物及非哺乳動物脊椎動物，諸如，鳥（如，雞或鴨）或是魚。

名辭「醫藥組合物」係指適用於在對象（包括動物或人類）體內之醫藥用途的組合物。醫藥組合物一般而言包含有效量之活性劑以及載體、賦形劑或稀釋劑。該載體、賦形劑或稀釋劑一般而言分別係醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑。

名辭「有效量」係指足以產生所欲結果之物質劑量或量。該所欲結果可包含在該劑量或量之接受者體內的客觀或主觀改善情形。舉例而言，該所欲結果可包含已投予特定抗原或免疫原（或其組合物）之劑量或量之對象體內免疫反應的可測量、可偵測或可試驗性誘發、促進、增強或調控。足以產生此種結果之免疫原的劑量或量可稱為「免疫原性」劑量或量。

「預防性處理」係一種處理，其係施用於未顯示疾病、病理或病症之徵兆或症狀，或是僅顯示其早期徵兆或症狀之對象，其中該處理係為預防或降低發展該疾病、病理或病症之風險而投予。預防性處理係作用為一種對抗疾病、病理或病症之防止性處理，或是可抑制或降低疾病、病理或病症進一步發展或增強之處理。「預防活性」係一試劑之活性，該試劑在施用於未顯示疾病、病理或病症之徵兆或症狀，或是僅顯示其早期徵兆或症狀之對象時，可預防或降低發展該疾病、病理或病症之風險。「具預防用途」之試劑（如，核酸或多肽）係指可用於預防疾病、病理或病症發展，或是可用於抑制或降低疾病、病理或病症進一步發展或增強之試劑。

「治療性處理」係一種處理，其係施用於顯示病理、疾病或病症之徵兆或症狀之對象，其中該處理係為減少或消除該等徵兆或症狀而投予。「治療活性」係一試劑之活性，該試劑在施用於具有病理、疾病或病症之徵兆或症狀之對象時，可減少或消除該等徵兆或症狀。「具治療用途」之試劑（如，核酸或多肽）意謂該試劑可用於減少、治療或消除疾病、病理或病症之徵兆或症狀。

一般而言，用於本文中之術語以及下述諸多用於細胞培養、分子遺傳學、分子生物學、核酸化學、以及蛋白化學中之實驗室流程皆係一般熟習技藝者所熟知且經常使用者。標準之技術，諸如述於Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual （2nd Ed.）, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 （後文稱為“Sambrook”）以及Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.予John Wiley & Sons, Inc.之合資企業（1994，增刊至1999）（後文稱為“Ausubel”）者，可用於重組核酸方法、核酸合成、細胞培養方法、以及轉基因之納入，如，電穿孔、注射、基因槍、經由皮膚印記、以及脂質轉染（lipofection）。

一般而言，寡核苷酸合成及純化步驟係根據說明書而進行。該等技術及流程一般而言係根據技藝中之習知方法以及本文件中所提供之各種概述性參考文獻而進行。其中之流程咸信為一般熟習技藝者所熟知，且係為讀者之方便而提供。

各種其他名辭係在本文中定義或以其他方式定性。

本發明之分子及方法

本發明提供用以治療免疫系統之疾病、病症及病況之分子及方法，其包括，如，其中需要調控免疫系統（如，T細胞相關性免疫反應）者。本發明之分子（如，本發明之多肽、本發明之複合物、本發明之可溶性融合蛋白、編碼此等多肽或融合蛋白之核酸）可用於治療其中需要免疫抑制之免疫系統疾病、病症及病況，其包括，如，但不限於，自體免疫疾病、病症及病況、免疫增生性疾病、移植物相關病症之治療，以及涉及由捐贈者至接受者之組織、細胞、器官或移植物之移植的治療方法，其中需要抑制接受者體內對抗捐贈者組織、細胞、器官或移植物之免疫反應。

在一態樣中，本發明提供新穎之突變CTLA-4分子，其相較於CTLA-4分子（諸如，可結合CD80及/或CD86之野生型人類CTLA-4多肽（「hCTLA-4」）或其片段，諸如人類CTLA-4之胞外域（「hCTLA-4 ECD」））具有改良特性。如下文所詳述，其使用各種誘變及篩選策略以製備及辨識可結合CD80及/或CD86之新穎突變CTLA-4分子。特定言之，其使用此等策略以製備及辨識相較於人類CTLA-4（「hCTLA-4」）具有對於CD80（B7-1）及/或CD86（B7-2）之改良結合性，及/或相較於hCTLA-4 ECD具有對於CD80及/或CD86之改良結合親和性的CTLA-4突變分子。結合表現於抗原呈遞細胞上之內源性CD80及/或CD86配位體的本發明突變CTLA-4分子可有效抑制或阻斷此等配位體與表現於T細胞表面之內源性CD28受體的作用。因此，由T細胞表面受體CD28與B7分子（亦即，CD80及

CD86)之作用所提供之對T細胞活化具重要性的共刺激信號受到抑制或阻斷。此等T細胞並未受到最適活化，並具有較低之增殖能力。

在其中CD80或CD86配位體與CD28受體間之信號傳導受到阻斷之情形下，T細胞並未受到最適刺激而成為具活性，並因此並未受到最適誘發而進行增殖。類似者，在其中CD80或CD86配位體與CD28受體間之信號傳導受到抑制之情形下，T細胞之活化及增殖亦受到抑制。在一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，其可作用為CTLA-4信號傳導之拮抗劑。在另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，其可作用為CD28信號傳導之拮抗劑，因而抑制或阻斷T細胞相關性免疫反應；此等分子可作用為免疫抑制劑。在又一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，其可結合CD80及CD86兩者，但其對CD86具有高於對CD80之較高結合性，並因而可對CD86相關性共刺激作用產生大於對CD80相關性共刺激作用之較大程度抑制。所有此等本發明之突變CTLA-4分子預期可用於治療其中需要免疫抑制或是免疫抑制可能具有效益之疾病、病症或病況。

一種人類CTLA-4-Ig融合蛋白以及一種特定之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（兩者皆係由Bristol-Myers Squibb Co.（Princeton, NJ）研發）已經顯示可有效治療某些免疫相關性疾病或病況。Orencia®融合蛋白（亦稱為阿巴西普（Abatacept）（“ABA”））（Bristol-Myers Squibb Co.（Princeton, NJ））係一種可溶性重組二聚體融合蛋白，其係由兩個相同之單體免疫球蛋白（Ig）融合蛋白構成，經由一個雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間形成。ORENCIA係Bristol-Myers Squibb Company之註冊商標。Orencia®二聚體之各個單體Ig融合蛋白係由以其C-端融合特定突變IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:186） N-端之人類CTLA-4胞外域（SEQ ID NO:159）構成。各個此種單體融合蛋白之完整多肽序列示於SEQ ID NO:164。Orencia®二聚體係在哺乳動物表

現系統中生產，且具有92 kDa之表觀分子量。咸信Orencia®二聚體之該兩個單體Ig融合蛋白係由單一雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在位於各個hCTLA-4-突變IgG1單體位置120之半胱胺酸殘基間形成，且在該兩個突變IgG1 Fc多肽間並未形成任何雙硫鍵。

Orencia®二聚體係一種選擇性共刺激調控劑，其可藉由結合CD80及CD86並因此阻斷其與CD28之作用而抑制T細胞活化。Orencia®二聚體目前已核准用於治療罹患中度至嚴重類風濕性關節炎（RA）之人類成人。其他有關Orencia®二聚體以及其臨床適應症及有效性之資訊在orencia.com及bms.com提供於全球資訊網。

如上所註，Orencia®二聚體之各個融合蛋白單體含有人類CTLA-4胞外域。人類CTLA-4係一種膜蛋白，其瞬時表現於T細胞上。WT全長hCTLA-4之全長蛋白序列示於SEQ ID NO:160，且編碼WT全長hCTLA-4之核酸序列示於SEQ ID NO:194。人類CTLA-4包括信號肽（SP）、胞外域（ECD）、穿膜域（TD）、以及胞質域（CD），以該順序共價連結（如，SP之C-端共價連結ECD之N-端，ECD之C-端共價連結TD之N-端，而TD之C-端共價連結CD之N-端）。WT hCTLA-4 ECD多肽一般而言包含全長hCTLA-4蛋白序列（SEQ ID NO:160）之殘基38-161，且一般而言長度為124個胺基酸殘基。此一hCTLA-4 ECD多肽序列示於SEQ ID NO:159。該全長hCTLA-4蛋白之信號肽（SP）（其一般而言包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-35或1-37）會在加工過程中受到切割。參見，如，Harper et al., J. Immunol. 147（3）:1037-1044 （1991）。包含hCTLA-4蛋白胺基酸殘基1-35或1-37之人類CTLA-4信號肽序列分別示於SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216。不論該信號肽序列係示於SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216者，當該信號肽受到切割時，該成熟hCTLA-4蛋白一般而言係以位在示於SEQ ID NO:160之全長hCTLA-4蛋白序列胺基酸位置38的甲硫胺酸殘

基起始。因此，即使該hCTLA-4信號肽序列係SEQ ID NO:182者（其包含hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基1-35），該所得之成熟分泌性hCTLA-4蛋白仍係以位在全長hCTLA-4蛋白位置38的甲硫胺酸起始。分別位於全長hCTLA-4蛋白位置36及37的離胺酸（K）及丙胺酸（A）並不存在於成熟hCTLA-4蛋白中，且其咸信在加工過程中自該成熟hCTLA-4蛋白切割。成熟hCTLA-4蛋白序列之胺基酸殘基因此一般而言係將位在全長hCTLA-4蛋白位置38的甲硫胺酸殘基編號為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號；因此，組胺酸殘基佔據成熟hCTLA-4蛋白之胺基酸位置2等。Orencia®二聚體之各個單體包括示於SEQ ID NO:159之hCTLA-4 ECD多肽序列。在全長WT hCTLA-4蛋白中，該信號肽包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-37，該胞外域（ECD）包含胺基酸殘基38-161，該穿膜域（TD）包含胺基酸殘基162-182，且該胞質域（CD）包含胺基酸殘基183-223。hCTLA-4蛋白之成熟域（MD）一般而言包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基36-223，或者在部分情形下，包含胺基酸殘基37-223或38-223。

SEQ ID NO:194之核酸包含編碼信號肽序列之核酸序列（核苷酸殘基1-111）、編碼hCTLA-4 ECD之核酸序列（核苷酸殘基112-483）、編碼hCTLA-4穿膜及胞質域之核酸序列（核苷酸殘基484-669）；最後3個C-端核苷酸係TGA中止密碼子。

貝拉西普（Belatacept）（亦稱為“LEA29Y-Ig”、“LEA-Ig”或“A29YL104E-Ig”）（Bristol-Myers Squibb Co.（Princeton, NJ））係一種可溶性重組二聚體蛋白，其係由兩個相同之Ig融合蛋白構成，經由一個雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在各個單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間形成。各個單體融合蛋白係由以其C-端融合特定突變IgG1多肽N-端之突變CTLA-4胞外域多肽構成。該突變CTLA-4 ECD之多肽序列與WT人類CTLA-4 ECD具有兩個突變之差異，特定言之係位置29處以酪胺酸取代丙胺酸（縮寫為取代A29Y）以及位置104

處以麩醯胺取代白胺酸（縮寫為取代L104E），其中該人類CTLA-4 ECD中之胺基酸殘基係以位於N-端之甲硫胺酸表示胺基酸位置1而編號。各個貝拉西普之單體包括示於SEQ ID NO:186之突變IgG1 Fc多肽序列；此突變IgG1 Fc多肽與包括於Orencia®融合蛋白中之突變IgG1 Fc多肽相同。貝拉西普單體融合蛋白因此與各個Orencia®單體融合蛋白具有兩個胺基酸之差異。貝拉西普中各個單體融合蛋白之多肽序列示於SEQ ID NO:166。名稱「LEA29Y-Ig」因此反映，貝拉西普二聚體之各個單體融合蛋白係由突變CTLA-4 ECD構成，其與人類CTLA-4 ECD多肽序列具有L104E及A29Y兩個突變之差異。相較於Orencia®二聚體，貝拉西普已經顯示可以約4倍較高之結合性結合CD86，並以約2倍較高之結合性結合CD80 （Larson et al., Amer. J. Transplant. 5:443-453, 444 （2005）。相較於Orencia®二聚體，貝拉西普已經顯示可以最多約10倍較高之強度在活體外抑制T細胞活化，並具有相較於Orencia®蛋白之改良體內免疫抑制強度，如以其抑制T細胞相關性抗體反應之較高能力以及其在涉及非人類靈長類之臨床試驗中對於腎同種移植存活之改良延長所顯示。相同文獻。其他有關貝拉西普以及其臨床適應症及有效性之資訊在bms.com提供於全球資訊網。

在一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD86之結合性大於Orencia®二聚體（二聚體hCTLA-4-Ig）對CD86之結合性。本發明亦提供突變之CTLA-4分子，包括新穎之可溶性重組二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD80之結合性約等於或大於Orencia®二聚體對CD80之結合性。在又另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括新穎之可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其相較於Orencia® （阿巴西普）具有抑制一或多種免疫反應（如，T細胞相關性免疫反應）之較大能力。相較於Orencia®二聚體而具有一或多種改良特性之本發明突變CTLA-4分子預期較為強效，且因此可在治療其中需

要免疫抑制之疾病、病症或病況中較Orencia®二聚體更為有效、更為有用、更為有利，包括Orencia®二聚體已核准治療及/或已經顯示可提供臨床效益之該等疾病、病症或病況，諸如，免疫疾病，包括，如，類風濕性關節炎及牛皮癬。

在又另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD86之結合性大於貝拉西普（LEA29Y-Ig）對CD86之結合性。本發明亦提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD86之結合性大於貝拉西普對CD86之結合性。在另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其相較於貝拉西普具有抑制一或多種免疫反應（如，T細胞相關性免疫反應）之較大能力。相較於貝拉西普而具有一或多種改良特性之本發明突變CTLA-4分子預期較貝拉西普強效，且因此可在治療其中需要免疫抑制之疾病、病症或病況中較貝拉西普更為有效、更為有用、更為有利，包括貝拉西普融合蛋白已經顯示可提供臨床效益之該等疾病、病症或病況，諸如，非人類靈長類之腎同種移植存活。

可使用該等用於涉及類似對象之Orencia®臨床試驗中的方法，判定本發明分子（諸如，本發明之突變CTLA-4分子（如，下文詳述之本發明突變CTLA-4 ECD多肽或可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白））在以特定方式（如，腸外、靜脈內或皮下投藥）投與特定劑量該分子之具有免疫疾病或病症（如，類風濕性關節炎、多發性硬化、牛皮癬等）的對象體內之安全性、耐受性、藥物動力學、免疫原性、以及臨床功效。參見，如，全球資訊網址bms.com及orencia.com。舉例而言，可使用類似該等用於涉及RA病患之Orencia®臨床試驗中的方法，評估本發明突變CTLA-4分子（如，可溶性突變CTLA-4-Ig）在具有類風濕性關節炎（RA）之對象體內減少關節損傷之進展、減輕RA之徵兆及症狀（包括減輕疼痛）的有效程度。

可使用相當該等用於涉及類似對象之貝拉西普臨床試驗中的方法，判定本發明分子（如，下文詳述之突變CTLA-4 ECD多肽或可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白）在其中需要免疫抑制（如，進行來自捐增者之組織、細胞、器官或移植物之移植的對象）且其經特定方式（如，腸外、靜脈內或皮下投藥）投與特定劑量該分子的對象體內之安全性、耐受性、藥物動力學、免疫原性、以及臨床功效。參見，如，全球資訊網址bms.com。舉例而言，可使用類似該等用於涉及進行腎臟移植病患之貝拉西普臨床試驗中的方法，評估本發明突變CTLA-4分子（如，可溶性突變CTLA-4-Ig）在進行腎臟移植之受捐病患體內減少腎臟移植排斥的有效程度。

本發明分子及方法以及本發明之其他態樣在下文以額外之詳情進行討論。

本發明之多肽

本發明提供新穎之多肽，集合稱為「本發明多肽」。名辭「本發明多肽」係意欲包括本文所揭示多肽序列之變體及/或衍生物。本發明之多肽包括重組非天然或突變CTLA-4多肽，其可結合CD80及/或CD86及/或可抑制或壓抑免疫反應。本發明之多肽包括包含本發明突變CTLA-4多肽之重組融合蛋白，並包括此等融合蛋白之單體及二聚體形式。本發明之多肽包括包含一或多個本發明突變CTLA-4多肽之多聚體。本發明亦包括包含一或多個本發明突變CTLA-4多肽之複合物。部分之本發明多肽係可溶性多肽。舉例而言，如下文更為詳細敘述者，本發明包括可溶性之融合蛋白，其包含與可增進突變CTLA-4 ECD多肽之溶解度的不同多肽（諸如，如，免疫球蛋白多肽，諸如，如，Ig Fc多肽）連結之突變CTLA-4 ECD多肽。

如下文詳細討論者，在本發明之一態樣中，其使用各種誘變及篩選策略以製備及辨識可結合CD80及/或CD86之新穎多肽。特定言之，其使用此等策略以製備及辨識具有改良能力結

合CD80及/或CD86之新穎多肽，包括對於CD80及/或CD86具有改良結合親和性或結合性之新穎突變CTLA-4多肽。結合表現於抗原呈遞細胞上之CD80及/或CD86配位體的本發明多肽可干擾或阻斷此等配位體與表現於T細胞表面之CD28受體的作用。因此，由T細胞表面受體CD28與B7分子（亦即，CD80及CD86）之作用所提供之T細胞共刺激信號受到抑制或阻斷。此等多肽咸信可用於其中免疫系統（如，T細胞反應）之調控具有效益的疾病、病症及病況之預防性及治療性處理。

突變CTLA-4多肽

在一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列（如，SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID

NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72及SEQ ID NO:73）具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86或是CD80及/或CD86之多肽片段（或是其任一或兩者之ECD），及/或可調節或調控免疫反應。部分此等多肽，諸如示於SEQ ID NOS:1-73之各者，係敘述為分泌或成熟突變CTLA-4 ECD多肽。該示於SEQ ID NOS:1-73之各者中的突變CTLA-4 ECD多肽並不包括信號肽；其已在加工過程中受到切割，因而產生該成熟或分泌多肽。CD80之多肽片段可包含，如，CD80多肽之胞外域多肽，諸如，如，人類CD80 ECD多肽（“hCD80 ECD”）。CD86之多肽片段可包含，如，CD86多肽之胞外域多肽，諸如，如，人類CD86 ECD多肽（“hCD86 ECD”）。部分此等多肽可結合哺乳動物CD80及/或CD86或是其多肽片段，諸如，如，哺乳動物CD80或CD86 ECD。部分此等多肽可結合WT人類CD80（“hCD80”）及/或WT人類CD86（“hCD86”）或是其多肽片段，諸如，如，hCD80 ECD或hCD86 ECD。在部分此等方法中，至少一種免疫反應受到壓抑或抑制。

部分此等多肽具有對於hCD80或其片段(如，hCD80 ECD)之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4 ECD多肽對於hCD80或其片段之結合親和力或結合性。預測之全長hCD80多肽序列示於SEQ ID NO:195，其包括信號肽、ECD、穿膜域、以及胞質域，以該順序共價連結。該信號肽包含SEQ ID NO:195之胺基酸殘基1-34，該ECD包含胺基酸殘基35-242，該穿膜域包含胺基酸殘基243-263，且該胞質域包含胺基酸殘基264-288。hCD80 ECD之多肽序列示於SEQ ID NO:174。示於SEQ ID NO:173之核酸序列編碼WT人類CD80信

號肽（位在N-端）以及人類CD80 ECD。

部分此等多肽具有對於hCD86或其片段(如，hCD86 ECD)之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4 ECD多肽對於hCD86或其片段（如，ECD）之結合親和力或結合性。預測之全長hCD86多肽序列示於SEQ ID NO:175，其包括信號肽、ECD、穿膜域、以及胞質域，以該順序共價連結，而編碼該預測全長hCD86多肽序列之例示性核酸示於SEQ ID NO:176。hCD86 ECD之多肽序列示於SEQ ID NO:180。部分此等多肽具有對於hCD86之結合親和力或結合性，其係至少約等於或大於LEA29Y ECD多肽(具有示於SEQ ID NO:168之序列)對於hCD86之結合親和力或結合性。對hCD86或hCD86 ECD之親和力或結合性分別至少等於或大於hCTLA-4 ECD或LEA29Y ECD （亦稱為“A29YL104E”或“L104EA29Y” ECD)對hCD86或hCD86 ECD之親和力或結合性的例示性本發明多肽包括，如，但不限於，包含與SEQ ID NOS:4、10-12、15、17、24、26、28、35及61中任一者之序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列者。參見，如，實例4中之表5。表5中所提出之數據反映出代表性CTLA-4-Ig與單體CD86 ECD間之單體性作用。如未另有明示，名辭LEA29Y （或是A29YL104E或L104EA29Y）係指LEA29Y ECD （或是A29YL104E或L104EA29Y ECD)。

部分此等多肽包含多肽序列，具有與人類CTLA-4胞外域之胺基酸長度約為相等之胺基酸長度。此等多肽可敘述為突變CTLA-4 ECD多肽。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其長度係約110個胺基酸至約138個胺基酸殘基、約112至約136個胺基酸殘基、約114至約134個胺基酸殘基、約116至約132個胺基酸殘基、118至約130個胺基酸殘基、約119至約129個胺基酸殘基、約120至約128個胺基酸殘基、121至約127個胺基酸殘基、約122至約126個胺基酸殘基、約123至約125個胺基酸殘基。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含一序列，

其長度係124個胺基酸殘基。例示性之多肽包括，如，但不限於，包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列的多肽，其中此種多肽可結合CD80及/或CD86 （或是其任一或兩者之ECD）。

部分此等上述之多肽（包括，如，該等分離或重組多肽，其各包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，且其可結合CD80及/或CD86 及/或其ECD）具有調節或調控免疫反應之能力。各種免疫反應中之一或多者可由此等本發明之多肽調節或調控，包括，但不限於，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2等之生成）、各種活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體等）、發炎分子之合成或生成、發炎、關節腫脹、關節壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。在部分情形下，相較於hCTLA-4或hCTLA-4 ECD，此種多肽具有壓抑或抑制至少一種此等免疫反應之較大能力。

舉例而言，部分此等多肽可在活體外分析中抑制T細胞活化或T細胞增殖。下文所示之實例4-9，舉例而言，說明包含代表性突變CTLA-4 ECD多肽序列之本發明代表性融合蛋白（諸如該等述於本文中者）在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等多肽可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投與治療或預防有效量之至少一種此等多肽。部分此等多肽預期可用於各種應用之中，包括，如，但不限於，用於治療其中需要免疫調控之疾病、病症及病況的預防或治療方法，如下文詳細討論者。此等多肽預期可用於在對象體內抑制或壓抑免疫反應之預防及/或治療方

法（如，在其中需要免疫抑制或免疫壓抑之哺乳動物（諸如，如，人類）免疫系統疾病或病症的體內治療中）、抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及其他述於本文他處之方法。

此外或是或者，部分此等多肽具有壓抑或抑制免疫反應之能力，其係至少等於或大於hCTLA-4或hCTLA-4 ECD壓抑或抑制一或多種類型免疫反應之能力。舉例而言，部分此等多肽具有在活體外及/或活體內之分析及/或應用中（諸如該等述於上文並在下文詳述者）抑制T細胞活化或增殖之能力，其係至少約等於或大於hCTLA-4或hCTLA-4 ECD在此等應用中抑制T細胞活化或增殖之能力。此外，部分此等多肽具有抑制或壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、T細胞相關性抗體反應），其係大於LEA29Y多肽（一種特定之突變CTLA-4 ECD，包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列）抑制或壓抑免疫反應之能力。下文所示之實例4-9，舉例而言，相對包含hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽之融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力而比較包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。此等分子預期可在各種治療應用中具有效益用途，包括自體免疫疾病及病症之治療，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之預防及治療方法。

部分此等多肽在彼此之間可有，如，胺基酸缺失、添加及/或取代之差異。胺基酸取代可為保守性或非保守性取代。參見，如，標題為「序列變異」之部分。

在另一態樣中，本發明亦提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合單體hCD80或單體hCD86或是其任一或兩者之ECD。部分此等多肽具有（1） 對於單體hCD86之結合親和力，其係約等於或大於單體hCTLA-4或LEA29Y多

肽對於單體hCD86或其ECD之結合親和力，以及（2） 對於單體hCD80之結合親和力，其係約等於或大於單體hCTLA-4對於單體hCD80之結合親和力。LEA29Y多肽包含SEQ ID NO:168之多肽序列。同時，部分此等多肽較單體hCTLA-4、單體hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽具有抑制一或多種本文所述免疫反應之較高能力（如，T細胞之活化/增殖、細胞因子之合成/生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、抗膠原Ab之生成及/或T細胞相關性Ab反應）。

本發明亦提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽具有對於hCD86 ECD或hCD80 ECD之結合親和力，其係分別約等於或大於hCTLA-4 ECD對於hCD86 ECD或hCD80 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有對於hCD86 ECD之結合親和力，其係大於hCTLA-4 ECD（SEQ ID NO:159）或LEA29Y多肽（SEQ ID NO:168）對於hCD86 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有對於hCD80 ECD之結合親和力，其係大於hCTLA-4 ECD對於hCD80 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有抑制免疫反應之能力，在部分情形下係抑制一或多種免疫反應（包括述於上文及全文中者）之相較於hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽的較大能力。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之CTLA-4多肽變體，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD之多肽序列具有不超過15個胺基酸殘基、不超過14個胺基酸殘基、不超過13個胺基酸殘基、不超過12個胺基酸殘基、不超過11個胺基酸殘基、不超過10個胺基酸殘基、不超過9個胺基酸殘基、不超過8個胺基酸殘基、不超過7個胺基酸殘基、不超過6個胺基酸殘基、不超過5個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 其中位在該CTLA-4 ECD多肽

序列（SEQ ID NO:159）位置24、30、32、39、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104或106之胺基酸殘基，在該CTLA-4多肽變體序列中經不同之胺基酸殘基取代，其中該CTLA-4多肽變體之胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號，且其中該CTLA-4多肽變體具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域或片段的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。部分此等變體具有一或多個（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個）胺基酸取代，選自由A24E、A24S、S25A、G27H、K28N、T30N、T30D、T30A、V32I、Q39K、Q39E、D41G、D41N、D41S、A50M、A50G、M54K、M54E、M54V、G55E、G55K、N56D、D63K、S64P、I65S、I65F、I65T、S70F、M85A、M85V、M85A、L104E、L104D及I106M、I106F及I106L所組成之群。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過12個胺基酸殘基（如，不超過2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個胺基酸殘基）之差異，以及（b）在選自由對應SEQ ID NO:159胺基酸位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70及104之胺基酸殘基位置所組成之群處包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個胺基酸取代，其中該突變CTLA-4多肽之胺基酸位置係根據SEQ ID NO:159而編號，且其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域或片段的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。此等位置中之例示性胺基酸取代包括，但不限於，WT hCTLA-4 ECD中胺基酸殘基之保守性胺基酸取代A24S/E （亦即，A24S或A24E）、T30N/D/A （亦即，T30N或T30D或T30A）、V32I/L/M/V、A50M/G、M54E/V/K、G55E/K/R、N56D/A、S64P/M/C、I65S/T/F/V、S70F/Y/W、L104E/M或是其任何取代組合。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽（如，突變

CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基之差異，以及（b）其中在該多肽序列中於胺基酸位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73之多肽）對應位置之胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應。在部分情形下，該多肽與所選多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73）具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，但佔據胺基酸殘基位置41、50、54、55、56、64、65、70及85中一或多者之胺基酸係與包括於所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73者）該位置之胺基酸殘基相同，且其未經刪除或經另一胺基酸取代。部分此等多肽包含多肽序列，其與所選多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，且其在胺基酸殘基位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106中之一或多者包括與位於所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基。此等多肽可在未經指明為具有與所選序列相同之胺基酸的位置（或多個位置）具有胺基酸缺失、添加及/或胺基酸取代而不同於所選多肽序列。其包括具有對於hCD86或其片段（如，hCD86 ECD）之結合親和力或結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽對於hCD86或其片段（如，ECD）之結合親和力或結合性的此等多肽。部分此等多肽具有對於hCD80或其片段（如，hCD80 ECD）之結合親和力，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4 ECD多肽對於hCD80或其片段之結合親和力或結合性。部分此等多肽包含多肽序列，其具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之長度，如，118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125

或124個胺基酸殘基之長度。

部分此等多肽可抑制各種免疫反應中之一或多者，包括，但不限於，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。相較於hCTLA-4、hCTLA-4 ECD多肽或LEA29Y多肽，部分此等多肽具有抑制一或多種此等免疫反應之較大能力。舉例而言，部分此等多肽可在活體外分析中抑制T細胞活化或T細胞增殖。實例4-9，例如，相對包含hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽之融合蛋白而比較包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等多肽可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投與治療或預防有效量之至少一種此等多肽。部分此等多肽預期可用於各種應用之中，包括，如，但不限於，用於治療其中需要抑制免疫反應之免疫系統疾病、病症及病況的預防或治療方法，其包括，如，用於治療自體免疫疾病及病症之預防及/或治療方法，抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及其他述於本文他處之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽序列具有不超過10個胺基酸殘基、不超過9個胺基酸殘基、不超過8個胺基酸殘基、不超過7個胺基酸殘基、不超過6個胺基酸殘基、不超過5個胺基酸殘基、不超過4個胺基酸殘基、不超過3個胺基酸殘基、不超過2個胺基酸殘基或不超過1個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及（b）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘

基位置，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應），諸如，在下文詳述之活體外或活體內方法及/或分析中。部分此等多肽包含多肽序列，其長度係124個胺基酸殘基。部分此等多肽包含2、3、4、5或6個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159所示多肽序列中選自由胺基酸殘基位置50、54、55、56、64、65、70或85所組成之群的位置。部分此等多肽尚包含胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置104及/或30之胺基酸殘基位置。部分此等多肽包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置70 （視情形為S70F）、位置64（視情形為S64P）、位置50（視情形為A50M/G，如，A50M、A50G）、位置54（視情形為M54K/V，如，M54K）、位置65（視情形為I65S）、位置56 （視情形為N56D）、位置55 （視情形為G55E/K，如，G55E、G55K）、位置85 （視情形為M85A）及/或位置24 （視情形為A24E/S，如，A24E）。任何此等多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104 （視情況係L104E/D，如，L104E）、位置30 （視情況係T30N/D/A，如，T30N、T30D或T30A）及/或位置32（視情況係V32I）。在部分情形下，該多肽包含一或多個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此等多肽具有對於CD86 （如，hCD86）或CD86 ECD （如，hCD86 ECD）之結合親和力，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4 ECD對CD86或CD86 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有對於CD80 （如，hCD80）或CD80 ECD（如，hCD80 ECD）之結合親和力，其係分別大於單體hCTLA-4

ECD對CD80或CD80 ECD之結合親和力。

部分此等多肽具有壓抑或抑制一或多種免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成等），諸如，在試管中及/或在活體中。部分此等多肽可以大於hCTLA-4、hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽之程度抑制一或多種此等免疫反應。此等多肽預期可在各種治療應用中具有效益用途，包括用於治療自體免疫疾病及病症之預防及/或治療方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之預防及/或治療方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含一或多個取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或可在活體外分析及/或活體內方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、關節腫脹或壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應等）。此等多肽預期可用於治療罹患其中免疫抑制療法可具有效益之疾病、病症及病況的病患，其包括，如，用於治療自體免疫疾病及病症之治療及預防方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之預防及治療方法。

本發明亦提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的任何多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii） 位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中

該多肽可結合hCD80及/或hCD86或是其任一者之胞外域，及/或可在活體外分析及/或活體內方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、關節或壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應等）。部分此等多肽包含相對於所選序列之下列一或多者：位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基、位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基、位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基、位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基、位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基、位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基、位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基、以及位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。此等多肽預期可在各種應用中具有效益用途，包括用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

舉例而言，在一非限制性之態樣中，本發明包括一種分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其包含（i）與SEQ ID NO:24多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii）位在對應於SEQ ID NO:24多肽序列位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可在活體外及/或活體內抑制免疫反應。部分此等多肽包含相對SEQ ID NO:24多肽序列之下列至少一者：位在位置24之麩胺酸殘基、位在位置30之天冬醯胺殘基、位在位置32之異白胺酸殘基、位在位置50之甲硫胺酸殘基、位在位置54之離胺酸殘基、位在位置55之麩胺酸殘基、位在位置56之天冬胺酸殘基、位在位置64之脯胺酸殘基、位在位置65之絲胺酸殘基、以及位在位置104之麩胺酸殘基。

本發明亦包括一種分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4

ECD多肽），其可結合hCD80及/或hCD86 （以及/或是其任一或兩者之ECD），及/或可抑制免疫反應（如上所述），如，在活體外及/或活體內，其中該多肽包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號。該多肽可進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。此等多肽預期可用於各種應用中，包括用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞、組織或移植物移植排斥之方法。

本發明亦包括一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可在活體外及/或活體內抑制如上所述之免疫反應。該多肽可包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。此等多肽預期可用於各種應用中，包括用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i） 與選自由SEQ ID NOS:36-46及55所

組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%或99%序列相同性，以及（ii） 位在該所選多肽序列胺基酸位置55之麩胺酸殘基，其中該多肽可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應。可受到抑制之免疫反應包括，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此種多肽序列可進一步包含位於胺基酸位置70之苯丙胺酸殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置64之脯胺酸殘基及/或位於位置30之天冬醯胺殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置50之甲硫胺酸殘基及/或位於位置54之離胺酸殘基。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i） 與選自由SEQ ID NOS:28、30、36-46、55-57及65-73所組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%或99%序列相同性，以及（ii） 位在該所選多肽序列胺基酸位置55之麩胺酸殘基，其中該多肽可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應，諸如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此種多肽序列可進一步包含位於胺基酸位置70之苯丙胺酸殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置64之脯胺酸殘基及/或位於位置30之天冬醯胺殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置50之甲硫胺酸殘基及/或位於位置54之離胺酸殘基。

上述之任何本發明多肽可進一步包含可協助該多肽分泌之肽。因此，在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含（a） 如上所述之任何多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），以及（b） 可協助該經表現之多肽自宿主細胞分泌之肽。該肽視情況係一種信號肽。該信號肽之C-端一般而言共價

連結該多肽之N-端。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-35、1-36或1-37的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

上述之任何本發明多肽可進一步包含穿膜域及/或胞質域。因此，在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含（a） 上述之任何本發明多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），以及（b） 穿膜域。此種蛋白可視情況進一步包含如上所示之信號肽，其中該信號肽之C-端共價連結該本發明多肽之N-端。該信號肽之C-端一般而言共價連結該穿膜域之N-端。該穿膜域之C-端一般而言共價連結該胞質域之N-端。在部分情形下，該穿膜域包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基162-182的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，該胞質域包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基183-223的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。任何上述之多肽可包含一或多個經糖基化或聚乙二醇化之胺基酸殘基。

本發明亦包括一種分離或重組之多肽多聚體，其包含二或多個多肽，其中至少一個該多聚體之諸等多肽係如本文所述之本發明突變CTLA-4多肽（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）。此種多聚體包含至少一個本發明之多肽，且可進一步包含並不一定須為本發明多肽之至少一個其他多肽。舉例而言，該多聚體可包含至少一個本發明之多肽，以及至少一個其他多肽，其可為，如，野生型多肽（如，hCTLA-4 ECD或hCTLA-4-Ig），及或至少一種其他突變多肽（諸如，非本發明

多肽之突變多肽）。該多聚體（或多聚體多肽）中之部分或全部多肽可彼此相同，或者，在部分情況下，該多聚體中之全部多肽可彼此不同。在部分情況下，該多肽多聚體係包含兩個本發明多肽之二聚體，該等本發明多肽可視情況為相同之多肽（亦即，同質二聚體）或是不同之多肽（亦即，異質二聚體）。在部分情況下，該多肽多聚體係包含四個本發明多肽之四聚體。該四聚體可包含四個相同之多肽（亦即，同質四聚體），或是四個本發明多肽之任何組合，以使至少一個多肽不與其他三個多肽相同（亦即，異質四聚體）。本發明亦包括包含四個相同WT CTLA-4 ECD多肽（如，hCTLA-4 ECD）或四個相同WT CTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-Ig）之四聚體。在部分情況下，該多聚體可結合CD80及/或CD86（以及/或是其任一或兩者之ECD），及/或可在活體外及/或活體內之方法中壓抑或抑制免疫反應（如，T細胞之增殖或活化、細胞因子之生成等）。相較於hCTLA-4或hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2或Orencia®蛋白），部分此等多聚體具有在活體外及/或活體內壓抑或抑制免疫反應之較大能力。該等多聚體之諸等多肽可彼此連結，諸如，藉由共價連結，諸如，經由一或多個多肽中之一或多個半胱胺酸間之雙硫鍵。

部分此等本發明之四聚體包含類似抗體之結構，但其中抗體之可變域各經任何本文所述本發明突變CTLA-4 ECD多肽置換。抗體之重鏈包含一重鏈可變域（V_H），融合至一免疫球蛋白（Ig） CH1域（如，IgG2 CH1），其又融合至一鉸鏈。該鉸鏈融合至Ig CH2域（如，IgG2 CH2），其又融合至Ig CH3域（如，IgG2 CH3）。抗體之輕鏈包含一輕鏈可變域（V_L），融合至Ig C κ（C_κ）或C λ（C_λ）域。該兩條重鏈及兩條輕鏈藉由一或多個經由該等重及輕鏈中之半胱胺酸殘基所形成之雙硫鍵而彼此共價連結。本發明包括突變CTLA-4四聚體，其中該等重及輕鏈之可變域各經本發明之突變CTLA-4 ECD多肽置換。因此，此種四聚體包含兩條輕鏈及兩條重鏈。各條輕鏈

包含突變CTLA-4 ECD多肽，融合至Ig C_κ或C_λ域。各條重鏈包含突變CTLA-4 ECD，融合至Ig CH1域（如，IgG2 CH1），其又融合至一鉸鏈。該鉸鏈融合至Ig CH2域（如，IgG2 CH2），其又融合至Ig CH3域（如，IgG2 CH3）。該兩條重鏈及兩條輕鏈藉由一或多個經由該等重及輕鏈中之半胱胺酸殘基所形成之雙硫鍵而彼此共價連結。此種四聚體可敘述為CTLA-4-Ig四聚體。用以建構此種CTLA-4-Ig四聚體之方法係為已知，且可由熟習技藝者明瞭。包含一CD4多肽且可中和原代HIV第1型分離物之四聚體CD4-Ig建構物述於Allaway, G.P. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 11（5）:533-9 （1995）。該四聚體可包含四個相同之突變CTLA-4 ECD多肽，或是四個本發明突變CTLA-4 ECD多肽之任何組合，以使至少一個突變CTLA-4 ECD不與其他三個突變CTLA-4 ECD多肽相同。部分此等四聚體可以相較於hCTLA-4 （或hCTLA-4-Ig）之較高結合親和力結合CD80及CD86。部分此等四聚體壓抑或抑制免疫反應；在部分情形下，此種四聚體相較於hCTLA-4或hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2或Orencia®）具有在活體外分析或活體內應用中壓抑或抑制免疫反應（如，T細胞之增殖或活化、細胞因子之生成等）之較大能力。本發明之多聚體預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

本發明亦包括一種分離或重組之複合物多聚體，其包含二或多個複合物，其中至少一個該等複合物係本發明之複合物，其包含本發明之突變CTLA-4多肽（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）。該多聚體中之部分或全部複合物可彼此相同，或者該多聚體中之全部複合物可彼此不同。在部分情況下，該複合物多聚體係包含兩個複合物之二聚體，或是包含四個複合物之四聚體。部分此等複合物多聚體可結合CD80及CD86（或是其任一或兩者之ECD），及/或可在活體外及/或活體內壓抑或抑制免疫反應。多聚體中之諸等複合物分子可彼此連結，諸

如，藉由共價連結，諸如，經由一或多個複合物中之一或多個半胱胺酸間之雙硫鍵。

本發明包括一種分離或重組之多肽二聚體，其包含任何兩個上述之本發明多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），其中該二聚體具有對於人類CD86或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD86或其胞外域之結合性。

本發明包括分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個上述之本發明多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），其中該二聚體具有對於hCD80或其ECD之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）之二聚體對於hCD80或其ECD之結合性。舉例而言，在一非限制性之態樣中，該二聚體可包含兩個多肽，其中各多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，且各多肽可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應。在另一非限制性之態樣中，該二聚體可包含兩個多肽，其中各多肽與hCTLA-4 ECD之多肽序列（SEQ ID NO:159）具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置；且該多肽視情況尚包含取代L104E，且各多肽可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應。

在部分情形下，該二聚體具有對於hCD80或其ECD之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽之二聚體對於hCD80或其ECD之結合性。在部分情形下，該二聚體具有對於hCD86或其ECD之結合性，其係分別大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體對於hCD86或其ECD之結合性，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。在部分情形下，該二聚體分別係以小於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽

之二聚體自結合之hCD86或其ECD解離之速率而自結合之hCD86或其ECD解離。在部分情形下，該二聚體分別係以小於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體自結合之hCD86或其ECD解離之速率而自結合之hCD86或其ECD解離，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

在部分情形下，該二聚體分別係以大於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽之二聚體與hCD86或其ECD結合之速率而與hCD86或其ECD結合。在部分情形下，該二聚體分別係以大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體與hCD86或其ECD結合之速率而與hCD86或其ECD結合，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

在部分情形下，此種包含突變CTLA-4 ECD之二聚體相較於包含兩個人類CTLA-4胞外域或兩個LEA29Y多肽之二聚體具有抑制免疫反應（如，T細胞之增殖或活化、細胞因子之生成等）之較大能力。

部分此等二聚體具有小於包含兩個hCTLA-4 ECD或兩個LEA29Y多肽之二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。部分此等二聚體具有小於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D），各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

相較於相同效價之全長hCTLA-4多聚體（亦即，包含相同數目全長hCTLA-4多肽之多聚體，部分包含至少兩個本發明多肽之此等多聚體（如，包含兩個本發明突變CTLA-4 ECD多肽之二聚體）具有抑制免疫反應之增進能力。相較於相同效價之hCTLA-4 ECD多聚體（亦即，包含相同數目hCTLA-4 ECD多肽之多聚體，部分包含至少兩個本發明多肽之此等多聚體具有抑制免疫反應之增進能力。

上述之任何本發明多肽可進一步包含可增進溶解度之其他多肽序列，諸如，免疫球蛋白（Ig）多肽序列，因而形成，

如，可溶性融合蛋白，其如下文詳細討論。多肽多聚體之各個多肽可進一步包含可增進溶解度之其他多肽序列，諸如，Ig多肽序列，因而形成，如，可溶性融合蛋白。因此，舉例而言，如上所述包含二或多個本發明多肽之二聚體的各個多肽可進一步包含可增進溶解度之其他多肽序列，諸如，Ig多肽序列，因而形成，如，可溶性融合蛋白。

此等本發明之多肽及二聚體預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

如先前所討論，成熟hCTLA-4蛋白序列一般而言係以位在示於SEQ ID NO:160之全長hCTLA-4蛋白序列胺基酸位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟hCTLA-4蛋白序列之胺基酸殘基一般而言係將此甲硫胺酸殘基編號為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。

部分之本發明突變CTLA-4多肽（包括單體以及二聚體融合蛋白以及多具性多肽）在對應位於典型hCTLA-4/hB7-2結合界面（參見，如，Schwartz et al., Nature 410:604-608 （2001））外之成熟hCTLA-4蛋白序列胺基酸位置的胺基酸位置包括至少一個胺基酸取代，其包括，但不限於，例如，胺基酸位置24、41、54、55、56、64、65、70及85中之任一者。一般而言，一般熟習技藝者將不會預期，位在上述位置（24、41、54、55、56、64、65、70及/或85）之胺基酸取代，或是選自位置24、41、54、55、56、64、65、70及85之群的一或多個取代之任何組合，可具有增進hCTLA-4對hB7-2之結合親和力或結合性的能力，具有抑制CD28-陽性細胞與B7-2-陽性細胞作用之增進能力，或是提供相較於，如，hCTLA-4 ECD或hCTLA-4-Ig之壓抑或抑制免疫反應的較大能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之合成或生成、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應及其類似者）。同時，一般熟習技藝者將不會預期，位在任何上述位置（24、41、

54、55、56、64、65、70及/或85）或是此等位置之任何組合的本文所述特定胺基酸取代或是特定胺基酸取代之組合，可具有增進hCTLA-4對hB7-2之結合親和力或結合性的能力，具有抑制CD28-陽性細胞與B7-2-陽性細胞作用之增進能力，或是提供相較於，如，hCTLA-4 ECD或hCTLA-4-Ig之壓抑或抑制免疫反應的較大能力。

突變CTLA-4融合蛋白

本發明亦提供新穎之分離或重組融合蛋白，其包含第多肽（其係至少一種上文及全文所述之本發明多肽（諸如，本發明之突變CTLA-4多肽，諸如，如，突變CTLA-4 ECD多肽））融合第二多肽，因而形成融合蛋白。該第二多肽一般而言可協助該該第多肽之分泌或表現。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括該等包含辨識為SEQ ID NOS:1-73之序列者。本發明包括融合蛋白，其包含免疫球蛋白（Ig）域（諸如，Ig Fc域）融合或連富於本發明之生物活性分子部分（諸如，本發明之突變CTLA-4多肽）。本發明之融合蛋白咸信可作為預防及/或治療劑，用於各種其中免疫調控及/或免疫抑制具有效益之免疫系統疾病及病症及病況、用於診斷分析、以及用以製備具有免疫調控及/或免疫抑制活性或特性之藥物或試劑，如本文他處詳細討論。

包含突變CTLA-4多肽及Ig多肽（如，Ig Fc）之本發明融合蛋白一般而言稱為CTLA-4-Ig融合蛋白。任何此等本發明之融合蛋白，包括下文及實例中所詳述之單體及二聚體本發明融合蛋白，可包含，諸如，如，Ig Fc多肽作為Ig多肽，如本文以及上及下文她處所述。該第二多肽可直接連結該第多肽。舉例而言，該第二多肽（如，Ig多肽，諸如，Ig Fc多肽）之N-端可與該本發明第多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽）之C-端直接共價融合。或者，該第二多肽可間接連結該第多肽，諸如，其中在該第一及第二多肽間包括一包含1、2、3、4、5、6、7、8、

9或10個或以上胺基酸殘基之連接子胺基酸序列的情形下。在其中包括連接子之情形下，該胺基酸連接子序列之N-端一般而言係與該第多肽（如，突變CTLA-4 ECD）之C-端共價融合，而該第二多肽（如，Ig多肽，諸如，Ig Fc）之N-端一般而言則與該胺基酸連接子序列之C-端共價融合。

在部分情形下，該第二多肽包含Ig多肽之至少一部份，諸如，如，Ig重鏈恆定區之一或多個蛋白域。該第二多肽可包含Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。在部分情形下，該第二多肽包含WT Ig多肽之Fc域（亦即，WT Ig Fc多肽），諸如，如，WT人類Ig多肽之Fc域（亦即，WT人類Ig Fc多肽）。如他處所論，該Ig多肽可來自各種生物種，包括，如，哺乳動物，如，人類、小鼠、非人類靈長類（如，猴、大猩猩）、貓、狗、馬等，且可來自各種類型（如，IgG、IgM、IgE等）及亞型（如，對IgG而言包括IgG1、IgG2、IgG4等），且可包含任何此種Ig多肽之Fc域或部分。此等各種生物種之Ig多肽的胺基酸及核酸序列係技藝中所已知。

在一態樣中，本發明提供新穎之分離或重組融合蛋白，其各包含上述之本發明分離或重組突變CTLA-4多肽（如，突變CTLA-4 ECD)），其在C-端直接或間接（經由胺基酸連接子序列）共價連結或融合Ig Fc多肽（亦即，Ig多肽之Fc域）之N-端。任何本發明之融合蛋白，包括下文及實例中所詳述之本發明單體及二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，可包含如本文以及上及下文他處所述之Ig Fc多肽。該Ig Fc多肽一般而言包含Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。該Ig Fc多肽可衍生自各種生物種，包括，如，人類、小鼠、靈長類等，且可包含野生型Ig Fc多肽（如，WT IgG1、IgG2或IgG4）。例示性之人類IgG Fc多肽包括，如，但不限於，人類IgG1、人類IgG2、人類IgG4等。例示性人類IgG1 Fc之多肽序列示於SEQ ID NO:185。例示性人類IgG2 Fc多肽之多肽序列分別示於SEQ ID NO:184及218。或者，該Ig Fc多肽可包含突變Ig多肽。舉例而言，在突

變CTLA-4-Ig融合蛋白中可包含其中一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸（如，絲胺酸殘基）取代之突變IgG1 Fc，因而消除兩個Ig鏈間所形成之一或多個雙硫鍵，或是其中一或多個脯胺酸殘基已經另一胺基酸（如，脯胺酸殘基）取代者，以降低效應功能（較低之Fc受體結合）。例示性突變IgG1 Fc多肽之多肽序列示於SEQ ID NO:186。本發明包括分離或重組之融合蛋白，諸如，突變CTLA-4-Ig二聚體或突變CTLA-4-Ig單體，其包含至少一種上述之重組突變CTLA-4多肽，其在C-端連結重組Ig Fc多肽（亦即，Ig多肽之Fc域）之N-端，該Ig Fc多肽包含一胺基酸序列，與選自由SEQ ID NOS:184 （人類IgG2 Fc多肽）、185 （人類IgG1 Fc多肽）、186 （突變IgG1 Fc多肽）及218 （無C-端離胺酸（K）殘基之人類IgG2 Fc 多肽）所組成之群的胺基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。

在一態樣中，本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之預測多肽序列包含下列節段：信號肽序列，其可協助該融合蛋白之分泌（如，hCTLA-4信號肽（SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216））；突變CTLA-4 ECD多肽，該突變CTLA-4 ECD多肽一般而言但非必須包含自約118至130個胺基酸殘基之長度，且通常係約124個胺基酸殘基；以及Ig Fc多肽。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括該等述於上及下文者。在部分情形下，在該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端與該人類Ig Fc多肽之N-端間並不包括胺基酸連接子序列；亦即，在該突變CTLA-4-Ig融合蛋白中，該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端係直接共價融合該Ig Fc多肽之N-端。然而，如需要，突變CTLA-4-Ig可在該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端與該人類Ig Fc多肽之N-端間包括連接子（如，一或多個胺基酸殘基）。本發明預測性單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白之信號肽一般而言在加工過程中自該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端切除，而因此本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之成熟或分泌形式通常並不包括信號肽序列。包含兩個此種單體突

變CTLA-4-Ig融合蛋白之融合蛋白二聚體一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係形成於（1） 其中一個此種單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及IgG2 Fc中之半胱胺酸殘基，以及（2） 第二（其一般而言但並非必須相同）單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及IgG2 Fc中之半胱胺酸殘基之間。

本發明包括二聚體融合蛋白（亦稱為融合蛋白二聚體），其各包含兩個本發明之單體融合蛋白。該二聚體可包含兩個相同或不同之單體融合蛋白。該二聚體融合蛋白係藉著兩個單體融合蛋白間之連結（或多個連結）而形成。包含兩個此種單體融合蛋白之二聚體融合蛋白一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在一單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間產生。因此，在部分情形下，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白係以包含兩個本發明單體融合蛋白之二聚體形式表現。

在一態樣中，本發明提供包含兩個單體融合蛋白之分離或重組二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其中各個單體融合蛋白包含如上及下文所詳述之本發明突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端融合Ig Fc多肽。該二聚體係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在一單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及Ig Fc中的半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及Ig Fc中的半胱胺酸殘基間產生。該兩個單體融合蛋白一般而言但並非必須包含相同之序列。分泌或成熟形式之突變CTLA-4-Ig融合蛋白並不包括信號肽，因信號肽一般而言在加工過程中自該蛋白之N-端切除。預測之突變CTLA-4-Ig融合蛋白包括信號肽，其C-端一般而言共價連結該突變CTLA-4-Ig蛋白之N-端。各個成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體之N-端一般而言包含甲硫胺酸（M）。

作為一種非限制性之實例，本發明提供包含兩個單體CTLA-4-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白，其中各個單體突變

CTLA-4-Ig融合蛋白包含突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端融合Ig Fc多肽之N-端，其中該突變CTLA-4 ECD多肽包含選自SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列。在部分此等二聚體融合蛋白中，該兩個單體融合蛋白係由共價雙硫鍵彼此共價連接，該雙硫鍵係在細胞加工過程中，於位在各個CTLA-4突變ECD多肽序列中位置120之半胱胺酸殘基間形成。或者，或是此外，該兩個單體融合蛋白係由共價雙硫鍵彼此共價連接，該雙硫鍵係在該第一單體融合蛋白之Ig Fc多肽中的一或多個半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白之Ig Fc多肽中的一或多個半胱胺酸殘基間產生。該等單體融合蛋白可由多個雙硫鍵彼此連結（如，一、二、三、四或多個雙硫鍵），該雙硫鍵係在細胞加工過程中，於存在於各個Ig Fc多肽中的半胱胺酸殘基間產生。在部分情形下，各個單體融合蛋白係由相同之Ig Fc多肽構成（如，人類IgG2 Fc，如述於，如，SEQ ID NO:184或218者），且共價雙硫鍵可在細胞加工過程中，於位在各個Ig Fc多肽中相當位置之半胱胺酸殘基間產生。

例示性之突變CTLA-4 ECD多肽係D3-12突變CTLA-4 ECD多肽，其包含SEQ ID NO:11之多肽序列。例示性之本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白係D3-12突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:218之人類IgG2 Fc多肽之N-端，因而形成示於SEQ ID NO:205之D3-12-IgG2融合蛋白，或者其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:184之人類IgG2 Fc多肽之N-端，因而形成示於SEQ ID NO:74之D3-12-IgG2融合蛋白。SEQ ID NO:74之序列與SEQ ID NO:205具有一個殘基的差異—亦即，在SEQ ID NO:74之C-端存在一個額外的離胺酸殘基。我們在以液相層析質譜分析（LCMS）或是類似者所進行之實驗中發現，在CHO細胞中藉由轉染包含編碼突變CTLA-4 ECD （諸如，如，示於SEQ ID NO:11之D3-12 ECD多肽序列）及示於SEQ ID NO:184之hIgG2 Fc多肽的核苷酸序列之表現載體而製備之

成熟CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言並不包括該預期之C-端離胺酸（K）殘基，如根據示於SEQ ID NO:184之hIgG2 Fc序列而可預期者。

舉例而言，SEQ ID NO:153之核苷酸序列編碼hCTLA-4信號肽及D3-12-IgG2融合蛋白，且其在其C-端包括中止密碼子TAA。密碼子AAA （其編碼離胺酸殘基）在SEQ ID NO:153之序列中緊鄰位於該中止密碼子TAA之前。藉著將包含核苷酸序列SEQ ID NO:153之表現載體轉染進入CHO細胞中而產生之成熟D3-12-IgG2融合蛋白的預測多肽序列示於SEQ ID NO:74。該信號肽不存在於該成熟形式之D3-12-IgG2融合蛋白中，因其已在加工過程自該成熟融合蛋白切除。然而，我們發現，根據LCMS分析，在此種情形下，該成熟D3-12-IgG2一般而言並不包括該預測之C-端離胺酸，如根據SEQ ID NO:153之核苷酸序列而可預期者。相反的，由此種方法產生之所得成熟D3-12-IgG2多肽序列係示於SEQ ID NO:205者。咸信該IgG2 Fc多肽之C-端離胺酸係在加工過程或是在分泌之前受到切割。

咸信使用另一哺乳動物細胞系，藉著將此種包含核苷酸序列SEQ ID NO:153之表現載體轉染進入此種哺乳細胞（如，CHO細胞或類似者）而進行之D3-12-IgG2蛋白製備，將會因為類似之加工或分泌機制而產生缺乏預測C-端離胺酸殘基之類似D3-12-IgG2融合蛋白。

二聚體D3-12-IgG2融合蛋白包含兩個此種D3-12-IgG2單體，其以一或多個雙硫鍵彼此連結，該等雙硫鍵係在細胞加工過程中，藉著在半胱胺酸殘基間產生共價雙硫鍵而形成。D3-12-IgG2及本發明之其他融合蛋白可藉由，如，使用示於實例3之方法而製備。舉例而言，可將編碼D3-12多肽之核酸序列（如，SEQ ID NO:90）選殖進入IgG2 Fc融合載體，以該載體轉染哺乳動物細胞，再表現該所得之融合蛋白（一般而言係二聚體形式），純化，並進行評估，如實例3所述。

另一例示性之突變CTLA-4 ECD多肽係D3-54突變

CTLA-4 ECD多肽，其包含SEQ ID NO:36之多肽序列，而例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含D3-54突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:218之hIgG2 Fc多肽之N-端（無C-端離胺酸），因而形成示於SEQ ID NO:211之D3-54-IgG2融合蛋白，或者其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:184之hIgG2 Fc多肽之N-端（無C-端離胺酸），因而形成示於SEQ ID NO:197之D3-54-IgG2融合蛋白。如上所論，實驗分析指出，在CHO細胞中所製備之成熟D3-54-IgG2融合蛋白一般而言並不包括該預期之C-端離胺酸殘基。咸信該hIgG2 Fc之C-端離胺酸係在加工過程或是在分泌之前受到切割，因而造成示於SEQ ID NO:211之D3-54-IgG2融合蛋白序列。同時，如上所註記，D3-29-IgG2可使用實例3之方法製備。二聚體D3-54-IgG2融合蛋白包含兩個D3-54-IgG2單體，其以一或多個雙硫鍵彼此連結，該等雙硫鍵係在細胞加工過程中，藉著在半胱胺酸殘基間產生共價雙硫鍵而形成。示於SEQ ID NO:201之核酸序列編碼示於SEQ ID NOS:197及211之融合蛋白。

本發明之其他融合蛋白可類似包含連結或融合hIgG2（SEQ ID NO:218或84）之突變CTLA-4 ECD多肽。例示性之本發明成熟突變CTLA-4-IgG2融合蛋白包括，如，SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222各者之多肽序列。SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之多肽序列各包括一個C-端離胺酸殘基；此一C-端離胺酸殘基一般而言係在加工過程或是在分泌之前受到切割，因而分別造成示於SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及221之無C-端離胺酸的多肽序列。

圖10係顯示例示性本發明突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之例示性構形或結構的圖式。其圖示兩個相同之單體突變CTLA-4-IgG2融合蛋白，其各包含一個成熟突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端共價連結人類IgG2 Fc多肽之N-端。各個人類IgG2 Fc多肽包括人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域。其亦顯

示存在於該ECD與Ig Fc多肽接合處之例示性胺基酸殘基。根據該突變CTLA-4 ECD多肽序列及/或Ig多肽序列，位在此等組成份接合處之胺基酸殘基可各有不同。此種二聚體突變CTLA-4-IgG2融合蛋白係由至少一個雙硫鍵之形成而產生，該雙硫鍵係在位於該兩個突變CTLA-4-IgG2融合蛋白單體中類似位置之半胱胺酸殘基間形成。該等潛在涉及兩單體間雙硫鍵形成之半胱胺酸（C）殘基以星號標記。各個單體融合蛋白之信號肽一般而言係在細胞加工過程中受到切割，並因此該分泌（成熟）融合蛋白一般而言並不包括該信號肽序列。該人類IgG2多肽之多肽序列（其包含人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域）示於SEQ ID NO:184。在另一態樣中，該人類IgG2多肽之多肽序列（其包含人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域）示於SEQ ID NO:218；在此情形下，該IgG2多肽相較於SEQ ID NO:184之序列並不包括C-端離胺酸（K）殘基。

可使本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之特性（其在他處詳述）與一或多種參照Ig融合蛋白之特性進行比較，諸如，如，hCTLA-4-IgG1、hCTLA-4-IgG2、Orencia® 融合蛋白及LEA29Y-Ig。可進行比較之特性包括，如，結合CD80及/或CD86（以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig）之能力，及/或抑制或壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖，細胞因子之生成等）。成熟之hCTLA-4-IgG1融合蛋白一般而言在溶液中係以hCTLA-4-IgG1融合蛋白二聚體之形式存在，其包含兩個相同之單體hCTLA-4-IgG1蛋白，各個單體hCTLA-4-IgG1融合蛋白包含連結IgG1 Fc多肽之hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）。成熟之hCTLA-4-IgG2融合蛋白一般而言在溶液中係以hCTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體之形式存在，其包含兩個相同之單體hCTLA-4-IgG2蛋白，各個單體hCTLA-4-IgG2融合蛋白包含連結IgG2 Fc多肽之hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）。成熟之Orencia®融合蛋白係一種融合蛋白二聚體，其包含兩個相同之單體Orencia®融合蛋白，各個單體融合蛋白

（SEQ ID NO:164）包含連結特定突變IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:186）之hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）。成熟之LEA29Y-Ig融合蛋白一般而言在溶液中係以LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體之形式存在，其包含兩個相同之單體LEA29Y-Ig融合蛋白，各個單體LEA29Y-Ig融合蛋白（SEQ ID NO:166）包含連結特定突變IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:186）之突變CTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:168）。咸信Orencia®二聚體之該兩個融合蛋白單體係由單一雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在位於各個hCTLA-4-突變IgG1單體位置120之半胱胺酸殘基間形成，且在該兩個突變IgG1 Fc多肽間並未形成任何雙硫鍵。

部分之突變CTLA-4融合蛋白可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）。部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白可結合CD80-Ig融合蛋白及/或CD86-Ig融合蛋白。例示性之CD80-Ig融合蛋白包括hCD80-mIg融合蛋白（SEQ ID NO:225），其包含連結小鼠Ig Fc多肽之人類CD80 ECD；以及hCD80-hIgG1融合蛋白（SEQ ID NO:171），其包含連結人類IgG1 Fc多肽之hCD80 ECD。例示性之CD86-Ig融合蛋白包括hCD86-mIg融合蛋白（SEQ ID NO:226），其包含連結小鼠Ig Fc多肽之hCD86 ECD （SEQ ID NO:180）；以及成熟之hCD86-hIgG1融合蛋白（SEQ ID NO:178），其包含連結人類IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:185）之hCD86 ECD （SEQ ID NO:180）。編碼hCD86-mIg及hCD80-mIg之例示性核酸序列分別示於SEQ ID NOS:227及228。

在一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白，其包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，以及（b） Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86，以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

該Ig Fc多肽可包含多肽序列，其與選自SEQ ID NO:184、185、186及218之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，多肽（a）之C-端係共價連結Ig Fc多肽（b）之N-端。部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白可結合哺乳動物CD80及/或CD86 （如，hCD80及/或hCD86），以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig融合蛋白。CD80-Ig可包含，如，連結Ig Fc之人類CD80 ECD （如，hCD80-Ig）。在一具體實例中，hCD80-Ig係連結人類Ig Fc之人類CD80 ECD（如，hCD80-hIg）；在另一具體實例中，hCD80-Ig係連結小鼠Ig Fc之人類CD80 ECD （如，hCD80-mIg）。在一具體實例中，hCD86-Ig係連結人類Ig Fc之人類CD86 ECD （如，hCD86-hIg）；在另一具體實例中，hCD86-Ig係連結小鼠Ig Fc之人類CD86 ECD （如，hCD86-mIg）。部分此等融合蛋白具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制或壓抑各種免疫反應之一或多者的能力，諸如，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）或是發炎分子之誘發、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此等融合蛋白預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療免疫系統疾病及病症（如，自體免疫疾病）之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法，如下文所討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體，其包含兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成。各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體包含：（a） 突變CTLA-4 ECD多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，以及（b） Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該融合蛋白二聚體可

結合CD80及/或CD86，以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。在部分情形下，多肽（a）之C-端係共價連結或融合Ig Fc多肽（b）之N-端。該Ig Fc多肽可包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NO:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，該融合蛋白二聚體係藉由共價雙硫鍵而形成，該雙硫鍵係位在各個突變CTLA-4 ECD多肽序列位置120之半胱胺酸殘基間，或是位在對應於各個突變CTLA-4 ECD多肽序列中相對示於SEQ ID NO:159之hCTLA-4 ECD多肽的位置120者。部分此等融合蛋白具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制或壓抑各種免疫反應之一或多者的能力，諸如，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）或是發炎分子之誘發、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此等融合蛋白二聚體預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療免疫系統疾病及病症（如，自體免疫疾病）之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法，如下文所討論。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體具有對於hCD86或hCD86 ECD之結合親和力，其係分別等於或大於hCTLA-4 ECD及LEA29對於hCD86或hCD86 ECD者。參見，如，實例4之表5。存在於此等二聚體及單體融合蛋白中之突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之胺基酸長度。舉例而言，部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其長度係約110至138、112至136、114至134、116至132、118至130、119至129、120至128、121至127、122至126或是123至125個胺基酸殘基。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含具有124個胺基酸殘基之序列。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括，如，但不限於，該等包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少

95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列者，其中此種突變CTLA-4 ECD多肽可結合CD80及/或CD86（或是其任一或兩者之ECD），及/或具有抑制免疫反應之能力。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體具有對於hCD86及/或hCD86-Ig之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig對於hCD86及/或hCD86-Ig之結合性。部分此等融合蛋白二聚體具有對於hCD86及/或hCD86-mIg之結合性，其係2-10倍（2x-10x），5-10倍（5x-10x），10-20倍（10x-20x），20-40倍（20x-40x），或是超過40倍（>40x）大於Orencia®二聚體對於hCD86及/或hCD86-mIg之結合性。參見，如，下文表3中之例示性本發明二聚體融合蛋白。或者或是此外，部分此等融合蛋白二聚體具有對於hCD80及/或hCD80-Ig之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig對於hCD80及/或hCD80-Ig之結合性。部分此等融合蛋白二聚體具有對於hCD80及/或hCD80-mIg之結合性，其係0.5-2倍（0.5x-2x），2-4倍（2x-4x），或是超過2倍（>2x）大於Orencia®二聚體對於hCD86及/或hCD86-mIg之結合性。參見，如，下文表4中之例示性本發明二聚體融合蛋白。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體分別係以小於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig自結合之hCD86及/或hCD86-Ig解離之速率而自結合之hCD86及/或hCD86-Ig解離。部分此等融合蛋白分別係以至少等於或大於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig與hCD86及/或hCD86-Ig結合之速率而與hCD86及/或hCD86-Ig結合。就部分此等融合蛋白二聚體而

言，該在CD86 （或CD86-Ig）與本發明融合蛋白二聚體間之結合反應的平衡解離常數(K_D)係小於該在CD86（或CD86-Ig）與hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig二聚體間之結合反應的平衡解離常數（K_D）。參見，如，表3中之例示性本發明融合蛋白二聚體。就部分此等融合蛋白二聚體而言，該在CD80（或CD80-Ig）與本發明融合蛋白二聚體間之結合反應的平衡解離常數（K_D）係約等於或小於該在CD80 （或CD80-Ig）與hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體或LEA29Y-Ig二聚體間之結合反應的平衡解離常數（K_D）。參見，如，表4中之例示性本發明融合蛋白二聚體。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體具有抑制或壓抑免疫反應之能力（如，抑制T細胞之活化或增殖，抑制細胞因子之生成等），其係分別約等於或大於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig二聚體抑制或壓抑該免疫反應之能力。舉例而言，部分此等融合蛋白二聚體可在活體外之分析中抑制T細胞之活化或T細胞之增殖。下文所示之實例4-9，舉例而言，說明包含代表性突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明融合蛋白二聚體在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等二聚體可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投予治療或預防有效量之至少一種該二聚體。部分此等融合蛋白二聚體預期可用於各種應用之中，包括，如，但不限於，用於在罹患其中需要免疫抑制之免疫系統疾病或病症（如，自體免疫疾病）的對象體內抑制或壓抑免疫反應之預防及/或治療方法，以及用以抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞或器官移植排斥之方法。

部分此等二聚體具有調控或抑制經由CD28之信號傳導的各異能力，因其具有對於CD80及CD86之不同比較性結合性。

此等二聚體可用於其中需要對T細胞反應進行差異操縱之應用中，包括用於治療免疫系統疾病及病症之治療及預防方法，諸如，如，免疫不全疾病及病症（如，RA、MS、牛皮癬等）。具有部分上述差異CD80/CD86結合性及免疫抑制特性之包含本發明多肽的例示性二聚體融合蛋白示於實例4。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有壓抑或抑制免疫反應之能力，其係分別約等於或大於hCTLA-4蛋白或hCTLA-4-Ig二聚體壓抑或抑制一或多種類型免疫反應之能力。舉例而言，部分此等二聚體具有在活體外及/或活體內之分析及/或應用中抑制T細胞之活化或增殖的能力，諸如該等述於上及下文之分析及/或應用，其係至少約等於或大於hCTLA-4蛋白或hCTLA-4-Ig二聚體（如，Orencia®、hCTLA-4-IgG2二聚體或hCTLA-4-IgG1二聚體）在此等應用中抑制T細胞之活化或增殖的能力。此外，部分此等二聚體具有抑制或壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、T細胞相關性抗體反應），其係大於LEA29Y-Ig二聚體抑制或壓抑免疫反應之能力。實例4-9，例如，相對二聚體hCTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig在活體外抑制T細胞增殖之能力而比較包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明二聚體融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。參見，如，下文之表6-9。部分此等二聚體同時具有結合hCD80及/或hCD86 （或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig）之能力，以及在活體外及/或活體內之分析及/或應用中抑制或壓抑免疫反應之能力，諸如該等述於上文且在下文詳述者（如，其中投予治療或預防有效量之至少一種此等二聚體之活體內方法）。部分此等二聚體具有對於hCD80及/或hCD86 （或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig）之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig （如，hCTLA-4-IgG2、Orencia®）或二聚體LEA29Y-Ig對於hCD80及/或hCD86 （或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig）之結合性，並具有抑制免疫反應之能力，其係至少

等於或大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2、Orencia®）或二聚體LEA29Y-Ig抑制免疫反應之能力。此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體預期可用於各種應用之中，包括，如，用以治療免疫系統疾病、病症、疾病況之預防及/或治療方法，如下文所詳細討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個相同之單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%之相同性，其中該二聚體可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力，包括該等述於上文並在下文進一步敘述者。示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之各個多肽序列係在其C-端融合IgG2 Fc多肽之N-端的成熟突變CTLA-4 ECD，且各個此種序列可被稱為突變CTLA-4-Ig融合蛋白。SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222各者之多肽序列係與SEQ ID NOS:205-214、219及221相同，除外SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222各者在其C-端包括一個離胺酸。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白單體，其包含多肽序列，與包含SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之胺基酸殘基1-351的多肽序列具有至少90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%之相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力，包括該等

述於上文並在下文進一步敘述者。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個相同之單體融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與包含SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之胺基酸殘基1-351的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力，包括該等述於上文並在下文進一步敘述者。

亦提供一種突變之單體CTLA-4-Ig融合蛋白，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該單體融合蛋白可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力。部分此等融合蛋白單體及二聚體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力，包括，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之此種二聚體融合蛋白之病患體內，如下文所詳細討論）。此等融合蛋白單體及二聚體預期可用於各種應用之中，包括用以治療免疫系統疾病之治療及/或預防方法，包括下文所討論者。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域多肽），

其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，且其中在該多肽序列中於胺基酸位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73之多肽）對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2） Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86 （或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記或是發炎分子之誘發、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應等），如下文所詳細討論。本發明亦包括如上所述之分離或重組單體融合蛋白，其可結合CD80及/或CD86 （或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在試管中或活體內誘發免疫反應。在該融合蛋白二聚體中，該兩個單體融合蛋白（如，突變CTLA-4-Ig單體）視情況可由經由各單體中半胱胺酸殘基形成之一或多個雙硫鍵而彼此共價連結，且該兩個單體一般而言係彼此相同。在部分情形下，在此種融合蛋白二聚體或單體中之突變CTLA-4 ECD多肽與所選多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73）具有不超過6個胺基酸殘基之差異，但佔據位置41、50、54、55、56、64、65、70及85中之胺基酸係與包括於所選多肽序列該位置之胺基酸殘基相同，亦即，在此種位置之胺基酸殘基不可經刪除或取代。在此種融合蛋白中之部分此等CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其與所選多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其在位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106包括與位於所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基。此等CTLA-4 ECD多肽可與所選多肽序列具有胺基酸缺失、添加及/或取代之差異。胺基酸取代可為保守性或非保守性取代。參見，如，「序列變異」章節。部分此等二聚體融合蛋白具有對於hCD86或hCD86-Ig之結合性，其係分別至

少約等於或大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig、二聚體LEA29Y-Ig或Orencia®蛋白對於hCD86或hCD86-Ig之結合性。部分此等單體融合蛋白具有對於hCD86、hCD86-Ig或hCD86 ECD之結合親和力或結合性，其係分別至少約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於hCD86、hCD86-Ig或hCD86 ECD之結合親和力或結合性。或者或是此外，部分此等二聚體融合蛋白具有對於hCD80或hCD80-Ig之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4或hCTLA-4-Ig對於hCD80之結合性。或者或是此外，部分此等單體融合蛋白具有對於hCD80、hCD80-Ig或hCD80 ECD之結合親和力或結合性，其係分別至少約等於或大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於hCD80、hCD80-Ig或hCD80 ECD之結合親和力或結合性。在部分情形下，在此種融合蛋白二聚體或單體中之突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之長度，如，自約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。該Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc）之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。該Ig Fc多肽可包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列（如，SEQ ID NO:184、185、186及218之任一者）具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體或單體可抑制各種免疫反應中之一或多者，其包括，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）或是發炎分子之誘發、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig或二聚體LEA29Y-Ig之抑制一或多種此等免疫反

應的較大能力。實例4-9，舉例而言，相對於二聚體hCTLA-4-Ig或二聚體LEA29Y-Ig之能力，說明包含突變CTLA-4 ECD多肽之代表性本發明二聚體融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等突變CTLA-4-Ig單體具有相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig之抑制一或多種此等免疫反應的較大能力。部分此等單體及二聚體可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投與治療或預防有效量之至少一種此等多肽。此等融合蛋白預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療其中免疫抑制可能具有效益之疾病、病症或病況，諸如，用於治療自體免疫疾病及病症之預防及/或治療方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 突變CTLA-4胞外域（ECD）多肽，其包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，且（b） 在對應於相對SEQ ID NO:159多肽序列之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置包含至少一個胺基酸取代；以及（2） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應等），如下文所詳述。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。在部分情形下，CD80係hCD80，且CD86係hCD86。在該融合蛋白二聚體中，該兩個單體融合蛋白（如，

突變CTLA-4-Ig單體）係視情形藉著經由各單體中半胱胺酸殘基之一或多個雙硫鍵而彼此共價連結，且該兩個單體一般而言係彼此相同。該Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc）之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。該Ig Fc多肽可包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

部分此等融合蛋白二聚體或單體包含突變之CTLA-4 ECD多肽，其包含多肽序列，具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之長度，如，118-130、119-129、120-128、121-127、122-126或123-125個胺基酸殘基之長度。在此種融合蛋白二聚體或單體中之部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其長度係124個胺基酸殘基。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含2、3、4、5或6個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159所示序列中選自由位置50、54、55、56、64、65、70或85所組成之群的位置。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽尚包含胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置104及/或30的位置。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置70（視情形為S70F）、位置64（視情形為S64P）、位置50（視情形為A50M）、位置54 （視情形為M54K/V，如，M54K）、位置65 （視情形為I65S）、位置56 （視情形為N56D）、位置55 （視情形為G55E）、位置85 （視情形為M85A） 及/或位置24 （視情形為A24E/S，如，A24E）。任何此等突變CTLA-4 ECD多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104 （視情況係L104E/D，如，L104E）、位置30 （視情況係T30N/D/A，如，T30N、T30D或T30A）及/或位置32 （視情況係V32I）。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含

至少一個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含2、3、4、5或6個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有對於CD86（如，hCD86）或二聚體CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白或二聚體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80（如，hCD80）或二聚體CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80（如，hCD80）或單體CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig（如，單體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之至少一種此等突變CTLA-4-Ig二聚體之病患體內）抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力，包括該等述於上文及本文全文中者（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應）。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig （如，二聚體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度抑制一或多種此等免疫反應。部分此等突變CTLA-4-Ig單體可以相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig之較大程度抑制一或多種此等免疫反應。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種應用之中具有效益用途，包括用以治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域），其包含多肽序列，其（i） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，以及（ii） 在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置包括苯丙胺酸殘基，以及（2） Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc），其中該融合蛋白二聚體可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是具有在活體外及/或活體內抑制免疫反應之能力。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80（如，hCD80）及/或CD86（如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。在部分情形下，該Ig Fc多肽包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。該Ig Fc多肽之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連

接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。

在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽相對於該所選多肽序列包含下列之一或多者：位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基、位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基、位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基、位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基、位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基、位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基、位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基、以及位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。舉例而言，在此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其包含（i） 與SEQ ID NO:24多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii） 位在對應於SEQ ID NO:24多肽序列位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86（以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），及/或可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應。在此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含相對SEQ ID NO:24多肽序列之下列一或多者：位在位置24之麩胺酸殘基、位在位置30之天冬醯胺殘基、位在位置32之異白胺酸殘基、位在位置50之甲硫胺酸殘基、位在位置54之離胺酸殘基、位在位置55之麩胺酸殘基、位在位置56之天冬胺酸殘基、位在位置64之脯胺酸殘基、位在位置65之絲胺酸殘基、以及位在位置104之麩胺酸殘基。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有對於CD86 （如，hCD86）或二聚體CD86-Ig （如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白或二聚體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80 （如，hCD80）或二聚體

CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig或Orencia®蛋白對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig對於CD86或CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80（如，hCD80）或CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之集合親和力或結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之至少一種此等突變CTLA-4-Ig二聚體之病患體內）抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原Ab生成、T細胞相關性Ab反應）。部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig（如，二聚體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。部分此等突變CTLA-4-Ig單體可以相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種用以治療其中免疫抑制治療將具有效益之疾病或病症之治療及/或預防方法中具有效益用途，其包括，如，用以治療自體免疫疾病之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在又另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融

合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號；以及（2） Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc），其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86 （以及/或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應等），如下文詳細討論。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。該Ig Fc多肽可包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。該Ig Fc多肽之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽進一步包含取代在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽可進一步包含L104E，以及/或是二、三或四個額外之取代，選自由下列取代所組成之群：T30N、V32I、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P及I65S。

部分此等二聚體具有對於CD86（如，hCD86）或二聚體CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig及/或Orencia®蛋白對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80（如，hCD80）或二聚體CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig及/或Orencia®蛋白對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。部分此等單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於CD86或CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80（如，hCD80）或CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之集合親和力或結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之至少一種此等突變CTLA-4-Ig二聚體之病患體內）抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應）。部分此等二聚體可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig（如，二聚體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。部分此等單體可以相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種用以治療其中免疫抑制治療將具有效益之疾病或病症之治療及/或預防方法中具有效益用途，其包括，如，用以治療自體免疫疾病之方法，以及用以抑制器官或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號；以及（2） Ig Fc多肽，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86 （以及/或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80（如，hCD80）及/或CD86（如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。該Ig Fc多肽可包含IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc。該Ig Fc多肽可包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。該Ig Fc多肽之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。在部分此等二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。

部分此等二聚體具有對於CD86 （如，hCD86）或二聚體CD86-Ig （如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於

hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80 （如，hCD80）或二聚體CD80-Ig （如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig及/或Orencia®蛋白對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。部分此等單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於CD86或CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80 （如，hCD80）或CD80-Ig （如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之集合親和力或結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應），如下文詳細討論。部分此等二聚體具有可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑一或多種此等免疫反應的能力。部分此等單體具有可以相較於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應的能力。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種用以治療其中免疫抑制治療將具有效益之疾病或病症之治療及/或預防方法中具有效益用途（如，自體免疫疾病及病症，以及用以抑制器官或組織移植物移植排斥之方法）。

任何此等上述之二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體或單體可進一步包括可協助該融合蛋白自宿主細胞分泌之肽。該肽視情況係一種信號肽。該信號肽之C-端一般而言共價連結該多肽之N-端。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-35、1-36或1-37的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。同時，如下文所討論，任何此等上述之二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白可包含一或多個經糖基化或聚乙二醇化之胺基酸殘基。

本發明亦提供一種成熟/分泌之突變CTLA-4-IgG2融合蛋白，其長度係352個胺基酸，且其包含突變CTLA-4 ECD多肽，包含124個胺基酸殘基，以及一人類IgG2 Fc多肽，包含228個胺基酸殘基。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括該等包含由SEQ ID NOS:1-73中任一者所辨識之序列的多肽。例示性之突變CTLA-4-IgG2融合蛋白包括該等包含由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者所辨識之多肽序列者。如需要，成熟突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之胺基酸可以該突變CTLA-4-IgG2之第一個胺基酸殘基（亦即，該突變CTLA-4 ECD多肽之第一個殘基）起始編號。在部分範疇中，該突變CTLA-4-IgG2融合蛋白（或突變CTLA-4 ECD）之第一個殘基係甲硫胺酸，並因此該突變CTLA-4-IgG2融合蛋白（或突變CTLA-4 ECD）之胺基酸編號將會由該甲硫胺酸起始（指稱為胺基酸殘基1）。

本發明亦包括分離或重組之多聚體融合蛋白，其包含二或多個上述之突變CTLA-4-Ig融合蛋白。在部分情形下，該多聚體係融合蛋白二聚體，包含兩個突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其可為相同之融合蛋白（亦即，同質二聚體）或是不同之融合蛋白（亦即，異質二聚體）。在部分情形下，該多聚體係四聚體融合蛋白，包含四個本發明之突變CTLA-4-ECD多肽。該四聚體可包含四個相同之突變CTLA-4 ECD多肽（亦即，同質四聚體），或是四個本發明突變CTLA-4 ECD多肽之任何組合，以使所有四個突變CTLA-4 ECD多肽皆不相同（亦即，異質四聚

體）。部分此等多聚體可結合CD80及/或CD86 （以及/或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可壓抑或抑制免疫反應。

本發明包括可溶形式之任何上述多肽、融合蛋白及多聚體。其亦包括可溶形式之下述本發明複合物。本發明之可溶性分子—如，可溶性之本發明多肽、二聚體融合蛋白、單體融合蛋白、多聚體及複合物—並未連結或連接或是結合細胞。部分此等可溶性分子可存在於溶液中，或是可循環，如，在液體中（如，在對象體內）。一般而言可使用信號肽以協助此種分子之分泌，但該信號肽在該分子自宿主細胞分泌之過程中會受到切割。因此，在大部分之情形下，可溶性之分子，諸如，可溶性之多肽、二聚體融合蛋白、單體融合蛋白或多聚體，並不包括信號肽。如上所討論，本發明之突變CTLA-4胞外域多肽可連結Ig分子，其包括，如，Ig多肽之一部份，諸如，如，Ig Fc多肽，其可造成可溶性之融合蛋白。因此，在一態樣中，本發明包括可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其包含任何如本文所述之本發明突變CTLA-4 ECD多肽，融合或連結Ig多肽之至少一部份，諸如，如，野生型Ig Fc （如，人類IgG2 Fc）或突變Ig Fc多肽。此等可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白可為單體或二聚體融合蛋白，且包括該等在上文及他處詳述之突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體及二聚體，包括在下文之實例中者。如上文及本文他處所詳述，部分此等可溶性之單體或二聚體融合蛋白可具有結合CD80及/或CD86之能力，以及/或是在活體外及/或活體內之應用中壓抑或抑制免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖）。

此等本發明之可溶性分子預期可在各種應用中具有特別效益，其包括，如，用以治療免疫系統疾病及病症（如，自體免疫疾病）之治療及預防方法，以及用以抑制細胞、器官或組織移植物排斥之預防及治療方法。本發明之可溶性分子—如，本發明之可溶性重組突變CTLA-4 ECD多肽、單體及二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白、突變CTLA-4 ECD複合物、突變

CTLA-4-Ig複合物、包含突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig之多聚體、包含突變CTLA-4複合物或突變CTLA-4-Ig複合物之多聚體—其可結合CD80及/或CD86，在以治療或預防有效量投與至對象時，可抑制內源性CD80及/或CD86與內源性CD28間的作用，因而在該對象體內抑制免疫系統反應或是抑制對於該對象健康體組織、器官及/或細胞之免疫系統攻擊。在其中對象係來自捐贈者之健康體組織、器官及/或細胞之接受者的情形下（如，諸如該對象接受者已接受捐贈者之組織移植物或是細胞或器官移植時），此等可溶性之分子可抑制內源性CD80及/或CD86與內源性CD28間的作用，因而抑制該對象之免疫系統對於由捐贈者捐與該對象之健康體組織、器官及/或細胞的有害反應或是攻擊。藉由抑制免疫系統反應或是對於健康體組織之攻擊，其可降低該對象體內與此種免疫系統反應或是對於健康體組織、器官或細胞之攻擊相關之副作用（如，疼痛、關節發炎等），並可延遲或預防由此種反應或攻擊所造成之損傷。

用以測量上述本發明多肽（其包括，如，突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）之結合親和力及結合性的方法可為一般熟習技藝者所知，且其包括，如，但不限於，Biacore™技術（GE Healthcare）、等溫滴定微量熱法（MicroCal LLC, Northampton, MA）、ELISA、結合親和力噬菌體展示法及FACS法。Biacore法在下文之實例4中詳述。FACS或其他分選方法在上文及本文他處詳述。以噬菌體ELISA測量本發明多肽對於hCD80及/或hCD86之結合性的方法述於下文實例2。

用以偵測及測量由本發明之分子（其包括，如，本發明之突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白、以及多聚體）所誘發之T細胞反應的方法係熟習技藝者所熟知。T細胞之活化常係以生理事件定性，其包括，如，T細胞相關性細胞因子之合成（如，IFN-γ之生成）以及活化標記

之誘發（如，CD25、IL-2受體）。CD4+ T細胞可在MHC II型分子中辨識其免疫原肽，而CD8+ T細胞則可在MHC I型分子中辨識其免疫原肽。用以評估及測量上述本發明分子抑制或壓抑T細胞活化及/或T細胞增殖或是阻斷經由CD86及/或CD80之信號傳導的例示性方法述於實例5-8以及本文他處。

本發明之多肽、單體及二聚體融合蛋白、以及多聚體，包括上文所討論者，視情形進一步包含一個額外之胺基酸（諸如，甲硫胺酸）添加至其N-端，以及/或是用以進行純化或辨識之肽標記。本發明之多肽，包括上文所討論者，視情形進一步包含多肽純化亞序列，諸如，選自抗原表位標記、FLAG標記、聚組胺酸序列及GST融合物之亞序列。

此外，如下文詳細討論者，本發明包括分離、重組或合成之核酸，其編碼上文所述以及下文進一步詳述之所有本發明之多肽、融合蛋白及多聚體。

序列相同性

如上文所討論，在一態樣中，本發明包括一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。在另一態樣中，如下文所詳述，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其ECD之能力，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

一序列（多肽或核酸）與另一者之相似程度可提供該兩序

列類似結構及功能特性之指標。因此，在本發明之內容中，與任何特定實例序列具有相似序列之序列係本發明之特徵。具有如下文所定義之序列相同性百分比之序列係本發明之特徵。可使用各種用以判定序列關係之方法，包括手動排比及電腦輔助性序列排比及分析。各種用以進行序列排比之電腦程式係可取得者，或者可由熟習技藝者產生。

如上文所註記，用於本發明之核酸及多肽序列與對應之本發明核酸或本發明多肽分別並不必須為相同，但可為實質上相同。舉例而言，可對本發明之多肽進行各種變化，諸如一或多個胺基酸之插入、缺失及/或取代，其可為保守性或非保守性者，包括，如，在此等變化可對其用途提供某些利益之情形下，諸如，在其治療及預防用途，或是其投藥或診斷應用中。亦可對本發明之核酸進行各種變化，諸如一或多個胺基酸在一或多個密碼子中之一或多個取代，其使特定密碼子編碼相同或不同之胺基酸，造成沈默變化（如，核苷酸序列之突變造成胺基酸序列之沈默變化，如，當經編碼之胺基酸並未由該核酸突變而改變時）或非沈默變化，該序列中一或多個核酸（或密碼子）之一或多個缺失，該序列中一或多個核酸（或密碼子）之一或多個添加或插入，該序列中一或多個核酸（或密碼子）之切割或一或多個截段。該等核酸亦可經修飾以包括一或多個密碼子，以在一表現系統中（如，細菌或哺乳動物表現系統中）提供最適表現，同時，如需要，該一或多個密碼子仍編碼該（等）相同之胺基酸。此等核酸變化可對其治療及預防用途，或是其投藥或診斷應用提供某些利益。該等核酸及多肽可以諸多方式進行修飾，只要其包含分別與本發明核酸或多肽之序列實質上相同（如下文所定義）之序列。

在有關二或多個核酸或多肽序列之內容中，名辭「相同」或「相同性」係指二或多個序列，其在為取得最大相似性而比較及排比時（如使用下文所述之序列比較算法或是由目視檢驗所判定者）係為相同，或是具有指定百分比之胺基酸殘基或核

苷酸係為相同。對象序列與參照（亦即，查詢）序列之「序列相同性百分比（「%相同性」）」意謂該對象序列在一比較長度中與該查詢序列具有指定百分比之相同性（亦即，就多肽序列而言為基於胺基酸對胺基酸之基礎，或是就聚核苷酸序列而言為基於核苷酸對核苷酸之基礎）。

對象序列與查詢序列之序列相同性百分比（「%序列相同性」或「%相同性」）可如下計算。首先，使用具有特定排比參數之序列比較算法判定兩序列之最適排比。此種最適排比之判定可使用電腦進行，或使可以人工計算，如下所述。接著，在該比較長度中對該兩個經最適排比之序列進行比較，並判定在該最適排比中於該兩序列中出現相同殘基之位置數目，其可提供相符位置數目。接著將該相符位置數目除以該比較長度（除非另有明示，其係該查詢序列之長度）之總位置數目，接著再將該結果乘以100，以產生該對象序列與該查詢序列之序列相同性百分比。

就多肽序列而言，一般而言，其會將一個序列視為「查詢序列」（例如，本發明之多肽序列），並對其使一或多個其他序列，亦即，「對象序列」（例如，存在於序列資料庫中之序列）進行比較。序列比較算法會使用指定之排比參數而判定該查詢序列與該（等）對象序列間之最適排比。當使查詢序列對序列資料庫進行比較時，諸如，GENBANK® 資料庫（Genetic Sequence Data Bank; U.S. Department of Health and Human Services）或GENESEQ® 資料庫（Thomson Derwent；亦可以DGENE® 資料庫之形式於STN取得），通常僅會將該查詢序列與該等排比參數輸入電腦；其會針對多達指定數目之對象序列而產生查詢序列與各個對象序列間之最適排比。

1. 最適排比之判定

在使用指定之參數進行排比，亦即，指定之胺基酸替換矩陣（substitution matrix）、間隙存在罰分（gap existence penalty）

（亦稱為間隙開放罰分（gap open penalty））及間隙延伸罰分（gap extension penalty），以取得該配對序列之最高可能相似性評分時，兩多肽序列即經「最適排比」。BLOSUM62矩陣（Henikoff and Henikoff（1992） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89（22）:10915-10919）經常作為多肽序列排比算法（諸如，BLASTP，述於下文）之系統預設評分替換矩陣。其在將單一胺基酸間隙引入該等排比序列之一時課徵間隙存在罰分，並針對該間隙中之各個殘基位置課徵間隙延伸罰分。除非另有明示，用於本文之排比參數為：BLOSUM62評分矩陣，間隙存在罰分= 11，及間隙延伸罰分= 1。由排比開始及結束處（如，排比視窗）之各個序列的胺基酸位置定義排比評分，並視情形藉著在一或兩者之序列中插入一個間隙或多個間隙，以取得最高可能相似性評分。

儘管二或多個序列間之最適排比可以手動判定（如下所述），該流程可藉著使用電腦執行之排比算法而獲得協助，諸如，BLAST® （National Library of Medicine），如，多肽序列用之BLASTP以及核酸序列用之BLASTN，述於Altschul et al.（1997） Nucleic Acids Res. 25:3389-3402，並經由各種來源而可為公眾取得，諸如，國家生技資訊中心（National Center for Biotechnology Information）（NCBI）網站。在使用電腦化之BLAST界面時，如選項存在使用「低複雜性過濾器（low complexity filter）」，此一選項通常應該關閉（亦即，不使用過濾器）。

兩多肽序列間之最適排比亦可使用上文所指定之相同排比參數（矩陣= BLOSUM62，間隙開放罰分= 11，及間隙延伸罰分= 1），以BLASTP算法之手動計算（亦即，無電腦輔助）而判定。為開始進行，初始以目視檢驗排比該兩序列。接著如下計算初始排比評分：對該排比之各個位置（亦即，對各組排比殘基配對），根據BLOSUM62矩陣指定一數字值（圖13）。該等指定給與該排比中各對殘基之數值總和即係排比評分。如

該兩待排比之序列係高度相似，通常此種初始排比可提供最高可能排比評分。具有最高可能排比評分之排比係根據所用排比參數之最適排比。

有關兩序列排比評分之手動計算實例提供於圖14A-14D。圖14A顯示「查詢（query）」序列（其在本文中辨識為人類CTLA-4 ECD序列（SEQ ID NO:159）之殘基39-53）與「對象（subject）」序列（其在本文中辨識為D3 （SEQ ID NO:61）之殘基40-54）之任意排比（排比14A）的排比評分計算。由BLOSUM62矩陣對各排比胺基酸對所指定之數字值示於該排比中各位置之下。

圖14B顯示該相同兩序列之最適排比的排比評分。為協助視讀，將該排比中之各相同胺基酸對以粗體顯示。下文圖14B之排比（排比14B）可造成此兩序列之最高可能排比評分（各排比位置下所示數值之總和）；此兩序列之任何其他排比，在有或無間隙之情形下，將會造成較低之排比評分。

在部分情形下，可藉著在該排比中引入一或多個間隙而取得較高之排比評分。在將間隙引入排比之情形下，其指定間隙開放罰分，並針對該間隙中之各個殘基位置評估額外之間隙延伸罰分。因此，使用上述之排比參數（包括間隙開放罰分= 11及間隙延伸罰分= 1），在該排比中一個殘基長度之間隙將對應於指定給與該間隙之- （11+（1 x 1）） = -12數值；兩個殘基長度之間隙將對應於指定給與該間隙之
- （11+（2 x 1）） = -13數值等等。針對各個引入該排比中之新間隙重複此一計算。

下述係一實例，其說明，儘管在有間隙罰分之情況下，在排比中引入間隙如何仍可造成較高之排比評分。圖14C顯示「查詢」序列（其在本文中辨識為人類CTLA-4 ECD序列（SEQ ID NO:159）之殘基39-53）與「對象」序列（其在本文中辨識為D3 （SEQ ID NO:61）之殘基41-55，但在此情形下其具有胺基酸49-50之缺失）之排比（排比14C）。排比14C，其係在

未引入任何間隙下之最佳可能排比，產生排比評分34。

圖14D中之排比（排比14D）顯示在該下側序列中引入兩個殘基長度之間隙對於排比評分之作用。儘管具有總間隙罰分13（間隙開放罰分11，以及2倍之間隙延伸罰分1），該兩序列之整體排比評分增加至43。下部之排比D可產生最高之可能排比評分，並因此係此兩序列之最適排比；此兩序列之任何其他排比（在有或無間隙之情形下）將會造成較低之排比評分。

咸須明瞭，上述之序列排比計算實例（其使用相對較短之序列）僅係因說明目的而提供。在實務上，該等所用之排比參數（BLOSUM62矩陣，間隙開放罰分= 11，及間隙延伸罰分= 1）一般而言係欲用於長度為85個胺基酸或更長之多肽序列。NCBI網站針對其他長度之序列提供下列排比參數，其適用於電腦輔助性以及手動之排比計算，使用如上所述之相同流程進行。針對長度為50-85個胺基酸之序列，最適參數為BLOSUM80矩陣（Henikoff and Henikoff，上述文獻），間隙開放罰分= 10，及間隙延伸罰分= 1。針對長度為35-50個胺基酸之序列，最適參數為PAM70矩陣（Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C.（1978）"A model of evolutionary change in proteins [蛋白之演化性變化模式]" 於*Atlas of Protein Sequence and Structure [蛋白序列及結構圖集]*, vol. 5, suppl. 3, M.O. Dayhoff（ed.）, pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.），間隙開放罰分= 10，及間隙延伸罰分= 1。針對長度為小於35個胺基酸之序列，最適參數為PAM30矩陣（Dayhoff, M.O.，上述文獻），間隙開放罰分= 9，及間隙延伸罰分= 1。

2.相同性百分比之計算

一旦使序列進行最適排比後，即可計算在該最適排比中含有相同殘基對之位置數目，除以在該比較長度（亦稱為比較視窗）中之殘基數目（除非另有明示，其係該查詢序列中之殘基數目），再將該所得之數目乘以100，以計算該對象序列相對於

該查詢序列之相同性百分比。回頭參見上述之排比，在各個實例中，經指定為查詢（上側）序列之序列長度為15個胺基酸。在排比B中，在該查詢序列（上側）與對象序列（下側）之最適排比中，共有12對之排比胺基酸殘基（以粗體字顯示）為相同。因此，此一特定之對象序列與該15個殘基之查詢序列的完整長度具有（12/15） x 100 = 80%之相同性；換言之，在排比B中之該對象序列與該查詢序列具有至少80%之胺基酸相同性。在排比D中，在該最適排比中，共有11對之胺基酸殘基（以粗體字顯示）為相同；因此，此一特定之對象序列與該15個殘基之查詢序列的完整長度具有（11/15） x 100 = 73.3%之相同性；換言之，在排比D中之該對象序列與該查詢序列具有至少73%之胺基酸序列相同性。

在應用於多肽時，名辭「實質上之相同性」（或「實質上相同」）一般而言意謂當使用BLASTP算法（手動或經由電腦）使用上述之適當參數而使兩胺基酸序列（亦即，查詢序列及對象序列）最適排比時，該對象序列與該查詢序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之胺基酸序列相同性。在部分情形下，實質上之相同性存在於至少100個胺基酸殘基之比較長度中，諸如，如，至少110、115、118、119、120、121、122、123、124、125、130、135、140、145、150、200、250、300、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、375、400、450或500個胺基酸殘基。

相似者，在應用於兩核酸序列之內容中時，名辭實質上之相同性（或實質上相同）意謂當使用BLASTN算法（手動或經由電腦）使用上述之適當參數而使兩核酸序列（亦即，查詢序列及對象序列）最適排比時，該對象序列與該查詢序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之核酸序列相同

性。用於核酸序列排比之參數為：配對給分（match reward）1，錯配罰分（mismatch penalty） -3，間隙存在罰分5，間隙延伸罰分2 （在BLASTN算法中並不使用替換矩陣）。在部分情形下，實質上之相同性存在於至少300個核苷酸殘基之比較長度中，諸如，如，至少330、345、354、357、360、363、366、369、362、365、375、390、405、420、435、450、600、750、900、1035、1038、1041、1044、1047、1050、1053、1056、1059、1062、1065、1068、1071、1074、1077、1080、1200、1350或1500個核苷酸殘基。

可使用其他技藝中已知之序列排比程式。ALIGN程式可使用由Myers and Miller CABIOS 4:11-17 （1988）所述動態規劃算法之改良算法而產生兩所選蛋白或核酸序列之最適全體（整體）排比。ALIGN程式一般而言（但並非必須）係以加權末端間隙使用。如有間隙開放罰分及間隙延伸罰分時，其針對胺基酸序列排比通常分別係設定在約-5至-15以及0至-3間，更佳者係分別為約-12以及-0.5至-2，且針對核酸序列排比分別為約-10至-20以及-3至-5，更常見者係分別為約-16以及-4。ALIGN程式進一步述於Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 （1988），以及Pearson et al., Meth. Enzymol. 18:63-98 （1990）。

或者，且特別針對多重序列分析（亦即，超過三種序列之比較），可使用CLUSTALW程式（述於，如，Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22:4673-4680 （1994））。CLUSTALW程式係一種適用於進行多重DNA及胺基酸序列排比之算法（Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22:4673-4680 （1994））。CLUSTALW可在序列群間進行多重之逐對比較，並根據同源性而將其組合成為多重排比。在一態樣中，間隙開放及間隙延伸罰分係分別設為10及0.05。或者或是此外，CLUSTALW程式係使用「動態」（相對「固定」）設定而執行。一般而言，以CLUSTALW進行之核苷酸序列分析係使用BESTFIT矩陣執

行；而胺基酸序列係根據該等序列間之相同性程度而使用不同組之BLOSUM矩陣進行評估（如，如可經由聖地牙哥超級電腦中心（San Diego Supercomputer Center （SDSC））取得之CLUSTALW 1.6版程式或是可由歐洲生物資訊中心（European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK）取得之W 1.8版所用者）。較佳者，CLUSTALW之設定係設定為SDSC CLUSTALW系統預設之設定（如，關於胺基酸序列分析中之特定疏水性間隙罰分）。CLUSTALW程式進一步述於，如，Higgins et al., CABIOS 8（2）:189-91 （1992），Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-80 （1994），及Jeanmougin et al., Trends Biochem. Sci. 2:403-07 （1998）。

在另一形式中，特定排比胺基酸序列對間之相同性或相同性百分比係指由CLUSTALW分析（如W 1.8版）所取得之胺基酸序列相同性百分比，其計算該排比中之相同配對數目，再將該相同配對數目除以（i）排比序列長度及（ii） 96中之較大者，並使用下列之系統預設ClustalW參數以達成慢速/逐對之排比—間隙開放罰分：10；間隙延伸罰分：0.10；蛋白重量矩陣：Gonnet系列；DNA重量矩陣：IUB；Toggle慢速/快速逐對排比=SLOW或FULL排比。

另一用於判定相同性百分比或類似性百分比之有用算法係FASTA算法，其述於Pearson et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 （1988）及Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258（1996）。用於DNA序列之FASTA排比中以計算相同性百分比之典型參數經最適化，BL50矩陣15: -5，k序列（k-tuple）=2；結合罰分（joining penalty）=40，最適化（optimization）=28；間隙罰分（gap penalty） = -12，間隙長度罰分（gap length penalty） =-2；及寬度（width） =16。

其他適當之算法包括BLAST及BLAST 2.0算法，其可協助分析至少兩個胺基酸或核苷酸序列，藉著使所選序列對抗資料庫（如，GenSeq）中之多個序列進行排比，或者，當以諸如

BL2SEQ之其他算法進行修飾時，可在兩個所選序列間進行排比。用以進行BLAST分析之軟體可經由國家生技資訊中心（NCBI）（全球資訊網網址ncbi.nlm.nih.gov）而為公眾取得。BLAST算法涉及首先藉著在該查詢序列中辨識長度為W之短字序而辨識高分序列對（HSPs），其在與資料庫序列中具有相同長度之字序排比時係相應或符合某個正值閾值評分T。T係指鄰近字序評分閾值（neighborhood word score threshold）（Altschul et al.，上述文獻）。此等初始之鄰近字序相符結果可作為種子而起始搜尋發現含其之較長HSPs。將該等字序相符結果沿著各序列而向兩方向延伸，只要可增加累積排比評分便繼續進行。針對核苷酸序列，累積評分係使用參數M （配對殘基對之給分；永遠> 0）及N （錯配殘基之罰分；永遠< 0）而計算。針對胺基酸序列，其使用評分矩陣以計算該累積評分。該等字序相符結果向各方向之延伸在下列情形下停止：在累積排比評分由其最大達成值下滑X之量時；在累積評分因為累積一或多個負分殘基排比而到達0或以下時；或是在到達任一序列之末端時。BLAST算法參數W、T'及X可決定該排比之敏感性及速度。BLASTN程式（用於核苷酸序列）可以字序長度（W） 11、期望值（E） 10、M=5、N=-4、以及兩股之比較。針對胺基酸序列，BLASTP程式（如，BLASTP 2.0.14; Jun-29-2000）可以字序長度3及期望值（E） 10使用。BLOSUM62評分矩陣(參見Henikoff & Henikoff,（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915）使用排比（B） 50、期望值（E） 10、M=5、N=-4、以及兩股之比較。同樣的，如同其他適用之算法，可增加比較之嚴格性，直到該程式僅辨識出與該等本文序列表中者較為密切相關之序列（如，包含與選自SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之多肽序列具有至少85、90、91、92、93、49、95、96、97、98、99%或100%相同性之多肽序列的多肽，或是包含與選自SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224之核苷酸序列具有至少85、

90、91、92、93、49、95、96、97、98、99%或100%相同性之核苷酸序列或是其互補核苷酸序列的核酸。

BLAST算法亦對兩序列間之相似性或相同性進行統計分析（參見，如，Karlin & Altschul,（1993） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787）。其中一種由BLAST算法所提供之相似性或相同性度量係最小總和機率（smallest sum probability）（P（N）），其提供一種有關兩核苷酸或胺基酸序列間隨機產生配對之機率的指標。舉例而言，如在試驗核酸與參照核酸之比較中，該最小總和機率係小於約0.2，諸如，小於約0.01或小於約0.001，該核酸即被視為與該參照序列相似。

BLAST程式分析亦或可由低複雜度過濾程式修飾，諸如，DUST或SEG程式，其較佳係整合近如該BLAST程式之操作中（參見，如，Wootton et al., Comput. Chem. 17:149-63（1993），Altschul et al., Nat. Genet. 6:119-29（1991），Hancock et al., Comput. Appl. Biosci. 10:67-70（1991），及Wootton et al., Meth. Enzymol. 266:554-71（1996））。在此等態樣中，如使用λ比例（lambda ratio），該比例之可用設定係介於0.75及0.95間，包括介於0.8及0.9間。如在此等態樣中使用間隙存在代價（或間隙評分），該間隙存在代價一般而言係設定在介於約-5及-15間，更一般而言係約-10，且每個殘基之間隙代價一般而言係設定在介於約0至-5間，諸如介於0及-3間（如，-0.5）。可如適當者以其他程式使用類似之間隙參數。BLAST程式以及其下之原則進一步述於，如，Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10（1990），Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68（199）（如由Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77（1993）修飾），以及Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402（1997）。

可用算法之另一實例係合併於PILEUP軟體中。PILEUP程式可使用漸進式之逐對排比，由一群相關之序列中創造出多重序列排比，以顯示其關係以及序列相同性百分比或序列相似性

百分比。PILEUP係使用Feng & Doolittle （1987） J. Mol. Evol. 35:351-360之漸進式排比法的簡化版本，其類似Higgins & Sharp （1989） CABIOS 5:151-153所述之方法。該程式可針對最多300個序列進行排比，其各自之最大長度為5,000個核苷酸或胺基酸。該多重排比流程始於兩個最相似序列之逐對排比，產生兩經排比序列之群組。接著使此群組與次一個最為相關之序列或是經排比序列之群組進行排比。兩個序列群組間之排比係藉由兩個別序列之逐對排比的簡單延伸而進行。終排比係藉由一系列之漸進式逐對排比而達成。該程式係藉由指定特定之序列以及其序列比較區域之胺基酸或核苷酸座標，並藉由指定程式參數而執行。藉著使用PILEUP，其使用特定之參數使一參照序列與其他試驗序列進行比較，以判定序列相同性百分比（或序列相似性百分比）關係。PILEUP程式之例示性參數為：系統預設間隙權數（3.00），系統預設間隙長度權數（0.10），以及加權之末端間隙。PILEUP係GCG序列分析套裝軟體之組件之一，如，7.0版（Devereaux et al. （1984） Nucl. Acids Res. 12:387-395）。

可用於進行相同性分析之其他可用算法包括之局部同源性算法Smith and Waterman （1981） Adv. Appl. Math. 2:482，Needleman and Wunsch （1970） J. Mol. Biol. 48:443之同源性排比算法，以及Pearson and Lipman （1988） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444之相似性搜尋法。此等算法之電腦化實施（如， GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA）提供於Wisconsin Genetics套裝軟體7.0版（Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）。

序列變異

如上所討論，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基

（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，其中該突變CTLA-4 ECD多肽可結合CD80及/或CD86，以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此（等）胺基酸取代包括保守性之胺基酸取代。

作為一種非限制性之實例，本發明之多肽可具有多肽序列，其與SEQ ID NO:1具有總共最多6個胺基酸之差異（其可為胺基酸取代、缺失及/或插入之組合，包括該等述於上文者）。在部分情形下，該等取代中之無、部分或全部係根據下文所定義之取代組中之取代。

根據本發明之胺基酸取代可包括，但不限於，一或多個保守性胺基酸取代。保守性之胺基酸殘基取代一般而言涉及將一種胺基酸殘基功能類型中之成員以屬於該相同功能類型中之殘基進行交換（該等相同之胺基酸殘基在計算功能同源性百分比時係視為功能同源性或保守性者）。提供功能類似性胺基酸之保守性取代表係技藝中所熟知。其實例之一提供於表1，其顯示六種例示性之群組，含有彼此可被視為「保守性取代」之胺基酸。

表1. 保守性胺基酸殘基取代組

1	丙胺酸（A） 甘胺酸（G） 絲胺酸（S） 羥丁胺酸(T)
2	天冬胺酸（D） 麩胺酸（E）
3	天冬醯胺（N） 麩醯胺（Q）
4	精胺酸（R） 離胺酸（K） 組胺酸（H）
5	異白胺酸（I） 白胺酸（L） 甲硫胺酸（M） 纈胺酸（V）
6	苯丙胺酸（F） 酪胺酸（Y） 色胺酸（W）

可預期其他之取代組。舉例而言，可以類似之功能或化學結構或組成而分組胺基酸（如，酸性、鹼性、脂族、芳族、含硫）。舉例而言，脂族之分組可包含：甘胺酸(G)、丙胺酸(A)、

纈胺酸（V）、白胺酸（L）、異白胺酸（I）。其他含有彼此間被視為保守性取代之胺基酸的組群包括：芳族：苯丙胺酸(F)、酪胺酸（Y）、色胺酸（W）；含硫：甲硫胺酸（M）、半胱胺酸（C）；鹼性：精胺酸（R）、離胺酸（K）、組胺酸（H）；酸性：天冬胺酸（D）、麩胺酸（E）；非極性無電荷殘基，半胱胺酸（C）、甲硫胺酸（M）及脯胺酸（P）；親水性無電荷殘基：絲胺酸（S）羥丁胺酸（T）天冬醯胺（N）及麩醯胺（Q）。關於其他胺基酸之分組，亦參見Creighton （1984） Proteins, W.H. Freeman and Company。本文之多肽序列表列，結合上述之取代組，可提供所有經保守取代多肽序列之明示表列。

其他之保守性取代存在於上述之胺基酸殘基類別中，其亦可或是或可為適當者。更為保守之取代保守組群包括：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸，苯丙胺酸-酪胺酸，離胺酸-精胺酸，丙胺酸-纈胺酸，以及天冬醯胺-麩醯胺。因此，舉例而言，在一特定態樣中，本發明提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與SEQ ID NO:1 （或是SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222中任一者）具有至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%之相同性，且其與SEQ ID NO:1之序列大部分（如，至少50%、60%、70%、75%、80%、90%）之差異（如非全部）係由此等保守性胺基酸取代所造成。

其他亦可為適當之胺基酸組群可使用述於，如，Creighton（1984） Proteins: Structure and Molecular Properties （2d Ed. 1993）, W.H. Freeman and Company之原則判定。在部分態樣中，胺基酸序列變體中至少33%, 50%, 60%, 70%或以上（如，至少75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%或以上）之取代包含本發明多肽序列中一或多個胺基酸殘基經由該與其所取代之多肽序列胺基酸殘基相同之功能同源性類別(如以任何適當之分類系統判定）中的殘基所進行之取代。

本發明多肽序列之保守性取代變體包括小百分比(一般而言係小於該多肽序列胺基酸之10%、9%、8%、7%或6%，或

更一般而言係小於該多肽序列胺基酸之5%、4%、3%、2%或1%）之經由相同保守性取代組中保守選擇之胺基酸的取代。

本發明包括包含本文所述本發明多肽序列胺基酸變異之多肽。如上所討論，在一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽，（如，突變CTLA-4多肽，諸如，如，突變CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86，或是CD80及/或CD86之多肽片段（或是其任一或兩者之ECD），及/或可抑制免疫反應。此等多肽可具有一或多個胺基酸缺失、添加或取代之差異，包括一或多個保守性或非保守性之取代，然而，其條件為該等多肽具有所述之功能特性。在一特定態樣中，本發明提供多肽變體，其包含本文所述任何此種多肽（諸如，如，包含選自SEQ ID NOS:1-73之群的多肽序列者）之保守性修飾變化。

亦如上所討論，在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其各包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），及/或可抑制免疫反應。此等融合蛋白可具有一或多個胺基酸缺失、添加或取代之差異，包括一或多個保守性或非保守性之取代，然而，其條件為該等融合蛋白具有所述之功能特性。在一特定態樣中，本發明提供多肽變體，其包含本文所述任何此種融合蛋白（諸如，如，包含選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的多肽序列者）之保守性修飾變化。

亦提供上文或本文他處所述之任何本發明分離或重組多

肽之多肽變體，其中該多肽變體之胺基酸序列與該參照序列之對應多肽序列具有一或多個保守性胺基酸殘基取代之差異，但非保守性之取代有時係可允許或甚至係較佳者（此等非保守性取代之實例於本文進一步討論）。舉例而言，該多肽變體之序列可與突變CTLA-4多肽序列具有突變CTLA-4 ECD多肽序列中之一或多個胺基酸殘基經由一或多個具有類似重量之胺基酸殘基（亦即，與其所取代之對應多肽序列中之殘基具有重量同源性之殘基）的取代。多肽胺基酸殘基之重量（以及對應之大小）對於多肽之結構具有顯著之影響。重量基礎性之保守性或同源性係根據非相同之對應胺基酸在本文所述之重量基礎性矩陣之一中（如，BLOSUM50矩陣；PAM250矩陣）是否連結正評分。

與上述之功能性胺基酸類別相似，可將天然之胺基酸殘基劃分為重量基礎性保守組群（其區分為「強」及「弱」保守組群）。常用之八個重量基礎性強保守組群為Ser Thr Ala、Asn Glu Gln Lys、Asn His Gln Lys、Asn Asp Glu Gln、Gln His Arg Lys、Met Ile Leu Val、Met Ile Leu Phe、His Tyr、and Phe Tyr Trp。重量基礎性弱保守性群包括Cys Ser Ala、Ala Thr Val、Ser Ala Gly、Ser Thr Asn Lys、Ser Thr Pro Ala、Ser Gly Asn Asp、Ser Asn Asp Glu Gln Lys、Asn Asp Glu Gln His Lys、Asn Glu Gln His Arg Lys、Phe Val Leu Ile Met、and His Phe Tyr。部分版本之CLUSTAL W序列分析程式在排比之輸出中提供對於重量基礎性強保守性及弱保守性組群之分析，因而提供用以判定重量基礎性保守性之便利技術（如，由SDSC所提供之CLUSTAL W，其一般而言係以SDSC系統預設值之設定而使用）。在部分態樣中，在該等多肽變體中至少33%、50%、60%、70%、80%或90%之取代包含其中在一重量基礎性保守性組群中之殘基取代在該相同重量基礎性保守性組群中之多肽序列胺基酸殘基的取代。換言之，就胺基酸殘基重量之特徵而言，該百分比之取代係保守性者。

該多肽變體之序列可與本發明之突變CTLA-4多肽序列具有由一或多個與該突變CTLA-4多肽之經取代（原始）殘基具有類似親水特性（亦即，具有類似親水性）之胺基酸殘基所進行之一或多個胺基酸取代的差異。親水特性可使用Kyte & Doolittle指數判定，各種天然胺基酸在該指數中之評分如下：I（+4.5）、V （+4.2）、L （+3.8）、F （+2.8）、C （+2.5）、M（+1.9）; A（+1.8）、G（-0.4）、T（-0.7）、S（-0.8）、W（-0.9）、Y （-1.3）、P （-1.6）、H （-3.2）; E （-3.5）、Q （-3.5）、D（-3.5）、N （-3.5）、K （-3.9）及R （-4.5） （進一步之討論參見，如，美國專利第4,554,101號及Kyte & Doolittle、J. Molec. Biol. 157:105-32 （1982））。該變體多肽序列中之至少75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%98%、99%或100%之胺基酸殘基不同於本文所揭示之相同性或功能性同源突變CTLA-4多肽序列（「最相關同源物」）中之對應殘基，該同源物可係選自SEQ ID NOS:1-73中之任一者，其相對該最相關同源物中對應位置之非相同性胺基酸殘基具有小於+/-2之親水性變化，包括小於+/-1之親水性變化以及小於+/-0.5之親水性變化。相對其選自SEQ ID NOS:1-73之群之最相關同源物，該變體多肽可具有小於約150、小於約100及/或小於約50 （如，小於約30、20或10）之總親水性變化。

保留類似或相同親水性之典型胺基酸取代實例包括精胺酸-離胺酸取代、麩胺酸-天冬胺酸取代、絲胺酸-羥丁胺酸取代、麩醯胺-天冬醯胺取代、以及纈胺酸-白胺酸-異白胺酸取代。算法及軟體，諸如，可經由SDSC取得之GREASE程式，可提供用以快速評估胺基酸序列親水特性之便利方式。由於多肽變體序列中實質比例（如，至少約33%）之胺基酸取代（如非大部分（至少50%）或將近全部（如，約65、80、90、95、96、97、98、99%））通常將會與其在該（參照）多肽序列中所取代之胺基酸殘基具有類似之親水性分數，該多肽變體序列預期會與該多肽序列具有類似之GREASE程式輸出結果。舉例

而言，在一特定態樣中，SEQ ID NO:61之多肽變體預期會具有之GREASE程式（或類似程式）輸出結果係較類似由輸入SEQ ID NO:61之多肽所取得之GREASE輸出結果，而非使用WT CTLA-4多肽（如，hCTLA-4）所取得者，此可藉著就對該試驗序列與SEQ ID NO:1執行該程式而提供之圖形（如，圖形重疊/排比）及/或數字輸出結果進行目視檢驗或是電腦輔助性比較而判定。

就功能同源性、重量同源性、以及親水特性所言之胺基酸殘基保守性亦可應用於其他由本發明所提供之多肽序列變體，其包括，但不限於，具有選自由SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222所組成之群之多肽序列的多肽序列變體。

在一特定態樣中，本發明包括至少一個此種多肽變體，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之群的重組多肽序列不同，其中該變體之胺基酸序列具有至少一個此種根據如上所述之重量基礎性保守性或同源性或是類似之親水特性而選擇之胺基酸殘基取代。此等上述之多肽變體一般而言具有結合CD80及/或CD86之能力，及/或抑制至少一種類型免疫反應之能力，其係如上所述並在實例中於下文進一步詳述。

信號肽序列

本發明之多肽亦可包含任何數目及類型之其他胺基酸序列，諸如，一或多個肽片段。在一具體實例中，此種本發明之多肽進一步包含信號肽。一般而言，該信號肽可在該重組多肽在動物細胞中表現時，指引該重組多肽到達內質網。可包括可指引該多肽（當其在細胞中表現時）之至少一部份的胞器運輸及/或分泌之信號肽。此等序列一般而言存在於該多肽之不成熟（亦即，未經完全加工）形式中，並接著由細胞蛋白酶除去/降解，以達成該蛋白之成熟形式。舉例而言，本發明之突變CTLA-4多肽或融合蛋白可包括任何適當之信號序列或是信號

序列之組合，其可指引該多肽到達胞內區隔中，諸如可指引該多肽被運輸（如，移位）進入內質網或分泌途徑（如，ER、高基氏體、以及其他分泌相關性胞器及細胞區隔）（如，以使該蛋白由其加工或自其釋放）、細胞核，以及/或是可指引該多肽由該細胞分泌、在細胞膜中移位或是靶向除外分泌該蛋白之細胞之第二細胞的序列。在此態樣中，該多肽可包括胞內靶向序列（或「分選信號」），其可指引該多肽到達核內體及/或溶酶體區隔或是其他富含MHC II之區隔，以促進CD4+及/或CD8+ T細胞呈遞及反應，諸如，衍生自溶酶體相關膜蛋白1之溶酶體/核內體靶向分選信號（如，LAMP-1 - 參見，如，Wu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1161-75 （1995）及Ravipraskash et al., Virology 290:74-82 （2001））、其同源體之部分（參見，如，美國專利第5,633,234號）或是其他適當之溶酶體、核內體及/或ER靶向信號（參見，如，美國專利第6,248,565號）。在部分態樣中，其可能需要使該胞內靶向序列位於接近或毗鄰該多肽中經證實/辨識之抗原表位序列（其可由技藝中已知之技術辨識），因而增加包含此（等）抗原表位之多肽片段進行T細胞呈遞之可能性。此等多肽可自由一或多個核苷酸轉移載體傳遞至宿主細胞中之分離、重組或合成DNA或RNA而表現，該等載體包括，如，一或多個基因轉移載體，如本文進一步敘述。

該多肽可包含一信號肽，其可在該多肽表現於哺乳動物細胞中時指引該多肽到達內質網（ER）（如，協助該多肽之ER移位）。該多肽可包含任何適當之ER-靶向序列。諸多ER-靶向序列皆係技藝中所已知。此等信號序列之實例述於美國專利第5,846,540號。常用之ER/分泌信號序列包括酵母菌α因子信號序列，以及哺乳動物病毒信號序列，諸如，皰疹病毒gD信號序列。大腸桿菌生產之例示性信號肽包括大腸桿菌之STII或Ipp信號序列。信號序列之其他實例述於，如，美國專利第4,690,898、5,284,768、5,580,758、5,652,139及5,932,445號。使

當之信號序列可使用技藝中已知之技藝而辨識。舉例而言，可使用SignalP程式（述於，如，Nielsen et al. （1997） Protein Engineering 10:1-6），其可在指定為cbs.dtu.dk/services/SignalP之全球資訊網址經由生物序列分析中心（Center for Biological Sequence Analysis）而為公眾取得，或是可辨識似信號序列域之類似序列分析軟體。用以辨識適當信號肽之相關技術提供於Nielsen et al., Protein Eng. 10（1）:1-6 （1997）。可對序列進行手動分析，尋找常與信號序列相關之特徵，如述於，如，歐洲專利申請案(Appn)第0 621 337號，Zheng and Nicchitta（1999） J. Biol. Chem. 274（51）: 36623-30，及Ng et al. （1996） J. Cell Biol. 134（2）:269-78。

其他態樣

任何本發明之多肽（包括任何本發明之融合蛋白）皆可以較大多肽序列之部分的形式存在，諸如，在添加一或多個蛋白域或序列以安定或偵測或純化該多肽時所產生者。此等蛋白域或序列可共價融合本發明之多肽，如熟習技藝者可輕易明瞭並可建構者。多肽純化序列可包括，如，抗原表位標記、FLAG標記、聚組胺酸序列、GST融合物或是技藝所知任何其他偵測/純化亞序列或「標記」。此等額外之蛋白域或是亞序列或係對於本發明多肽之活性具有極少或無作用，或係可由合成後加工步驟除去，諸如，藉由蛋白酶之處理、蛋白內含子（intein）之包括或是其類似者。

任何本發明之多肽（包括任何本發明之融合蛋白）亦可包含一或多個經修飾之胺基酸。該經修飾之胺基酸可為，如，糖基化胺基酸、PEG化胺基酸、法尼基化（farnesylated）胺基酸、乙醯基化胺基酸、生物素化胺基酸、複合脂質分子部分之胺基酸及/或複合有機衍化劑之胺基酸。經修飾胺基酸之存在可有益於，例如，（a） 增加多肽之血清半生期及/或功能性活體內半生期，（b） 降低多肽之抗原性或免疫原性，（c） 增加多肽貯存安定性，（d） 增加生物可利用性，（e） 降低效應子功能，

及/或（f） 降低或抑制二或多個本發明分子間（諸如在二或多個本發明之融合蛋白二聚體間）之非所欲性自體連結（如，凝聚物形成）。胺基酸可在，例如，重組生成期間進行，例如，共轉譯性或後轉譯性之修飾（如，在於哺乳動物細胞中表現期間，在N-X-S/T基序進行N-連結性糖基化作用），或是可由合成方式進行修飾。

本文所述之本發明多肽（包括本發明之融合蛋白）可以各種方式進行進一步之修飾，如，後轉譯性修飾及/或合成性修飾或變化。舉例而言，本發明之多肽或融合蛋白可適當經糖基化，一般而言係經由在哺乳動物細胞中表現。舉例而言，在一態樣中，本發明提供糖基化之多肽，其可結合CD86及/或CD80，以及/或是具有壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之增殖或活化），如本文他處所述，其中各個該經糖基化之多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222所組成之群之序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。

可對本發明之多肽進行任何數目其他適當形式之後轉譯性及/或合成性之修飾或變化。舉例而言，本發明提供本發明多肽之蛋白模擬物。肽模擬物係述於，如，美國專利第5,668,110號以及其中所引述之參考文獻中。

在另一態樣中，本發明之多肽或融合蛋白可藉著將保護基加至該多肽融合蛋白之一或多個胺基酸之側鏈而修飾。此等保護基可協助將該多肽或融合蛋白運輸通過膜（如需要），或是通過某些組織，例如，藉由降低該多肽或融合蛋白之親水性或是增加其親脂性。適當保護基之實例包括酯保護基、胺基保護基、醯基保護基及羧酸保護基，其係技藝中所已知（參見，如，美國專利第6,121,236號）。本發明之合成性融合蛋白可為任何適當之形式。舉例而言，該融合蛋白可由其天然構形經結構修飾而形成環狀肽或其他經結構修飾之肽。

本發明之多肽亦可連接一或多個非蛋白性之聚合物，一般

而言係親水合成聚合物，如，聚乙二醇（PEG）、聚丙二醇或聚氧化烯烴，使用技藝中所熟知之技術，諸如，述於，如，美國專利第4,179,337、4,301,144、4,496,689、4,640,835、4,670,417及4,791,192號者，或是類似之聚合物，諸如，聚乙烯醇或聚乙烯吡咯啶酮（PVP）。

本發明包括複合物，其包含至少一種本發明之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體或單體突變CTLA-4-Ig、多聚體突變CTLA-4 ECD多肽、多聚體突變CTLA-4-Ig）以及一種非多肽分子部分。名辭「複合物」（或可交互使用之「複合多肽」）係意指一種異源（就複合物或嵌合物之意義而言）分子，其係由一或多個多肽與一或多個非多肽分子部分之共價連附而形成。名辭「共價連附」意謂該多肽及該非多肽分子部分或係彼此直接共價連結，或係經由中間分子部分或多個分子部分（諸如，橋、間隔子或連結分子部分及多個分子部分），使用存在於該多肽中之連附基團而間接共價連結。較佳者，該複合物在相關濃度及條件下係為可溶，意即，可溶於生理液體中，諸如血液。本發明複合多肽之實例包括糖基化及/或PEG化多肽。名辭「未複合多肽」可用於說明該複合物之多肽部分。此種複合物一般而言可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86（如，hCD86）及/或其任一或兩者之胞外域（包括hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應之能力。此種免疫反應可包含，但不限於，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成/生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、抗膠原Ab之生成及/或T細胞相關性Ab反應。例示性之多肽包括該等與SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性者。

名辭「非多肽分子部分」係意指一分子，其可與本發明多肽之連附基團複合。此種分子之較佳實例包括聚合物分子、糖類分子部分、親脂性化合物或有機衍化劑。在用於本文所述複

合物之內容中時，咸將可明瞭，該非多肽分子部分係經由多肽之連附基團而與該複合物之多肽部分連結。

名辭「聚合物分子」係定義為一分子，其係由二或多個單體之共價連結所形成，其中該等單體中並無任一者係胺基酸殘基，除外其中該聚合物係人類白蛋白或另一大量血漿蛋白之情形。名辭「聚合物」可與名辭「聚合物分子」交互使用。

N-糖基化位點具有序列N-X-S/T/C，其中X係除外脯胺酸之任何胺基酸殘基，N係天冬醯胺，且S/T/C係絲胺酸、羥丁胺酸或半胱胺酸，較佳者係絲胺酸或羥丁胺酸，且最佳者係羥丁胺酸。

「O-糖基化位點」包含絲胺酸或羥丁胺酸殘基之OH-基團。

名辭「連附基團」意指該多肽可偶合該相關非多肽分子部分（諸如，聚合物分子或糖類分子部分）之胺基酸殘基基團。可用連附基團之非限制性實例及部分對應之非多肽分子部分提供於下表2中。

表2. 可用之連附基團以及對應非多肽分子部分之實例

連附基團	胺基酸	非多肽分子部分之實例	複合方法/活化 PEG 之實例	參考文獻
$-NH_2$	N-端, Lys	聚合物, 如, PEG	mPEG-SPA mPEG2-NHS mPEG2-butyrALD	Nektar Inc. 2003 Catalog; 亦參見 Nektar Therapeutics, 2005-06 Catalog

連附基團	胺基酸	非多肽分子部分之實例	複合方法/活化 PEG 之實例	參考文獻
-COOH	C-端, Asp, Glu	聚合物, 如, PEG 糖類分子部分	mPEG-Hz 活體外之偶合	Nektar, Inc. 2003 Catalog; 亦參見 Nektar Therapeutics 2005-06 Catalog
-SH	Cys	聚合物, 如, PEG 糖類分子部分	mPEG-VS mPEG2-MAL（mPEG-順丁烯二醯亞胺） 活體外之偶合	Nektar Inc. 2003 Catalog; Nektar Therapeutics 2005-2006 Catalog; Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9（3,4）:249-304 （1992）
-OH	Ser, Thr, OH-	糖類分子部分	活體內之 O-連結性糖基化作用	
$-CONH_2$	作為 N-糖基化位點部分之 Asn	糖類分子部分	活體內之 N-糖基化作用	
芳族殘基	Phe, Tyr, Trp	糖類分子部分	活體外之偶合	

連附基團	胺基酸	非多肽分子部分之實例	複合方法/活化 PEG 之實例	參考文獻
$-CONH_2$	Gln	糖類分子部分	活體外之偶合	Yan and Wold, Biochemistry, 1984, Jul 31; 23 (16): 3759-65
醛 酮	氧化醣	聚合物, 如, PEG, PEG-醯肼	PEG 化作用	Andresz et al., 1978, Makromol. Chem. 179:301; WO 92/16555, WO 00/23114
胍基	Arg	糖類分子部分	活體外之偶合	Lundblad and Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FI
咪唑環	His	糖類分子部分	活體外之偶合	同胍

就活體內之N-糖基化作用而言，名辭「連附基團」係以非習知之方式使用而指稱構成N-糖基化位點之該等胺基酸殘基（具有序列N-X-S/T/C，其中X係除外脯胺酸之任何胺基酸殘基，N係天冬醯胺，且S/T/C係絲胺酸、羥丁胺酸或半胱胺酸，較佳者係絲胺酸或羥丁胺酸，且最佳者係羥丁胺酸）。儘管N-糖基化位點之天冬醯胺殘基係糖基化作用過程中該糖類分子部分所連附者，除非存在該N-糖基化位點之其他胺基酸殘基，此種連附即無法達成。因

此，當該非多肽分子部分係糖類分子部分且該複合係欲以N-糖基化作用達成，在結合本發明多肽胺基酸序列之變化而使用時，名辭「包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基」係欲被明瞭為構成N-糖基化位點之一個、兩個或所有胺基酸殘基受到改變，其方式或可將功能性N-糖基化位點引入該胺基酸序列中或可自該序列中除去功能性N-糖基化位點或可在該胺基酸序列中保留功能性N-糖基化位點（如，藉著以羥丁胺酸殘基取代已構成N-糖基化位點部分之絲胺酸殘基，或是相反之情形）。

名辭「引入」（意即，「引入」之胺基酸殘基，胺基酸殘基之「引入」）主要係欲意謂以另一胺基酸殘基取代既有之胺基酸殘基，但亦可意謂插入額外之胺基酸殘基。

名辭「除去」（意即，「除去」之胺基酸殘基，胺基酸殘基之「除去」）主要係欲意謂以另一胺基酸殘基取代欲除去之胺基酸殘基，但亦可意謂移除（無取代）該欲除去之胺基酸殘基。

名辭「包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基」係意指該胺基酸殘基係該非多肽分子部分所結合（就引入之胺基酸殘基而言）或原本可能結合（就除去之胺基酸殘基而言）者。

藉由除去及/或引入包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基，咸可能專一修改本發明之多肽，以使該分子更易與該所選之非多肽分子部分複合、使該複合模式最適化（如，確保該非多肽分子部分在該多肽表面之最適分布，並因而，如，有效遮蔽抗原表位及該多肽之其他表面部分，同時不顯著損害其功能）。舉例而言，藉由引入連附基團，該多肽於該相關非多肽分子部分所結合之特定胺基酸殘基內容上獲得改變，因而達成更為有效、特定及/或廣泛之複合。藉由除去一或多個連附基團，其可能避免在此種複合作用具有不利性之多肽部分與該非多肽分子部分進行複合，如，在位於或接近該多肽功能位點之胺基酸殘基處（因此種位點處之複合作用可造成該所得複合物之失活或是降低之CD80-或CD86-結合或是降低之免疫抑制活性）。同時，移除鄰近另一連附基團處之連附基團可能為有利者。

包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基（不論其係既有之殘基或是除去或引入之殘基）係根據該非多肽分子部分之性質而選擇，並在部分情形下，根據欲使用之複合方法而選擇。舉例而言，當該非多肽分子部分係聚合物分子時，諸如，聚乙二醇（PEG）或聚氧化烯烴（PAO）衍生性分子，可作為連附基團之胺基酸殘基可選自由半胱胺酸、離胺酸（及/或該多肽之N-端胺基）、天冬胺酸、麩胺酸、組胺酸及精胺酸所組成之群。當該非多肽分子部分係糖類分子部分時，該連附基團係活體內或活體外之N-或O-糖基化位點，較佳者係N-糖基化位點。

在部分情形下，在本發明複合物之突變CTLA-4多肽部分中，其除去位在或接近受體結合位點之連附基團，諸如，藉由取代包含此種基團之胺基酸殘基。在部分情形下，其通常不會將包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基（諸如，半胱胺酸或離胺酸）引入至位在或接近該突變CTLA-4多肽之受體結合位點處。

藉由複合非多肽分子部分，本發明之突變CTLA-4多肽可經修飾，以遮蔽並因而修飾或摧毀存在於該突變CTLA-4多肽中之抗原表位或以其他方式使其失活。突變CTLA-4多肽之抗原表位可藉由使用技藝中已知之方法而辨識，其亦稱為抗原表位作圖，參見，如，Romagnoli et al., J. Biol. Chem. 380(5):553-9（1999），DeLisser HM, Methods Mol Biol, 1999, 96:11-20，Van de Water et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 85（3）:229-35（1997），Saint-Remy JM, Toxicology 119（1）:77-81（1997）。

可用於進行複合及存在於突變CTLA-4多肽中之確切連附基團數目取決於欲藉由複合而達成之作用。該欲取得之作用係，如，依賴複合之性質及程度（如，該非多肽分子部分之身分、所欲或可能複合該多肽之非多肽分子部分數目、其應在何處複合或是何處應避免複合等）。舉例而言，如欲取得降低之免疫原性，連附基團之數目（以及位置）應足以遮蔽大部分或全部之抗原表位。這一般而言是在較大部分之該突變CTLA-4多肽獲得遮蔽之情形下取得。抗原表位之有效遮蔽一般而言是在當該可用於複合之連附

基團總數係在1-6個連附基團之範圍中時達成（如，1-5個），諸如，在1-3個連附基團之範圍中（諸如，1、2或3個）。

功能性之活體內半生期可取決於該複合物之分子量，而用以提供增加半生期所需之連附基團數目因此取決於該所論非多肽分子部分之分子量。部分此等複合物包含1-6個（如，1-5個），諸如，1-3個（如，1、2或3個）非多肽分子部分，其各具有約100-2000道耳吞（Da）之分子量，諸如約200 Da、約300 Da、約400 Da、約600 Da、約900 Da、約1000 Da或約2-40 kDa，諸如約2 kDa、約5 kDa、約12 kDa、約15 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa或約60 kDa。

在本發明之複合物中，其部分、大部分或實質上全部之可複合性連附基團皆由該相關非多肽分子部分佔據。

本發明之複合物可具有一或多個下列之改良特性：(a) 增加之血清半生期及/或功能性活體內半生期，(b) 降低之抗原性或免疫原性，(c) 增加之貯存安定性，(d) 增加之生物可利用性，(e) 降低之效應子功能，或是 (f) 降低或抑制之二或多個本發明分子間之自體連結（如，降低之凝聚物形成）。舉例而言，該複合物可具有相較於hCTLA-4或是相較於對應未複合多肽之降低免疫原性，如，至少10%之降低，諸如至少25%之降低，諸如至少50%之降低，如，至少75%之降低，相較於該未複合多肽或是相較於hCTLA-4。該複合物可具有相較於參照分子（諸如，hCTLA-4）或是相較於對應未複合多肽之增加功能性活體內半生期及/或增加血清半生期。特別較佳之複合物係該等複合物，其中該複合物之功能性活體內半生期（或血清半生期）與該參照分子之功能性活體內半生期（或血清半生期）間之比例係至少1.25，諸如至少1.50，諸如至少1.75，諸如至少2，諸如至少3，諸如至少4，諸如至少5，諸如至少6，諸如至少7，諸如至少8。該半生期係在實驗動物（諸如，大鼠或猴）體內，且可根據靜脈或皮下投藥而便利測定。在另一態樣中，該複合物可具有相較於參照分子（諸如，hCTLA-4）或是相較於對應未複合多肽之增加生物可利用性。

該欲偶合該多肽之聚合物分子可為任何適當之聚合物分子，諸如，天然或合成之同元聚合物或異元聚合物，一般而言具有300-100,000 Da範圍之分子量，諸如，300-20,000 Da，較佳者係在500-10,000 Da範圍內，甚至更佳者係在500-5000 Da範圍內。

同元聚合物之實例包括多元醇（意即，聚-OH）、聚胺（意即，聚-NH_2）及聚羧酸（意即，聚-COOH）。異元聚合物係一種聚合物，其包含一或多種不同之偶合基團，諸如，如，羥基及胺基。適當聚合物之實例包括選自由聚氧化烯烴（POA），包括聚烯烴基二醇（PAG），諸如，聚乙二醇（PEG）及聚丙二醇（PPG）、支鏈PEGs、聚乙烯醇（PVA）、聚羧酸、聚乙烯吡咯啶酮、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、葡聚糖，包括羧甲基葡聚糖或是適用於降低免疫原性以及/或是增加功能性活體內半生期及/或血清半生期之任何其他生物聚合物所組成之群的聚合物分子。聚合物分子之另一實例係人類白蛋白或另一大量血漿蛋白。一般而言。聚乙二醇衍生性聚合物係生物可相容、無毒性、無抗原性、無免疫原性、具有各種水可溶性、且可輕易自活生物體排泄者。

PEG係待使用之較佳聚合物分子，因其相較於，如，多醣類，諸如，葡聚糖，或其類似者，僅具有極少數可進行交聯之反應基團。特定言之，單功能性PEG，如，單甲氧基聚乙二醇（mPEG）係具有益處者，因其偶合化學相對簡單（僅有一個反應基可用於與該多肽上之連附基團複合）。因此，其排除了交聯之風險，而該所得之多肽複合物即較為勻質，且該聚合物分子與該多肽之反應則較易控制。當該分子經PEG化時，其通常包含1、2、3、4或5個聚乙二醇（PEG）分子。各個PEG分子可具有約5 kDa（千道耳吞）至100 kDa之分子量，包括，如，約10 kDa、約12 kDa、約20 kDa、約40 kDa。適當之PEG分子可自Shearwater Polymers, Inc.及Enzon, Inc.取得，且其可選自SS-PEG、NPC-PEG、醛-PEG、mPEG-SPA、mPEG-SCM、mPEG-BTC、SC-PEG、三氟乙基磺酸單甲氧基化（tresylated） mPEG （US 5,880,255）或是氧羰基-氧基-N-二甲醯亞胺-PEG （US 5,122,614）。

在一態樣中，本發明提供分離或合成之複合物，其包含：(a)本發明之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體或單體突變CTLA-4-Ig、多聚體突變CTLA-4 ECD多肽、多聚體突變CTLA-4-Ig)；以及（b） 至少一種非多肽分子部分，諸如，如，1-10、1-9、1-8、1-7、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1、2或3個非多肽分子部分連附於該多肽上，其中該複合物可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）及/或其任一或兩者之胞外域（包括hCD80-Ig及/或hCD86-Ig)，以及/或是具有誘發抑制免疫反應之能力（如，T細胞相關性免疫反應)。例示性之多肽包括該等與選自SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之群的多肽序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性者。在部分情形下，該複合物包括二、三、四或多個非多肽分子部分。在部分情形下，該複合物之多肽的胺基酸序列進一步包含一或多個取代，其各引入一個該非多肽分子部分之連附基團（如，藉著以包含該非多肽分子部分連附基團之不同殘基取代該多肽序列之胺基酸殘基，或是藉著在該多肽序列中插入包含該非多肽分子部分連附基團之額外胺基酸殘基)。

複合物可包含二或多個本發明之多肽。在部分情形下，非多肽分子部分係共價連附該等多肽之任一或兩者。如該複合物包含二或多種相同之本發明多肽，一般而言係有相同類型及數目之非多肽分子部分連附於各個此等多肽上，通常係以相同方式連附各多肽上之對應連附基團。如上所註記，該非多肽分子部分可包含，如，糖類分子，其視情況可連附於N-糖基化位點，或是聚合物，諸如，如，聚乙二醇分子部分。該聚乙二醇分子部分可共價連附於本發明多肽之半胱胺酸殘基或離胺酸殘基。在部分情形下，該聚乙二醇分子部分係共價連附於該多肽之N-端胺基。包含本發明突變CTLA-4-Ig之複合物可敘述為本發明之突變CTLA-4-Ig複合物。亦包括複合物之多聚體。多聚體複合物包括二或多個複合物，其中至少一個複合物係包含至少一種本發明多肽之本發明複合物。在多聚體複合物中之該等複合物可為（但不一定必須）彼此

相同。

如上所論，本發明之多肽，包括本發明之融合蛋白，常可進行糖基化。本發明之多肽及融合蛋白可進一步進行（或經修飾以使其可進行）其他形式之後轉譯修飾，包括，如，羥化、脂質或脂質衍生物之連附、甲基化、十四烷基化、聚乙二醇化、磷酸化及硫酸化。可致使本發明之多肽及融合蛋白進行之其他後轉譯修飾包括乙醯化、醯化、ADP-核糖基化、醯胺化、核黃素之共價連附、原血紅素分子部分之共價連附、核苷酸或核苷酸衍生物之共價連附、磷脂醯肌醇之共價連附、交聯、環化、雙硫鍵形成、脫甲基化、甲醯化、GPI錨之形成、碘化、氧化、蛋白水解加工、異戊烯化、外消旋化、硒化、精胺酸化及泛素化。其他常見之蛋白修飾述於，如，Creighton, 上述文獻，Seifter et al., Meth. Enzymol. 18:626-646 （1990），及Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663:48-62（1992）。在宿主細胞中自核酸表現之多肽或融合蛋白之後轉譯修飾根據該多肽表現所在之宿主種類或宿主細胞類型而各異。舉例而言，糖基化作用通常不會在細菌宿主（諸如，大腸桿菌）中發生，並在桿狀病毒系統中有相當之變異（相較於哺乳動物細胞系統）。因此，在需要糖基化作用時（其通常係大部分本發明多肽之情形），多肽或融合蛋白應在糖基化宿主中表現（生產），一般而言係真核細胞（如，哺乳動物細胞或昆蟲細胞）。以後轉譯修飾而進行之多肽或融合蛋白之修飾可由任何適當之技術驗證，包括，如，X光散射、NMR顯影、質譜分析及/或層析（如，反相層析、親和層析或GLC）。

該多肽或融合蛋白亦可或是或可包含任何適當數目之非天然胺基酸（如，β胺基酸），及/或其他胺基酸（如，硒代半胱胺酸（selenocysteine）），或是胺基酸類似物，諸如該等列於Manual of Patent Examining Procedure § 2422 （7th Revision – 2000）者，其可由蛋白合成納入，諸如，經由固相蛋白合成（如述於，如，Merrifield, Adv. Enzymol. 32:221-296 （1969）以及其他其中所引述之參考文獻）。本發明之多肽或融合蛋白可藉由納入至少一個經

修飾之胺基酸而進一步修飾。該一或多個經修飾胺基酸之納入可可有益於，例如，(a) 增加多肽或融合蛋白之血清半生期，(b) 降低多肽或融合蛋白之抗原性，或是 (c) 增加多肽或融合蛋白之貯存安定性。胺基酸可在重組生成期間進行，例如，共轉譯性或後轉譯性之修飾(如，在於哺乳動物細胞中表現期間，在N-X-S/T基序進行N-連結性糖基化作用)，或是可由合成方式進行修飾。經修飾胺基酸之非限制性實例包括糖基化胺基酸、硫酸化胺基酸、異戊烯化（如，法尼基化、四異戊二烯化（geranylgeranylated））胺基酸、乙醯化胺基酸、醯化胺基酸、PEG化胺基酸、生物素化胺基酸、羧化胺基酸、磷酸化胺基酸及其類似者。適於引導熟習技藝者進行胺基酸修飾之參考文獻在文獻中相當充分。實例操作流程可見於Walker（1998） Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, Towata, NJ。該經修飾之胺基酸可選自糖基化胺基酸、PEG化胺基酸、法尼基化胺基酸、乙醯化胺基酸、生物素化胺基酸、複合脂質分子部分之胺基酸、以及複合有機衍化劑之胺基酸。

本發明進一步提供具有上述特性之多肽（包括融合蛋白），其尚包含可影響該多肽（或融合蛋白）生物功能（如，免疫原性、靶向及/或半生期）之額外胺基酸序列。

本發明之多肽或融合蛋白可進一步包括除外信號序列之靶向序列，或是在信號序列外尚包括靶向序列。舉例而言，該多肽或融合蛋白可包含一序列，其可靶向位於特定細胞類型上之受體（如，單核細胞、樹狀細胞或相關細胞），以提供該多肽對於此等細胞及/或相關組織之靶向傳遞。信號序列述於文，且其包括膜定位/錨定序列（如，中止轉移序列、GPI錨序列）及其類似者。

本發明多肽（包括本發明之融合蛋白）之其中一種特別有用之融合配對物係可協助該多肽純化之肽序列，如，多肽純化亞序列。本發明之聚核苷酸可包含一編碼序列，其以符合讀框之方式融合標記胺基酸序列，其可，如，協助該經編碼多肽純化。此等純化協助性肽功能域或多肽純化亞序列包括，但不限於，金屬螯合肽，諸如，組胺酸-色氨酸模組，其可容許在經固定之金屬上進

行純化，諸如，六組氨酸肽或其他聚組胺酸序列（其中一種編碼此種標記之序列被納入可由QIAGEN, Inc. （Chatsworth, California）取得之載體中）、可結合麩胱甘肽之序列（如，麩胱甘肽-S-轉移酶（GST））、血球凝集素（HA）標記（對應於衍生自流感血球凝集素蛋白之一抗原表位；Wilson et al., Cell 37:767（1984））、麥芽糖結合蛋白序列、用於FLAGS延伸/親和純化系統中之FLAG抗原表位（Immunex Corp, Seattle, WA）（市售可得之FLAG抗原表位亦可經由Kodak （New Haven, Connecticut）取得）、E-抗原表位標記（E-tag）、硫氧還蛋白（TRX）、親和素，及其類似者。純化協助性抗原表位標記已述於技藝中（參見，如，Whitehorn et al., Biotechnology 13:1215-19 （1995））。多肽可包括e-his標記，其可包含一聚組胺酸序列以及一抗-e-抗原表位序列（Pharmacia Biotech Catalog）；e-his標記可以標準技術製備。在該純化域及該多肽間納入一蛋白酶可切割性多肽連接子序列可用於協助純化。組胺酸殘基可協助在IMIAC上進行純化（固定金屬離子親和層析（IMAC），如述於Porath et al. Protein Expression and Purification 3:263-281 （1992）），而腸激酶切割位點則可提供一種用以使該多肽由該融合蛋白分離之方法。亦可使用pGEX載體（Promega; Madison, WI）而以與麩胱甘肽-S-轉移酶（GST）之融合蛋白的形式表現外源多肽。一般而言，此等融合蛋白係可溶性者，且可藉由吸收至配位體-瓊脂糖珠上（如，麩胱甘肽-瓊脂糖，就GST-融合物之情形而言），接著再在自由配位體之存在下進行溶析而輕易自經裂解之細胞中純化。多肽純化協助性亞序列之其他實例以及其對蛋白純化之應用述於，如，國際專利申請公開案WO 00/15823。在表現目標多肽並以此等融合配對物或其他如上所述之方法分離後，可使用蛋白再折疊步驟，如需要，以完成該成熟多肽之構形。

本發明之融合蛋白亦可包括一或多個額外之肽片段或肽部分，其可促進該融合蛋白之偵測。舉例而言，可將報導肽片段或部分（如，綠螢光蛋白（GFP）、β-半乳糖苷酶或其可偵測功能域）

納入該融合蛋白中。其他可與本發明多肽複合之標記分子包括放射核素、酶、螢光團、小分子配位體及其類似者。此等偵測促進性融合配對物特別可用於在本文他處所論及之診斷技術用融合蛋白。

在另一態樣中，本發明之多肽可包含一融合配對物，其可促進該多肽之安定性、該多肽之分泌（非信號靶向）或兩者。舉例而言，該多肽可包含免疫球蛋白（Ig）域，諸如，包含Fc鉸鏈區、CH2域及CH3域之IgG多肽，其可促進該多肽之安定性及/或分泌。

該等融合蛋白肽片段或肽部分可以任何適當方式連結。該融合蛋白之各種不同多肽片段或部分可經共價相連（如，藉由肽或雙硫鍵）。該等多肽片段或部分可直接融合（如，本發明之抗原性或免疫原性序列之C-端可與純化序列或異源免疫原性序列之N-端融合）。該融合蛋白可在該等肽部分之間包括任何適當數目之經修飾鍵結，如，同電子排列體。或者或是此外，該融合蛋白可在一或多個多肽片段或部分之間包括肽連接子，其包括一或多個不形成該生物活性肽部分之部分的胺基酸序列。可使用任何適當之肽連接子。此種連接子可為任何適當之大小。一般而言，該連接子係小於約30個胺基酸殘基，小於約20個胺基酸殘基，及/或小於約10個胺基酸。該連接子主要可包含中性胺基酸殘基，或係由其組成。適當之連接子通述於，如，美國專利第5,990,275、6,010,883、6,197,946號，以及歐洲專利申請案0 035 384。如需要分離肽片段或肽部分，可使用可協助分離之連接子。此種連接子之實例之一述於美國專利第4,719,326號。「撓性連接子」可為較佳者，其一般而言係由甘胺酸及/或絲胺酸殘基之組合構成。此種連接子之實例述於，如，McCafferty et al., Nature 348:552-554 （1990），Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 （1988），Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362-1367 （1990），及Cheadle et al., Molecular Immunol. 29:21-30 （1992），Bird et al., Science 242:423-26 （1988），以及美國專利第5,672,683、6,165,476及6,132,992號。

連接子之使用亦可降低對於該融合蛋白之非所欲性免疫反

應，該融合蛋白係藉著融合兩個肽片段或肽部分而產生，其可造成非所欲之MHC I及/或MHC II抗原表位存在於該融合蛋白中。除使用連接子外，經辨識之非所欲性抗原表位序列或是毗鄰序列可經PEG化（如，藉由插入離胺酸殘基以促進PEG連附）以遮蔽經辨識之抗原表位不使其暴露。其他用以降低本發明融合蛋白免疫原性之技術可結合該融合蛋白之投與而使用，包括提供於美國專利第6,093,699號之技術。

製備多肽

用以製備及分離本發明多肽（包括本發明融合蛋白）之重組方法述於下文。除重組製備外，該等多肽可使用固相技術而以直接之肽合成進行製備（參見，如，Stewart et al.（1969）Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield（1963） J. Am. Chem. Soc 85:2149-2154）。肽合成可使用手動技術或是藉由自動化而進行。自動化之合成可，例如，使用Applied Biosystems 431A肽合成儀（Perkin Elmer, Foster City, Calif.），根據製造商所提供之指示而達成。舉例而言，可分別以化學合成亞序列，並使用化學方法結合，以提供突變CTLA-4多肽或其功能性片段。或者，此等序列可自任何專門生產多肽之公司訂購。最常見者，本發明之多肽係藉由表現編碼核酸並回收多肽而製備，如，如下所述。

本發明提供用以製備本發明多肽（包括融合蛋白）之方法。其中一個此種方法包含將任何本文所述之核酸引入細胞種群中（該核酸係以可操作之方式連結可有效生產該經編碼多肽之調控序列），在培養基中培養該等細胞以生產該多肽，在自該等細胞或自培養基中分離該多肽。使用足以協助該等細胞攝入（轉染）及/或表現該多肽之核酸量。該培養基可為任何本文及實例中所述者。其他培養基則係熟習技藝者所知。該核酸係以任何本文所述之傳遞方法引入此等細胞中，包括，如，注射、無針注射裝置、基因槍、電穿孔（如，DNA電穿孔裝置，Inovio Biomedical Corp.

（San Diego））、穿皮傳遞、被動攝入等。本發明之核酸可為載體之部分，該載體諸如重組表現載體，包括DNA質體載體、病毒載體或任何本文所述之載體。該包含本發明核酸之核酸或載體可如本文、上文、以及下文之實例所述進行製備及調配。此種核酸或表現載體可在活體中引入哺乳動物之細胞種群中，或者可將所選之哺乳動物細胞（如，種瘤細胞）自該哺乳動物移除，再在活體外將該核酸表現載體引入此等細胞種群中，其引入之量係足以造成該經編碼多肽之攝入及表現。或者，可在試管中使用培養之細胞製備包含本發明核酸之核酸或載體。在一態樣中，該製備本發明多肽之方法包含在一細胞種群中引入包含任何本文所述核酸之重組表現載體，其量及調配係將可造成該載體之攝入及該多肽之表現；任何本文所述之引入/傳遞形式，將該表現載體投與至哺乳動物體內；再自該哺乳動物或是自該哺乳動物之副產物而分離該多肽。適當之宿主細胞、表現載體、以包含編碼本發明多肽之核酸序列的表現載體轉染宿主細胞之方法、細胞培養、以及用以生產及自細胞培養中回收此種多肽之流程在下文標題為「本發明核酸」之章節詳細敘述。其他之生產方法則在後文之實例中討論。

如上所註記，本發明之多肽（其包括本發明之融合蛋白）可進行各種變化，諸如，一或多個胺基酸或核酸之插入、缺失及取代，其可為保守性或非保守性者，包括在，如，此等變化可能提供其用途中之某些利益，如，在其治療或預防用途，或是投藥或診斷應用。用以藉由使用胺基酸之取代、缺失、插入及添加而製備多肽變體之流程係技藝中之慣常流程。多肽及其具有所欲結合CD80及/或CD86或其片段（如，ECD）之能力或是如本文他處詳述之在活體外或活體內抑制免疫反應之能力的變體可由熟習技藝者所知之分析以及本文所述之分析輕易辨識。參見，如，提供於下文實例中之分析。

本發明之核酸，其在後文詳述，亦可進行各種變化，諸如，在一或多個密碼子中之一或多個核酸之一或多個取代，以使該特定密碼子編碼相同或不同之胺基酸，造成保守性或非保守性之取

代，或是該序列中一或多個核酸之缺失。該等核酸亦可經修飾以包括一或多個密碼子，其可提供在一表現系統中之最適表現（如，哺乳動物細胞或哺乳動物表現系統），同時，如需要，該一或多個密碼子仍編碼該（等）相同之胺基酸。用以藉由使用核酸之取代、缺失、插入及添加以及簡併密碼子而製備核酸變體之流程係技藝中之慣常流程，而該等核酸變體編碼具有本文所述所欲特性之多肽（如，結合CD80及/或CD86之能力，以及/或是在活體外或活體內抑制免疫反應之能力），其可輕易使用本文所述之分析而辨識。此等核酸變化可能可在其治療或預防用途或是投與或診斷應用提供某些利益。在一態樣中，該等核酸及多肽可經諸多方式修飾，只要其分別包含一核酸或多肽序列，與對應之本發明突變CTLA-4多肽編碼核酸或突變CTLA-4多肽實質上相同。

本發明之核酸

本發明提供分離或重組之核酸（亦在本文中稱為聚核苷酸），其集合稱為「本發明之核酸」（或「本發明之聚核苷酸」），其編碼本發明之多肽。本發明之核酸，包括所有下述者，可用於重組製備（如，表現）本發明之多肽，一般而言係經由表現包含編碼該多肽或其片段之序列的質體表現載體；作為治療劑；作為預防劑；作為診斷工具；作為互補或部分互補核酸存在之診斷探針（包括用以偵測野生型CTLA-4核酸）。舉例而言，本發明之核酸，包括所有下述者，係因其編碼可用於在活體外及/或活體內之應用中壓抑或抑制免疫反應（如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）之誘發、發炎、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應）之多肽而具有用途，該等應用包括，如，用於治療其中需要抑制免疫反應之免疫系統疾病、病症及病況的預防或治療方法（如，用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞或器官移植排斥之方法）。本發明之核酸亦可納入可用於基因療法、DNA疫苗接種及免疫抑制

療法之表現載體中。本發明核酸及包含此等核酸之載體的其他用途述於本文他處。

在一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼任何上文述於標題為「本發明之多肽」之章節以及本文他處之本發明多肽（包括任何融合蛋白等）。本發明亦提供分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼任何上文及本文他處所述本發明多肽（包括任何融合蛋白等）之二或多者之組合。其亦包括一種核酸，其編碼任何本發明之多肽，諸如，如，突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其包含一密碼子序列，其實質上經最適化以在哺乳動物宿主（諸如，人類）體內進行表現。

舉例而言，在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，或是其互補聚核苷酸序列，其中該多肽可結合CD80及/或CD86，或是CD80及/或CD86之多肽片段（如，CD80及/或CD86之胞外域），以及/或是可在活體外或活體內抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。其他有關此等多肽功能特性及特徵之細節述於上文之「本發明之多肽」中。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約等於hCTLA-4 ECD之胺基酸長度的胺基酸長度；諸如，如，110-138、112-132、118-130,119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基。編碼突變CTLA-4 ECD多肽之例示性核酸包含示於SEQ ID NOS:1-73之序列，但不限於，如，分別具有示於SEQ ID NOS:80-152之核苷酸序列的核酸。舉例而言，編碼示於SEQ ID NO:1之多肽（純系D3-1）的例示性核酸係示於SEQ ID:80之核酸。亦包括任何此等核酸之片段，其中此種片段編碼可結合CD80及/或CD86及或其任一或兩者之ECD，以及/或是具有壓抑免疫反應之能力的多肽。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含核苷

酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽），其包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，且（b） 其中該多肽序列中於位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的該多肽序列之對應位置處的胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86及/或其任一或兩者之胞外域，以及/或是可在活體外或活體內抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。亦即，在此等所選多肽序列該位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係未經刪除或取代。部分此等核酸編碼多肽，其包含一序列，與該所選多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且在選自胺基酸位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106中之2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13及/或14個位置，包括與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同之胺基酸殘基。此等多肽可與該所選多肽序列具有胺基酸缺失、添加及/或胺基酸取代之差異。胺基酸取代可為保守性或非保守性之取代。例示性之保守性取代述於標題為「序列變異」之章節中。部分此等多肽包含一序列，其具有約118-130、119-129、120-128、121- 127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。例示性之核酸包括，但不限於，如，該等包含示於SEQ ID NOS:80-152之核苷酸序列者。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且（b） 在對應於SEQ ID NO:159多肽序列之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置包含至少一個胺基酸取代，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可在活體外及/或活體內抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等核酸編碼

多肽，其在相對示於SEQ ID NO:159之序列的選自由位置50、54、55、56、64、65、70或85所組成之群的位置包含2、3、4、5或6個胺基酸取代。部分此等核酸編碼多肽，其尚在對應相對SEQ ID NO:159之位置104及/或30的位置包含胺基酸取代。部分此等核酸編碼多肽，其包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置70（如，S70F）、位置64（如，S64P）、位置50（如，A50M）、位置54（如，M54K/V）、位置65（如，I65S）、位置56（如，N56D）、位置55（如，G55E）、位置85（如，M85A）及/或位置24（如，A24E）。任何此種多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104（視情況係L104E/D，如，L104E）、位置30（如，T30N/D/A）及/或位置32（如，V32I）。部分此等核酸編碼多肽，其包含一或多個取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此等經編碼之多肽包含一序列，其具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之胺基酸長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

本發明亦提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其包含（i）與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的任何多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性，以及（ii）位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等核酸編碼多肽，其包含相對該所選序列之下列一或多者：位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基、位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基、位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基、位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基、位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位

置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基、位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基、位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基、以及位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代係S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86 （及/或其任一或兩者之ECD），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等核酸編碼多肽，其可進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及(b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且其中該多肽可結合CD80

及/或CD86 及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等經編碼之多肽包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，或是其互補聚核苷酸序列，其中該核酸編碼多肽，其可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。包含以SEQ ID NOS:80-158所辨識之聚核苷酸序列的例示性核酸分別編碼包含以SEQ ID NOS:1-79所辨識之多肽序列的例示性多肽。包含以SEQ ID NOS:201-204所辨識之聚核苷酸序列的例示性核酸分別編碼包含以SEQ ID NOS:197-200所辨識之多肽序列的例示性多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含：（a）聚核苷酸序列，與一RNA聚核苷酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該RNA聚核苷酸序列包含一DNA序列，選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群，其中該DNA序列中所有之胸腺嘧啶核苷酸殘基經尿嘧啶核苷酸殘基置換；（b）（a）之互補聚核苷酸序列；或是（c）（a）或（b）之任何聚核苷酸序列之片段，其中該核酸編碼多肽，其（i）可結合CD80及/或CD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是（ii）具有在活體外或活體內抑制免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）之誘發、發炎、

抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應），或是其互補聚核苷酸序列。

本發明包括一種分離或重組之核酸，其編碼任何上述本發明多肽之任何多聚體（如，二聚體、四聚體等）。如他處所詳細討論者，包含兩個本發明多肽（包括兩個融合蛋白）之二聚體一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生一或多個共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在多肽中之半胱胺酸殘基與第二多肽中之半胱胺酸殘基間產生。其他多聚體可以類似方式形成。舉例而言，在一非限制性之態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個多肽之重組多肽二聚體，其中各個此種多肽包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。其亦包括一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個多肽之多肽二聚體，其中各個此種多肽與hCTLA-4 ECD之多肽序列（SEQ ID NO:159）具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置；且該多肽視情況尚包含取代L104E，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。關於此等二聚體功能特性之其他細節於上文討論。

本發明亦提供一種分離或重組之核酸，其編碼任何本發明之融合蛋白，包括任何本發明之多聚體融合蛋白（如，二聚體、四聚體等）。在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，以及（b） Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是

CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。包含兩個此等單體融合蛋白之二聚體融合蛋白一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在一單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間產生。其他多聚體可以類似方式形成。關於此等融合蛋白功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），各個單體融合蛋白包含：（a） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，以及（b） Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制或壓抑免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。該兩個單體融合蛋白在表現時係經由至少一個雙硫鍵而連結在一起，該等雙硫鍵係在存在於各個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，（a）之多肽的C-端係與（b）之Ig Fc多肽的N-端共價連結或融合。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

其一般而言會在各個核酸序列之C-端包括中止密碼子（如，tga），當該序列係包括在表現載體中以表現目標蛋白時。舉例而言，各個編碼突變CTLA-4多肽或突變CTLA-4融合蛋白之本發明核苷酸序列可視情形進一步在其C-端包括中止密碼子，諸如，

TAA。可以不同之中止密碼子取代TAA，諸如，TGA中止密碼子。編碼野生型融合蛋白（如，hCTLA-4-Ig、hCD86-Ig等）之核酸序列亦可在其C-端包括中止密碼子。各個該等核苷酸序列可視情形進一步在其N-端包括編碼信號肽之核苷酸序列，以協助突變CTLA-4多肽或融合蛋白之分泌。

例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之多肽序列者。編碼SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之突變CTLA-4-Ig融合蛋白之例示性核酸分別示於SEQ ID NO:153-158、201-204及223-224。SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及221之融合蛋白序列分別與SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之蛋白序列相同，除外SEQ ID NOS:205-210之蛋白序列並不包括該C-端離胺酸（K）殘基；如上文所解釋，咸信該預測C-端離胺酸殘基（其係由緊鄰位於各個此種聚核苷酸序列之TAA中止密碼子之前之AAA密碼子編碼）會在加工或分泌之過程中由該所得之融合蛋白上切除。SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之核酸序列分別編碼SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之融合蛋白序列，其各在切割/喪失該C-端K殘基後，分別產生示於SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及 221之融合蛋白序列。

聚核苷酸序列SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224各亦在其N-端包括編碼示於SEQ ID NO:181或215之信號肽的核苷酸序列，該信號肽最終會自該成熟融合蛋白切除。聚核苷酸序列SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之各者之核苷酸殘基1-111 （如自各個此種聚核苷酸序列之N-端起始計算者）（核苷酸殘基1-111示於SEQ ID NO:215）編碼示於SEQ ID NO:216之37個胺基酸殘基的WT hCTLA-4信號肽，該信號肽最終會在該成熟突變CTLA-4融合蛋白單體或二聚體表現時受到切除；因此。就各個SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之核酸序列而言，編碼該成熟IgG2融合蛋白之第一胺基酸殘基（甲硫胺酸）的第一密碼子係由該核苷酸序列之核苷酸殘基112-114構成。如上所註記，在部分情形下，

該信號肽序列可僅包含如示於SEQ ID NO:182之胺基酸殘基1-35，而編碼此35-胺基酸殘基信號肽之核苷酸序列則示於SEQ ID NO:181。然而，分別位在位置36及37之經編碼離胺酸（K）及丙胺酸（A）（由該兩個密碼子AAA-GCC編碼）並不存在於所得之成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白中，並咸信係在加工過程中自該成熟之突變CTLA-4-Ig融合蛋白上切除。該成熟之突變CTLA-4蛋白序列一般而言係以存在於該經編碼突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺基酸殘基位置38的甲硫胺酸殘基起始。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個相同單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。其亦提供一種分離或重組之核酸，其編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之多肽序列者；編碼以突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體形式表現之此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白之例示性核酸包括該等包含分別示於SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之聚核苷酸序列者。其他例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及222之多肽序列，其係以融合蛋白二聚體形式表現；此等融合蛋白缺乏C-端離胺酸殘基，因其一般而言會在加工過程中或是分泌之前受到切除。編碼此等融合蛋白序列與該C-端離胺酸（該離胺酸於後切除）之例示性核酸分別包括SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其中該融合蛋白包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明包括一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，與選自由SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中此種核酸編碼突變CTLA-4-Ig蛋白二聚體，其可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含:（1）多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其中在該多肽序列中於胺基酸位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73之多肽）對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2）Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該二聚體可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其包含核苷酸序列，編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含

聚核苷酸序列，編碼包含兩個單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（a）與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且（b） 在對應於相對SEQ ID NO:159多肽序列之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置包含至少一個胺基酸取代；以及（2） Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。部分此種（a）之多肽包含至少一個取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此種（a）之多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104 （如，L104E/D）、位置30 （如，T30N/D/A）及/或位置32 （如，V32I）。其亦提供一種重組或分離之核酸，其編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（i） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，以及（ii） 在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置包括苯丙胺酸殘基，以及（2） Ig多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86 （或是

CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應之能力，或是其互補聚核苷酸序列。該經編碼之Ig多肽可包含Ig Fc多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。部分此等經編碼之二聚體相對該（1）（i）之所選多肽序列包含下列一或多者：位在對應位置24之位置的Glu殘基、位在對應位置30之位置的Asn殘基、位在對應位置32之位置的Ile殘基、位在對應位置50之位置的Met殘基、位在對應位置54之位置的Lys殘基、位在對應位置55之位置的Glu殘基、位在對應位置56之位置的Asp殘基、位在對應位置64之位置的Pro殘基、位在對應位置65之位置的Ser殘基、以及位在對應位置104之位置的Glu殘基。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86（以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號；以及（2） IgG Fc多肽，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86（或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。該Ig Fc多肽可包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。該經編碼之（1）之多肽可進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。

關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其包含核苷酸序列，編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號；以及（2） Ig多肽，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86 （或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分此等二聚體或單體中，該（1）之多肽包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其包含核苷酸序列，編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

本發明亦包括任何此等上述本發明核酸之片段，其中該等片段編碼多肽，其可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之

ECD，以及/或是具有壓抑或抑制免疫反應之能力。諸多此等核酸之片段將會表現多肽，其可結合hCD80及/或hCD86或是其ECD，或是可壓抑免疫反應，該等特性可以合理之實驗輕易辨識。核苷酸片段一般而言包含至少250、300、400、500、600、700、800、900、950、1000個或以上之核苷酸鹼基。

本發明包括一種分離或重組之核酸，其編碼一蛋白，包含一信號肽以及一本發明之多肽（其包括本發明之二聚體或單體融合蛋白），諸如本發明之突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其可結合CD80及/或CD86，以及/或是，可在活體外或活體內之分析及/或本文他處所詳述之方法中抑制免疫反應。該經編碼之信號肽序列（其可指引成熟多肽通過原核或真核細胞膜而分泌）一般而言係共價連結該多肽之胺端。可使用各種信號肽，其包括，如，示於SEQ ID NO:182之信號肽序列，其係由，如，示於SEQ ID NO:181之核苷酸序列編碼，或是示於SEQ ID NO:216之信號肽序列，其係由，如，示於SEQ ID NO:215之核苷酸序列編碼。本發明亦包括一種分離或重組之核酸，其編碼一蛋白，包含一信號肽、本發明之突變CTLA-4 ECD多肽、穿膜域及/或胞質域，如上文所詳細討論。

可使用全長人類CTLA-4蛋白之信號肽序列以指引本發明重組突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表現或分泌。在一態樣中，該hCTLA-4蛋白之信號肽包含該hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基1-37；此種信號肽序列示於SEQ ID NO:216。在此情形下，該成熟hCTLA-4蛋白序列一般而言係以位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。因此，可使包含示於SEQ ID NO:216之多肽序列的信號肽與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺（N）端融合或連結，諸如，藉由共價連結，以分別協助該突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表現或分泌。包含編碼SEQ ID NO:216之hCTLA-4信號肽序列之核苷酸序列的例示性核酸示於

SEQ ID NO:215。

當SEQ ID NO:216之信號肽序列係與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端融合或連結時，在該多肽或融合蛋白表現或分泌時，該信號肽會受到切割；該所得之成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言係以位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。

本發明包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:216）以及突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4 ECD多肽之N-端共價連結。其亦包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:216）以及突變CTLA-4-Ig（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4-Ig之N-端共價連結。其亦提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列（如，SEQ ID NO:215），編碼一信號肽（如，SEQ ID NO:216），以及核苷酸序列，編碼突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列）或突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列）。

在另一態樣中，該hCTLA-4蛋白之信號肽包含該hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基1-35；此種信號肽包含示於SEQ ID NO:182之肽序列。然而，在此情形下，該hCTLA-4蛋白分別位於位置36及37之兩胺基酸殘基離胺酸（K）及丙胺酸（A）一般而言並不存在於該成熟之分泌hCTLA蛋白中，如以蛋白定序測定者。因此，該所得之成熟hCTLA-4蛋白係以類似方式而位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸而起始編號。由於該全長hCTLA-4蛋白分別位於位置36及37之胺基酸殘基離胺酸（K）及丙胺酸（A）並不存在於該所得之成熟hCTLA蛋白中，咸信其已在加工過程中自該

成熟hCTLA蛋白上切除。包含編碼hCTLA-4信號肽序列（SEQ ID NO:182）之核苷酸序列的例示性核酸示於SEQ ID NO:181。

可使包含示於SEQ ID NO:182之肽序列的信號肽與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端融合或連結，諸如，藉由共價連結，以分別協助該突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表現或分泌。當SEQ ID NO:182之信號肽序列係與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端融合或連結時，在該多肽或融合蛋白表現或分泌時，該信號肽會受到切割；該所得之成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白因此一般而言係以位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。由於該全長hCTLA-4蛋白分別位於位置36及37之胺基酸殘基離胺酸（K）及丙胺酸（A）並不存在於該所得之成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白中，咸信其已在加工過程中自該突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白上切除。

本發明包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:182）以及突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4 ECD多肽之N-端共價連結。其亦包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:182）以及突變CTLA-4-Ig（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4-Ig之N-端共價連結。其亦提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列（如，SEQ ID NO:181），編碼一信號肽（如，SEQ ID NO:182），以及核苷酸序列，編碼突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列）或突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列）。

本發明之核酸可進一步包含一或多種適當之其他核苷酸序

列。舉例而言，由於本發明之多肽（其包括本發明之融合蛋白）可包含一或多種其他多肽序列，諸如，多肽純化亞序列（諸如，如，選自抗原表位標記、FLAG標記、聚組胺酸序列、GST融合物之亞序列）、信號肽等，本發明包括編碼全部此等包含該等其他序列之多肽的核酸。例示性之信號肽如上文所討論，其在表現時一般而言係共價連結本發明多肽之N-端。舉例而言，編碼SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222中任一者之多肽序列的核酸可進一步包含編碼信號肽（諸如，SEQ ID NO:182之信號肽序列）之核酸，諸如，示於SEQ ID NO:181之核苷酸序列，或是示於SEQ ID NO:216之信號肽序列，其係由，如，示於SEQ ID NO:215之核苷酸序列編碼。此等核苷酸序列可直接以適當之讀框而彼此融合，以使該所得之核酸包含編碼本發明信號肽之核苷酸序列以及編碼本發明多肽之核苷酸序列。

本發明之核酸可以任何適當之技術分離，其中數者係技藝中所已知。本發明之分離核酸（如，在宿主細胞中製備並接著以任何事當之核酸純化技術進行實質上純化之核酸）可再次引入宿主細胞中或是再次引入細胞或其他生物環境或組合物中，其中其不再是主要之核酸種類，且不再與其他核酸分離。

幾乎任何分離或重組之本發明核酸皆可使用標準之技術而插入或融合適當之較大核酸分子，其包括，如，但不限於，染色體、質體、表現載體或基因盒、病毒基因組、基因序列、線性表現元件、細菌基因組、植物基因組或人工染色體，諸如，哺乳動物人工染色體（MAC），或是其酵母菌或細菌對應物（亦即，YAC或BAC），以形成重組核酸。在另一實例中，分離之本發明核酸可融合較小之核苷酸序列，諸如，啟動子序列、免疫刺激序列及/或編碼其他胺基酸之序列，諸如，其他抗原表位及或連接子序列，以形成重組核酸。

在部分情形下，重組或合成之核酸可以應用於宿主細胞內容之外的化學合成技術而產生（如，經由聚合酶連鎖反應（PCR）或化學合成技術而製備之核酸，其實例於本文進一步敘述）。

編碼本發明多肽（包括融合蛋白）之核酸可具有任何事當之化學組成，該組成可容許本發明多肽之表現或是其他所欲之生物活性（如，與其他核酸之雜交）。本發明之聚核苷酸可為RNA之形式或是DNA之形式，並包括mRNA、cRNA、重組或合成之RNA及DNA、以及cDNA。本發明之核酸一般而言係DNA分子，且通常係雙股DNA分子。然而，其亦提供包含任何本發明核苷酸序列之單股DNA、單股RNA、雙股RNA及雜交DNA/RNA核酸或是其組合。本發明之核酸可包括任何適當之核苷酸鹼基、鹼基類似物及/或骨架（如，由非磷酸二酯之硫代磷酸酯連結所形成或包含其之骨架，如，包含硫代磷酸酯或硫代磷酸酯骨架之DNA）。本發明之核酸如為單股時可為該編碼股或該非編碼（亦即，反義或互補）股。除編碼本發明多肽之核苷酸序列外（如，包含突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig之編碼序列的核苷酸序列），本發明之聚核苷酸序列尚可包含一或多種其他之編碼核苷酸序列，以使其編碼，如，融合蛋白、靶向序列（非信號序列）或其類似者（其更特定之實例於本文進一步討論），以及/或是可包含非編碼核苷酸序列，諸如，內含子、終止子序列或是5'及/或3'未轉譯區域（該等區域可有效使該編碼序列在適當宿主中進行表現），以及/或是控制元件，諸如，啟動子（如，天然或重組或換移（shuffled）之啟動子）。

咸特別可耐受位在編碼此種多肽之mRNA密碼子序列第三位置之核酸修飾。在特定態樣中，該核酸之至少一部分包含硫代磷酸酯骨架，並納入至少一個合成核苷酸類似物，取代該核酸序列中之天然核苷酸或添加在其之外。該核酸亦可或是或可包含非鳥嘌呤、腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶及胞嘧啶之鹼基添加。此等修飾可與較長之半生期有關，並因此可為本發明之核酸載體所欲者。因此，在一態樣中，本發明提供重組核酸及核酸載體（如下文進一步討論），該等核酸或載體包含至少一個前述之修飾，或是其任何適當組合，其中相較於無此種修飾或此等修飾之實質上相同核酸，該核酸可在哺乳動物宿主體內維持較長時間。可納入本發明核苷酸序列中之經修飾及/或非胞嘧啶、非腺嘌呤、非鳥嘌呤、

非胸腺嘧啶核苷酸之實例提供於，如，the Manual of Patent Examining Procedure § 2422 （7th Revision – 2000）。

咸須明瞭，編碼至少一種本發明多肽（其包括本發明之融合蛋白）之核酸，包括該等述於上文及本文他處者，並不限於直接編碼本發明多肽之表現或生成之序列。舉例而言，該核酸可包含核苷酸序列，其可經由似蛋白內含子之表現而造成本發明之多肽（如述於，如，Colson and Davis （1994） Mol. Microbiol. 12（3）:959-63，Duan et al.（1997）Cell 89(4):555-64，Perler（1998）Cell 92(1):1-4，Evans et al.（1999） Biopolymers 51(5):333-42，及de Grey, Trends Biotechnol. 18（9）:394-99 （2000））, 或是包含核苷酸序列，其包含自體剪接性內含子(或是其他自體剪接性RNA轉錄物)，可形成中間重組多肽編碼序列（如述於，如，美國專利第6,010,884號)。該核酸亦可或是或可包含可在RNA層級產生編碼該多肽之mRNA轉錄物，及/或可在DNA層級在轉錄之前藉由反式剪接機制（有關此等機制之原則述於，如，Chabot, Trends Genet.（1996） 12（11）:472-78，Cooper （1997） Am. J. Hum. Genet. 61（2）:259-66，及Hertel et al. （1997） Curr. Opin. Cell. Biol. 9（3）:350-57)，以造成其他剪接修飾的序列。由於遺傳密碼之固有簡併性，數種核酸可編碼任一特定之本發明多肽。因此，舉例而言，任何述於本文之特定核酸可藉著以根據基因密碼簡併性之相當密碼子（就該密碼子所代表之胺基酸而言）取代一或多個密碼子而進行修飾。亦可使用編碼與本發明之多肽序列具有相同或功能相當序列之多肽的核苷酸序列以合成、選殖或表現此種多肽。

一般而言，使用有關上述編碼本發明多肽之核酸（如，編碼突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig之核酸）之本文所例示技術，任何本發明之核酸皆可經修飾以增加其在特定宿主中之表現。任何本文所述之本發明核酸可經密碼子最適化以在特定宿主（一般而言係人類）中進行表現。各種用以進行密碼子最適化之技術係為技藝中所已知。最常用於特定宿主中之密碼子稱為最適密碼子，且該等不常使用者係歸類為罕見或低使用率密碼子（參見，

如，Zhang, S. P. et al. （1991） Gene 105:61-72）。密碼子可經取代以反應該宿主之偏好密碼子使用，此係稱為「密碼子最適化」或「控制生物種密碼子偏好」之流程。包含特定原核或真核宿主之偏好密碼子的最適化密碼子序列可用於增加轉譯率，或是生成具有所欲特性之重組RNA轉錄物，諸如，較長之半生期，相較於自非最適化序列所生成之轉錄物。用於產生密碼子最適化序列之技術係為已知（參見，如，Murray, E. et al. （1989） Nuc. Acids Res. 17:477-508）。亦可對轉譯中止密碼子進行修飾以反應宿主偏好。舉例而言，釀酒酵母（*S. cerevisiae*）及哺乳動物之偏好中止密碼子分別係UAA及UGA。單子葉植物之偏好中止密碼子係UGA，而昆蟲及大腸桿菌偏好使用UAA作為中止密碼子（參見，如，Dalphin, M.E. et al. （1996） Nuc. Acids Res. 24:216-218）。在其他密碼子內容中之密碼子安排亦可影響核酸序列之生物特性，而本發明亦預期為提供特定宿主所常用之密碼子內容安排的核酸修飾。因此，本發明之核酸可包含一密碼子最適化核苷酸序列，亦即，針對特定生物種而進行密碼子頻率最適化及/或進行密碼子對（亦即，密碼子內容）最適化者（如，該多肽可自一針對人類中之表現而進行最適化之聚核苷酸序列表現，該最適化係藉著置換根據密碼子頻率之「稀有」人類密碼子，或是置換密碼子內容，諸如，藉著使用諸如該等述於Buckingham et al. （1994） Biochimie 76（5）:351-54及美國專利第5,082,767、5,786,464及6,114,148號之技術）。

本發明之核酸可藉由切截一或多個該序列C-端部分之殘基而修飾。此外，可將各種不同之中止或終止密碼子包括在該核苷酸序列之末端，如下文進一步討論。

可將一或多種本發明之核酸包括於載體、細胞或宿主環境中，其中該本發明之編碼核苷酸序列係為異源基因。

本發明之聚核苷酸包括編碼任何可結合CD80及/或CD86以及/或是可抑制免疫反應之本發明多肽（或其多肽片段）之聚核苷酸序列，可在至少嚴格條件下與一或多種此種本文所述聚核苷酸序

列雜交之聚核苷酸，與任何此等聚核苷酸序列互補之聚核苷酸序列，以及所有上述者之變體、類似物或同源衍生物。編碼序列係指編碼特定多肽或蛋白域、該多肽之亞序列、區域或片段的核苷酸序列。編碼序列可編碼突變CTLA-4多肽或其具有功能特性（諸如，結合CD80及/或CD86之能力以及/或是抑制或壓抑免疫反應之能力）之片段。本發明之核酸可包含本發明突變CTLA-4多肽分別之編碼序列，以及其變體、類似物或同源衍生物。

本發明之核酸亦可見於與典型核酸組合調配物之組合中，其包括，在該等熟習技藝者所知之載體、緩衝劑、佐劑、賦形劑、稀釋劑及其類似者之存在下。

除非另有明示，本文所述之特定核酸亦隱含包括其經保守修飾之變體（如，簡併密碼子取代物）及互補序列，以及該序列所明示者。特定言之，簡併密碼子取代物可藉著產生其中一或多個所選（或全部）密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列而達成（Batzer et al.（1991）Nucl. Acid Res. 19:5081；Ohtsuka et al.（1985）J. Biol. Chem. 260:2605-2608；Cassol et al.（1992）；Rossolini et al.（1994）Mol. Cell. Probes 8:91-98）。

核酸之雜交

如上所註記，本發明包括可與本發明目標核酸雜交之核酸，諸如，如，選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸，或是其互補聚核苷酸序列，其中雜交係涵蓋該目標核酸實質上之全長。該雜交性核酸可在至少嚴格條件下或在至少高嚴格條件下雜交本發明之核苷酸序列，諸如，如，SEQ ID NO:80者。核酸雜交實驗之中度嚴格、嚴格及高度嚴格雜交條件係為已知。可予截何以達成此種嚴格性程度之因子實例簡短於本文中討論。

當核酸連結時，一般而言係在溶液中，其即為「雜交」。核酸可因各種已經詳細定性之物化力而雜交，諸如，氫鍵連結、溶劑排斥、鹼基堆積及其類似者。關於核酸雜交之詳細指引可見於P.

Tijssen （1993） Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes [生物化學及分子生物學實驗室技術--與核酸探針之雜交], vol. 24, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays [雜交原則及核酸探針分析策略之總論]," （Elsevier, NY）（後文稱為"Tijssen"），以及Ausubel, 上述文獻，Hames and Higgins （1995） Gene Probes 1, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England （Hames and Higgins 1）及Hames and Higgins （1995） Gene Probes 2, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England （Hames and Higgins 2），提供對於DNA及RNA （包括寡核苷酸）之合成、標記、偵測及定量之細節。

兩核酸序列實質上相同之指標之一係該兩分子可在至少嚴格條件下彼此雜交。辭句「專一雜交」係指一分子在嚴格條件下僅可與一特定核苷酸序列結合、雙鏈化或雜交，當該分序列存在於複合混合物（如，總體細胞） DNA或RNA中時。「實質上結合」係指一探針核酸與目標核酸之互補雜交，並包含少量之錯配，其可藉由降低該雜交基質之嚴格性而適應，以達成目標聚核苷酸序列之所欲偵測。

在核酸雜交實驗（諸如，南方及北方雜交）內容中之「嚴格雜交清洗條件」及「嚴格雜交條件」係具序列相關性，並在不同之環境參數下各為不同。關於核酸雜交之詳細指引可見於Tijssen（1993), 上述文獻，以及Hames and Higgins 1及Hames and Higgins 2, 上述文獻。

一般而言，其係選擇高嚴格條件，以使雜交係在約5° C或是低於該特定序列在指定離子力及pH下之熱熔點（T_m）下發生。T_m係50%之該試驗序列與一完全配對探針雜交之溫度(在指定離子力及pH下)。換言之，T_m係指該核酸雙鏈在特定條件下進行50%變性之溫度，且其代表該核酸雜交物安定性之一種直接度量。因此，T_m對應於由螺旋轉化為隨機捲曲之中點溫度；其取決於長度、核苷酸組成、以及較長核苷酸段落之離子力。一般而言，在「嚴格條

件」下，探針將會與其目標序列雜交，但不會與任何其他序列雜交。「極度嚴格條件」係選擇為等於特定探針之T_m。

DNA-DNA雙鏈之T_m可使用方程式（1）估計：T_m（°C）= 81.5°C + 16.6（$\log_{10}$M）+ 0.41（%G + C）– 0.72（%f）– 500/n，其中M係該單價陽離子（通常係Na+）之莫耳濃度，（%G + C）係鳥苷酸（G）與胞苷酸（C）之百分比，（%f）係形式化之百分比，且n係該雜交物核苷酸鹼基之數目（亦即，長度）。參見，Rapley, R. and Walker, J.M. eds., Molecular Biomethods Handbook （1998）, Humana Press, Inc.（後文稱為Rapley and Walker），Tijssen（1993）, 上述文獻。RNA-DNA雙鏈之T_m可使用方程式（2）估計：T_m（°C）= 79.8°C + 18.5（$\log_{10}$M）+ 0.58（%G + C）– 11.8（%G + C）2 – 0.56（%f）– 820/n，其中M係該單價陽離子（通常係Na+）之莫耳濃度，（%G + C）係鳥苷酸（G）與胞苷酸（C）之百分比，（%f）係形式化之百分比，且n係該雜交物核苷酸鹼基之數目（亦即，長度）。同上述文獻。上述之方程式1及2一般而言僅對長度大於約100-200核苷酸之雜交雙鏈為準確。同上述文獻。長度短於50核苷酸之核酸序列的T_m可如下計算：T_m（°C）= 4（G + C）+ 2（A + T），其中A（腺嘌呤）、C、T（胸腺嘧啶）及G係對應核苷酸之數目。

一般而言，在進行雜交分析時，未雜交之核酸材料會藉由一系列之清洗而除去，其嚴格度可根據所欲之結果而調整。低嚴格度之清洗條件（如，使用較高之鹽度及較低之溫度）可增加敏感性，但可產生非專一信之雜交信號及高背景信號。較高嚴格度之條件，（如，使用較低之鹽度及較接近雜交溫度之較高溫度）可降低背景信號，一般而言使其僅保留該專一信號。有關此等雜交技術之其他有用指引提供於，如，Rapley and Walker, 上述文獻（特定言之，有關此等雜交實驗，part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays [雜交原則及核酸探針分析策略之總論]"）, Elsevier, New York，以及Ausubel, 上述文獻，Sambrook, 上述文獻，Watson, 上

述文獻，Hames and Higgins （1995） Gene Probes 1, IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, England，及Hames and Higgins （1995） Gene Probes 2, IRL Press, Oxford Univ. Press, Oxford, England。

用以分析包含至少100核苷酸之至少兩個核酸之例示性嚴格（或普通嚴格）條件包括，在包含50%福馬林（或甲醯胺）及1毫克(mg)肝素之溶液中或是在南方或北方點漬中之濾膜上，於42°C下進行共置，其中該雜交隔夜進行。普通嚴格度清洗可使用，如，包含0.2x SSC之溶液在約65°C下處理約15分鐘而執行(關於SSC緩衝液參見Sambrook, 上述文獻)。通常在普通嚴格度清洗之前會先進行低嚴格度清洗，以除去背景探針信號。低嚴格度清洗可使用，如，包含2x SSC之溶液在約40°C下處理約15分鐘而執行。高嚴格度清洗可使用，如，包含0.15 M NaCl之溶液在約72°C下處理約15分鐘而執行。用於，如，超過100核苷酸之雙鏈之例示性中（普通）嚴格度清洗(嚴格度低於上述之普通嚴格度清洗)可在包含1x SSC之溶液中在約45°C下處理約15分鐘而執行。用於，如，超過100核苷酸之雙鏈之低嚴格度清洗實例係在包含4-6x SSC之溶液中在40°C下處理約15分鐘而執行。對短探針而言（如，約10-50核苷酸)，嚴格條件一般而言涉及小於約1.0 M Na^+離子之鹽濃度，一般而言係約0.01至1.0 M Na^+離子濃度（或其他鹽類)，pH 7.0至8.3，且該溫度一般而言係小於約30°C。嚴格條件亦可藉由添加諸如甲醯胺之去安定劑而達成。

例示性之中度嚴格條件包括在包含20%福馬林（或甲醯胺)、0.5x SSC、50 mM磷酸鈉（pH 7.6)、5x丹哈德溶液（Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖及20 mg/ml變性剪切鮭魚精子DNA之溶液中，於37°C下隔夜共置，接著再在1x SSC中於約37-50°C下清洗該濾膜，或是其實質上類似之條件，如，述於Sambrook, 上述文獻，及/或Ausubel, 上述文獻之中度嚴格條件。

高嚴格度條件係使用，例如，(1） 低離子力及高溫度進行清洗，諸如，0.015 M氯化鈉/0.015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉（SDS)，於50°C下，(2） 在雜交過程中使用變性劑，諸如，甲

醯胺，例如，50%（v/v）甲醯胺與0.1%牛血清白蛋白（BSA）/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯啶酮（PVP）/50 mM磷酸鈉緩衝液（pH 6.5），及750 mM氯化鈉，75 mM檸檬酸鈉，於42°C下，或是（3）使用50%甲醯胺，5x SSC （0.75 M NaCl，0.075 M檸檬酸鈉），50 mM磷酸鈉（pH 6.8），0.1%焦磷酸鈉，5x丹哈德溶液，經超音波破碎之鮭魚精子DNA（50 μg/ml），0.1% SDS，及10%硫酸葡聚糖，於42°C下，並在（i） 42°C下於0.2x SSC中，（ii） 在55°C下於50%甲醯胺中，及（iii） 在55°C下於0.1x SSC中（較佳結合EDTA）進行清洗之條件。

一般而言，為非相關探針於特定雜交分析中所觀察到者之2x或2.5x-5x （或較高）之信號對雜訊比指出偵測到專一性雜交。在本發明之內容中，兩序列間至少嚴格雜交之偵測指出與，如，本發明核酸之相對較強結構相似性或同源性。

如所註記，「高嚴格」條件係經選擇為約5° C或是低於該特定序列在指定離子力及pH下之熱熔點（T_m）。與關注核苷酸序列（如，探針）密切相近或相同之目標序列可在高嚴格條件下獲得辨識。較低嚴格度之條件則適用於互補性較低之序列。參見，如，Rapley and Walker；Sambrook，皆為上述文獻。

可使用競爭雜交作用以辨識本發明之核酸，且此競爭雜交法係區別本發明核酸之較佳方法。在本發明之內容中，兩核苷酸序列間高嚴格雜交之偵測可指出與，如，本文序列表中所提供核酸之強結構相似性/同源性。兩核苷酸序列間之高嚴格雜交作用可說明大於可由嚴格雜交條件所偵測得到之結構、核苷酸鹼基組成、排列或規則的相似性或同源性程度。特定言之，在本發明之內容中，高嚴格雜交作用之偵測可指出與，如，本文序列表中所提供核酸之強結構相似性或結構同源性（如，核苷酸結構、鹼基組成、排列或規則）。舉例而言，其需要辨識出可在嚴格條件下與本文之例示核酸雜交之試驗核酸。

因此，嚴格雜交之度量之一即係在高嚴格條件下（或極度嚴格條件，或是超高嚴格雜交條件，或是超-超高嚴格雜交條件）與

本發明核酸（如，包含選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸序列，或是其互補聚核苷酸序列之核酸）雜交之能力。任何試驗核酸之嚴格雜交（包括，如，高嚴格、超高嚴格或超-超高嚴格雜交條件)及清洗條件可由經驗輕易判定。

舉例而言，在判定高嚴格雜交其清洗條件時，其可逐漸增加該雜交及清洗條件（如，藉著增加該雜交或清洗之溫度、降低鹽濃度、增加清潔劑濃度及/或增加有機溶劑（諸如，福馬林）之濃度)，直到成所選之標準組為止。舉例而言，可逐漸增加該雜交及清洗條件，直到包含一或多種選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224，以及其互補聚核苷酸序列所組成之群之核酸序列的探針可結合完全配對互補目標（其再次為包含至少一種選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群之核酸序列，或是其互補聚核苷酸序列的核酸)，其信號對雜訊比為該探針對於非配對目標之雜交所觀察到者之至少2.5x高，且最佳為5x或更高。

通常言之，雜交分析係在經選擇之雜交條件下進行，以使包含與一經揭示參照（或已知）核苷酸序列（如，SEQ ID NO:80）完全互補之序列的核酸可雜交該重組抗原編碼序列（如，SEQ ID NO:80核酸序列之核苷酸序列變體)，其信號對雜訊比為該完全互補核酸與包含與該參照核酸至少約80或90%相同之核苷酸序列之核酸雜交所觀察到者之至少約5、7或10倍較高。此等條件可被視為專一性雜交之指標。

可調整上述之雜交條件，或是可選擇替代之雜交條件，以達成在選擇雜交核酸序列時之任何所欲嚴格程度。舉例而言，其可逐漸增加該上述之高嚴格雜交及清洗條件（如，藉著增加該雜交或清洗之溫度、降低鹽濃度、增加清潔劑濃度及/或增加有機溶劑（諸如，福馬林）之濃度)，直到成所選之標準組為止。舉例而言，可逐漸增加該雜交及清洗條件，直到所欲之探針可結合配對互補目標，其信號對雜訊比為該探針與非本發明核酸（諸如，編碼WT CTLA-4 ECD多肽之核酸）之雜交所觀察到者之至少約2.5x高，且

最佳為至少約5x （如，約10x、約20x、約50x、約100x或甚至約500x）。

製備及修飾核酸

本發明之核酸可藉由應用任何適當之合成、操縱及/或分離技術或是其組合而取得及/或產生。例示性之流程述於後文。舉例而言，本發明之聚核苷酸一般而言係經由標準之核酸合成技術製備，諸如，技藝中已知之固相合成技術。在此等技術中，其通常個別合成最多約100個鹼基之片段，接著再使其結合（如，藉由酶性或化學接合方法，或是聚合酶中介性重組方法）以形成基本上任何所欲之連續核酸序列。本發明核酸之合成亦可藉由化學合成而協助（或是替代完成），使用，如，經典之亞磷酸醯胺法，其述於，如，Beaucage et al. （1981） Tetrahedron Letters 22:1859-69，或是由Matthes et al. （1984） EMBO J. 3:801-05所述之方法，如，一般以自動化合成法實施者。本發明之核酸亦可藉著使用自動化DNA合成儀而製備。用以合成核酸之其他技術及相關原則述於，如，Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323 （1984），Itakura et al., Science 198:1056 （1984），及Ike et al., Nucl. Acid Res. 11:477 （1983）。

便利地，可自各種商業來源，諸如，The Midland Certified Reagent Company （mcrc@oligos.com）、the Great American Gene Company （全球資訊網址genco.com）、ExpressGen Inc. （全球資訊網址expressgen.com）、Operon Technologies Inc. （Alameda, CA），訂購訂製之核酸。類似地，可自各種來源之任一者，如，PeptidoGenic （pkim@ccnet.com）、HTI Bio-products, Inc. （全球資訊網址htibio.com）及BMA Biomedicals Ltd. （U.K.），Bio.Synthesis, Inc.，訂購訂製之肽及抗體。

部分本發明之核苷酸亦可藉著使用可雜交或PCR-擴增編碼本發明多肽之聚核苷酸的探針篩選cDNA庫而取得。篩選及分離cDNA純系之流程以及PCR擴增之流程係熟習技藝者所熟知；其例

示流程述於後文（參見，如，述於下文實例之流程）。此等技術述於，如，Berger and Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques [分子選殖技術指引]," 於Methods in Enzymol. Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, CA （"Berger"）；Sambrook, 上述文獻；及Ausubel, 上述文獻。部分本發明之核酸可藉著改變天然骨架而取得，如，藉由誘變、活體外之重組（如，換移（shuffling））或寡核苷酸重組。在其他情形下，此等聚核苷酸可在電腦中，或是經由寡聚核苷酸重組方法而製備，如述於本文所引述之參考文獻中者。

可用於修飾核酸之重組DNA技術係技藝中所熟知（如，限制核酸內切酶消化、接合、逆轉錄及cDNA生成、以及PCR）。可用之重組DNA技術及與其相關之原則，提供於，如，Mulligan（1993）Science 260:926-932，Friedman （1991） Therapy For Genetic Diseases [遺傳疾病之療法], Oxford University Press，Ibanez et al.（1991）EMBO J. 10:2105-10，Ibanez et al.（1992）Cell 69:329-41（1992），以及美國專利第4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075及4,810,648號，並更特定言之述於Sambrook et al. （1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖；實驗室手冊], Cold Spring Harbor Press，及其第三版（2001），Ausubel et al.（1994-1999）, Current Protocols in Molecular Biology [分子生物學之當前操作流程], Wiley Interscience Publishers （部分版本係Greene Publishing Associates），Berger, 上述文獻，及Watson,上述文獻。

經修飾之編碼序列

在適當時，本發明之核酸可藉由對該序列進行有關密碼子使用及/或密碼子內容之修飾而受到修飾，以增加或增進其在特定宿主中之表現，該（等）特定宿主係其中欲表現該核酸者。最常用於特定宿主中之密碼子稱為最適密碼子，且該等不常使用者係歸

類為罕見或低使用率密碼子（參見，如，Zhang, S. P. et al. （1991） Gene 105:61-72）。密碼子可經取代以反應該宿主之偏好密碼子使用，此係稱為「密碼子最適化」或「控制生物種密碼子偏好」之流程。

包含特定原核或真核宿主之偏好密碼子的最適化密碼子序列可用於增加轉譯率，或是生成具有所欲特性之重組RNA轉錄物，諸如，較長之半生期，相較於自非最適化序列所生成之轉錄物。用於產生密碼子最適化序列之技術係為已知（參見，如，Murray, E. et al. （1989） Nuc. Acids Res. 17:477-508）。

亦可對轉譯中止密碼子進行修飾以反應宿主偏好。舉例而言，釀酒酵母及哺乳動物之偏好中止密碼子分別係UAA及UGA。單子葉植物之偏好中止密碼子係UGA，而昆蟲及大腸桿菌偏好使用UAA作為中止密碼子（其討論參見，如，Dalphin, M.E. et al. （1996） Nuc. Acids Res. 24:216-218）。在其他密碼子內容中之密碼子安排亦可影響核酸序列之生物特性，而發明人亦預期為提供特定宿主所常用之密碼子內容安排的核酸修飾。因此，本發明之核酸可包含一密碼子最適化核苷酸序列，亦即，針對特定生物種而進行密碼子頻率最適化及/或進行密碼子對（亦即，密碼子內容）最適化者（如，該多肽可自一針對人類中之表現而進行最適化之聚核苷酸序列表現，該最適化係藉著置換根據密碼子頻率之「稀有」人類密碼子，或是置換密碼子內容，諸如，藉著使用諸如該等述於Buckingham et al. （1994） Biochimie 76（5）:351-54及美國專利第5,082,767、5,786,464及6,114,148號之技術）。舉例而言，本發明提供一種核酸，其包含SEQ ID NO:80之核苷酸序列變體，其中該核苷酸序列變體與SEQ ID NO:80之核苷酸序列之差異係藉著以該宿主中所經常表現之密碼子取代對於特定宿主之「罕見」密碼子而產生，該等密碼子係與SEQ ID NO:80中之經取代「罕見」密碼子編碼相同之胺基酸殘基。

載體、載體組成份及表現系統

本發明亦包括重組建構物，其包含一或多種本發明之核酸，如上文廣泛敘述。部分之建構物可包含載體，諸如，質體、黏粒（cosmid）、噬菌體、病毒、病毒顆粒、似病毒顆粒、細菌人工染色體（BAC）、酵母菌人工染色體（YAC）或其類似者，或是非複製性之載體，諸如，脂質體、裸或複合DNA、DNA-微顆粒，其中已插入至少一種本發明之核酸序列，其可為正向或反向排列。在此具體實例之特定態樣中，該建構物可進一步包含一或多種調控序列，其包括，例如，啟動子，以可操作之方式連結本發明之核酸序列（如，編碼分離或重組之突變CTLA-4 ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig之核酸）。大量之適當載體及啟動子皆為熟習技藝者所已知且可由市售取得。在部分情形下，載體，諸如，如，病毒或似病毒顆粒，亦可或是或可包括一或多種本發明之多肽，諸如，如，納入該病毒或似病毒顆粒之衣殼中。載體可作為傳遞劑，以對一對象進行外源基因或蛋白之傳遞或投與。本發明之載體，包括述於本文中者，可作為傳遞劑，以傳遞或投與本發明之核酸及/或多肽。

敘述可用於本文之分子生物學技術，包括載體、啟動子之使用，以及諸多其他相關主題之一般性文獻包括Berger, 上述文獻，Sambrook （1989）, 上述文獻，及Ausubel, 上述文獻。足以指引熟習技藝者進行活體外擴增之技術實例，包括聚合酶連鎖反應（PCR）、接合酶連鎖反應（LCR）、Qβ-複製酶擴增及其他RNA聚合酶中介性技術（如，NASBA），如，用餘生成本發明之同源核酸，可見於Berger、Sambrook及Ausubel，皆為上述文獻，以及Mullis et al. （1987）美國專利第4,683,202號；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [PCR流程：方法及應用指引]（Innis et al., eds.） Academic Press Inc. San Diego, CA （1990） （"Innis"）; Arnheim & Levinson （October 1, 1990） C&EN 36-47；The Journal Of NIH Research （1991） 3:81-94；(Kwoh et al. （1989） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177；Guatelli et al. （1990） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878；Lomeli et al. （1989） J.

Clin. Chem. 35:1826-1831；Landegren et al. （1988） Science 241:1077-1080；Van Brunt （1990） Biotechnology 8:291-294；Wu and Wallace （1989） Gene 4:560-569；Barringer et al. （1990） Gene 89:117-122，及Sooknanan and Malek （1995） Biotechnology 13:563-564。

PCR一般而言係指其中以技藝中所熟知之方法而擴增微量之一特定核酸片段（如，RNA或DNA）的流程（參見，如，美國專利第4,683,195號及其中所引述之其他參考文獻）。一般而言，其係使用起始自該目標區域之末端或以外之序列資訊而設計寡核苷酸引子。此等引子之序列將會與該待擴增樣板之相對股相同或相似。相對股之5'端核苷酸可與該經擴增物質之末端重合。PCR可用於擴增特定之RNA或特定之DNA序列、重組DNA或RNA序列、來自總體基因組DNA之DNA及RNA序列、以及轉錄自總體細胞RNA之cDNA、噬菌體或質體序列等。PCR係包含使用另一（如，已知）核酸作為引子而可用以擴增核酸試驗樣本之核酸聚合酶連鎖反應法之一個實例，但並非唯一之實例。選殖活體外擴增核酸之改良方法述於Wallace et al.，美國專利第5,426,039號。以PCR擴增大型核酸之改良方法摘述於Cheng et al. （1994） Nature 369:684 685及其中所引述之參考文獻，其中可產生高達40千鹼基（kb）之PCR擴增物。熟習技藝者將可明瞭，咸可用逆轉錄酶及聚合酶而將基本上任何RNA轉化成為適合進行限制酶切消化、PCR擴增及定序之雙股DNA。參見，Ausubel、Sambrook及Berger，皆為上述文獻。

可將本發明之核酸納入各種載體中之任一者中，如，表現載體，以表現多肽，包括，如，本發明之多肽。可使用可與原核宿主細胞相容之表現載體；此等原核表現載體係為技藝中所已知並可由市售取得。此等載體包括，但不限於，如，BLUESCRIPT載體（Stratagene），T7表現載體（Invitrogen），pET載體（Novagen），以及類似之原核載體。

或可替代使用可與真核宿主細胞相容之表現載體；此等真核表現載體係為技藝中所已知並可由市售取得。此等載體包括，但

不限於，如，pCMV載體（如，Invitrogen），pIRES載體（Clontech），pSG5 載體（Stratagene），pCDNA3.1（Invitrogen Life Technologies），pCDNA3（Invitrogen Life Technologies），遍在染色質開放元件（Ubiquitous Chromatin Opening Element）（UCOE™）表現載體（Millipore），以及類似之真核表現載體。該UCOE™載體一般而言係用於進行哺乳動物細胞中之蛋白生成（如，CHO細胞）。根據Millipore，UCOE™表現技術可阻礙轉基因沈默，並可不論染色體納入之位置而提供高含量之基因表現。參見全球資訊網址millipore.com之Millipore網站。其中可，例如，納入本發明核酸之一種例示性之UCOE表現載體係稱為CET1019AS-puro-SceI之UCOE表現載體，其可由Millipore之授權取得。有關UCOE表現載體CET1019AS-puro-SceI之資訊可見於，如，John Wynne, "UCOE™ Technology Maximizes Protein Expression [UCOE™技術可使蛋白表現最大化]," BioProcess International 4(7):104-105（July/August 2006）（RP1725EN00）（可自全球資訊網址millipore.com/bibliography/tech1/rp1725en00取得）；其他有關於此載體以及由Millipore授權此載體之資訊可見於Millipore網站，包括全球資訊網址millipore.com/company/cp3/ucoe_licensing及millipore.com/techpublications/tech1/ps1013en00。因此，舉例而言，可將與編碼IgG2 Fc多肽之DNA序列（如，SEQ ID NO:184）融合的編碼突變CTLA-4 ECD之DNA序列(如，SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:50)(造成SEQ ID NO:201之DNA序列)插入UCOE CET1019AS載體（Millipore），並將該所得之DNA質體用於轉染宿主細胞。

表現載體包括染色體、非染色體及合成性DNA序列，如，SV40之衍生物，細菌載體（如，傷寒沙門氏菌（*S. typhimurium*）、傷寒沙門氏菌（*S. typhi*）、弗氏志賀氏菌（*S. flexneri*）、單核細胞增生性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）、炭疽芽胞桿菌（*B. anthracis*））；質體；細菌質體；噬菌體DNA；桿狀病毒；酵母菌質體；衍生自質體及噬菌體DNA之組合之載體；病毒DNA或RNA

載體，其包括，如，痘瘡病毒、腺相關病毒（AAV）、腺病毒、Semliki-Forest病毒（如，Notka et al., Biol. Chem. 380:341-52（1999））、痘病毒（如，MVA）、α病毒，如，委內瑞拉馬腦炎病毒（VEE）、西部馬腦炎病毒（WEE）、東部馬腦炎病毒（EEE）、水泡性口炎病毒（VSV）、禽痘病毒、假性狂犬病病毒、單純皰疹病毒、逆轉錄病毒，及諸多其他者。可使用任何可將基因物質轉導至細胞中，並（如欲進行複製）係可複製且可在相關宿主中存活之載體。作為傳遞載劑之病毒及細菌載體可經減毒；減毒應足以降低（如非消除）非所欲疾病症狀之誘發。圖1係例示質體表現載體pCDNA突變CTLA-4-Ig之圖式，其編碼本發明之突變CTLA-4-Ig。有關適當表現載體之其他細節提供於下文，包括實例之中。

包含如本文所述之本發明核酸序列以及適當之啟動子或控制序列之本發明載體可用以轉形適當之宿主，以容許該宿主表現該蛋白。適當表現宿主之實例包括：細菌細胞，諸如，大腸桿菌、鏈黴菌（*Streptomyces*）及傷寒沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*）；真菌細胞，諸如，釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、畢赤酵母（*Pichia pastoris*）及粉色麵包黴菌（*Neurospora crassa*）；昆蟲細胞，諸如，果蠅（*Drosophila*）及秋行軍蟲（*Spodoptera frugiperda*）；哺乳動物細胞，諸如，中國倉鼠卵巢細胞（CHO）（如，CHO-K1）、COS（如，COS-1, COS-7）、幼倉鼠腎細胞（BHK）及人類胚胎腎細胞（HEK）（如，HEK 293）、Bowes黑色素瘤細胞，及植物細胞。有關適當宿主細胞之其他細節提供於下文。

在細菌系統中，其可根據該目標多肽或其片段之所欲用途而選擇諸多之表現載體。舉例而言，在需要大量之特定多肽或其片段以誘發抗體時，可能需要可指引高含量可輕易純化之融合蛋白表現的載體。此等載體包括，但不限於，多功能性大腸桿菌選殖及表現載體，諸如，BLUESCRIPT （Stratagene），其中目標核苷酸編碼序列（如，編碼重組突變CTLA-Ig之核苷酸序列）可以符合β半乳糖苷胺酶之胺端Met及其後續7個殘基之框構的方式接合進

入該載體中，以產生雜交蛋白；pIN載體（Van Heeke & Schuster（1989） J. Biol. Chem. 264:5503-5509）；pET載體（Novagen, Madison WI）；及其類似者。

相似地，在酵母菌釀酒酵母中，可使用包含組成性或誘發性啟動子（諸如，α因子、醇氧化酶及PGH）之諸多載體而製備本發明之多肽。就其回顧評論，參見，Ausubel, 上述文獻，Berger, 上述文獻，及Grant et al. （1987） Meth. Enzymol. 153:516-544。

在哺乳動物宿主細胞中，可使用諸多表現系統，諸如，病毒基礎性之系統。就其中使用腺病毒作為表現載體之情形中，其可使編碼序列視情形而接合進入由後期啟動子及三聯引導序列所構成之腺病毒轉錄/轉譯複合物中。在病毒基因組之非必要性E1或E3區域中之插入可造成可在經感染之宿主細胞中表現目標多肽之活病毒（Logan and Shenk （1984） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659）。此外，轉錄增強子，諸如勞氏肉瘤病毒（RSV）增強子，可用以增加哺乳動物宿主細胞中之表現。

載體，如，表現載體，或是本發明之聚核苷酸，可包含一或多種表現控制序列。表現控制序列一般而言係連結及/或以可操作之方式連結本發明之核酸序列，諸如，編碼重組突變CTLA-4 ECD多肽或重組突變CTLA-4- Ig融合蛋白之核酸。表現控制序列一般而言係核苷酸序列，其可啟動、增強或控制另一核苷酸序列之表現（一般而言係轉錄）。可用之適當表現控制序列包括啟動子（包括組成性啟動子、誘發性啟動子及/或可壓抑性啟動子）、用以擴增表現之增強子、起始序列、終止轉譯序列、剪切控制序列及其類似者。

當本發明之核酸係包括在載體中時，該核酸一般而言係以可操作之方式連結適當之轉錄控制序列（啟動子）以指引mRNA之合成。啟動子對於重組多肽表現之量具有特別重要之影響。可使用任何適當之啟動子。適當啟動子之實例包括巨細胞病毒（CMV）啟動子（有或無該第一內含子（內含子A））、HIV長終端重複啟動子、磷酸甘油酸激酶（PGK）啟動子、勞氏肉瘤病毒（RSV）啟

動子（諸如RSV長終端重複（LTR）啟動子）、SV40啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒（MMTV）啟動子、HSV啟動子（諸如，Lap2啟動子或皰疹胸苷激酶啟動子(如述於，如，Wagner et al.（1981）Proc. Natl. Acad. Sci. 78:144-145)、衍生自SV40或Epstein Barr病毒之啟動子、腺相關病毒（AAV）啟動子（諸如，p5啟動子）、金屬硫蛋白啟動子（諸如，綿羊金屬硫蛋白啟動子或小鼠金屬硫蛋白啟動子)(參見，如，Palmiter et al.（1983） Science 222:809-814)、人類遍在蛋白C啟動子、大腸桿菌啟動子(諸如，lac及trp啟動子)、噬菌體λ P_L啟動子及其他已知可控制基因在原核或真核細胞中（直接在該細胞中或是在感染該細胞之病毒中）表現之啟動子。可使用在哺乳動物中（特別係人類）具有強組成性基線表現之啟動子，諸如，CMV啟動子，諸如，CMV立即早期啟動子(其述於，如，美國專利第5,168,062、5,385,839、5,688,688及5,658,759號)，以及與此等CMV啟動子具有實質上序列相同性之啟動子。亦可使用具有增強特性之重組啟動子，諸如，述於國際專利公開案WO 02/00897中者。

以可操作之方式連結本發明核酸以進行該核酸表現之啟動子可具有任何適當之作用機制。因此，該啟動子可為，舉例而言，「誘發性」啟動子（如，生長激素啟動子、金屬硫蛋白啟動子、熱休克蛋白啟動子、E1B啟動子、缺氧誘發性啟動子、放射誘發性啟動子或腺病毒MLP啟動子及三聯引導序列）、誘發性-可壓抑性啟動子、發育階段相關性啟動子（如，球蛋白基因啟動子）或組織專一性啟動子（如，胃肌細胞α-肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白長鏈1A啟動子或血管內皮鈣黏附蛋白啟動子)。適當之誘發性啟動子包括蛻皮激素及蛻皮激素類似物誘發性啟動子。蛻皮激素類似物誘發性啟動子係市售可得者，如，經由Stratagene （La Jolla, CA)。如需要，可藉由使用誘發性開-及關-基因表現系統（on- and off-gene expression system）而誘發本發明之核酸。此種開-及關-基因表現系統之實例分別包括Tet-On™基因表現系統及Tet-Off™基因表現系統(Clontech, Palo Alto, CA；有關各個此等系統之詳述參見，如，

Clontech Catalog 2000, pg. 110-111）。誘發性啟動子可為任何反應適當信號而受到正-及/或負調節之啟動子。其他誘發性啟動子包括阿拉伯糖誘發性啟動子、類固醇誘發性啟動子（如，糖皮質素誘發性啟動子），以及pH、壓力及熱誘發性啟動子。

該啟動子可為，且通常係，宿主天然啟動子，或是衍生自可感染特定宿主之病毒的啟動子（如，人類β肌動蛋白啟動子、人類EF1α啟動子或是衍生自人類AAV之啟動子，以可操作之方式連結目標核酸），特別是在慮及須嚴格避免因為對於並非慣常存在於該宿主中之序列的宿主免疫反應而造成之基因表現沈默時。亦可使用連結多重目標核苷酸序列之雙方向性啟動子系統（如述於，如，U.S. 5,017,478）。

其他適當之啟動子以及有關適當啟動子之選擇、使用及建構之原則提供於，如，Werner（1999）Mamm Genome 10(2):168-75，Walther et al.（1996）J. Mol. Med. 74(7):379-92，Novina（1996）Trends Genet. 12（9）:351-55，Hart （1996） Semin. Oncol. 23（1):154-58，Gralla（1996）Curr. Opin. Genet. Dev. 6(5):526-30，Fassler et al. （1996） Methods Enzymol 273:3-29，Ayoubi et al.（1996), 10(4) FASEB J 10(4):453-60，Goldsteine et al.（1995）Biotechnol. Annu. Rev. 1:105-28，Azizkhan et al.（1993）Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 3(4):229-54，Dynan（1989）Cell 58(1):1-4，Levine （1989） Cell 59（3）:405-8，及Berk et al.（1986） Annu. Rev. Genet. 20:45-79，以及美國專利第6,194,191號。其他適當之啟動子可藉由使用真核啟動子資料庫（68版）（可在全球資訊網址epd.isb-sib.ch/取得）以及其他類似之資料庫，諸如，轉錄調控區域資料庫（TRRD）（4.1版）（可在全球資訊網址bionet.nsc.ru/trrd/取得）及轉錄因子資料庫（TRANSFAC）（可在全球資訊網址transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html取得）而獲得辨識。

作為啟動子之替代，特別是在RNA載體擊劍購物中，本發明之載體或核酸可包含一或多個內部核糖體進入位點（IRESs）、IRES-編碼序列或RNA序列增強子（Kozak一致序列類似物），諸

如，煙草鑲嵌病毒Ω端序列。

本發明之載體或聚核苷酸可包括上游活化子序列（UAS），諸如，Gal4活化子序列（參見，如，美國專利第6,133,028號）或其他適當之上游調控序列（參見，如，美國專利第6,204,060號）。

本發明之載體或聚核苷酸可包括Kozak一致序列，其可在哺乳動物細胞中作用。該Kozak序列可為天然或經修飾之序列，諸如，述於美國專利第6,107,477號之經修飾Kozak一致序列。

特定之起始信號可協助有效轉譯本發明之編碼序列，諸如，突變CTLA-4 ECD多肽編碼核苷酸序列。此等信號可包括在本發明之載體中。此等信號可包括，如，ATG起始密碼子及毗鄰序列。在其中將編碼序列、其起始密碼子及上游序列插入適當表現載體中之情形下，其可能不需要額外之轉譯控制信號。然而，在其中僅將編碼序列（如，成熟蛋白編碼序列）或其部分插入之情形下，其即必須提供包括該ATG起始密碼子之外源核酸轉錄控制信號。同時，該起始密碼子必須係在正確之讀框中，以確保該完整插入物之轉錄。外源轉錄元件及起始密碼子可為各種來源—包括天然及合成兩者。表現之效率可藉著納入適用於所用細胞系統之增強子而增強（參見，如，Scharf et al., Results Probl. Cell. Differ. 20:125-62 （1994）；及Bittner et al., Meth. Enzymol. 153:516-544（1987））。適當之增強子包括勞氏肉瘤病毒（RSV）增強子以及述於美國專利第6,225,082號之RTE增強子。

熟習技藝者將可辨知，將起始密碼子（ATG）引入特定目標核苷酸序列之5'端通常會造成該經編碼之胺基酸序列在哺乳動物細胞中表現時添加一N-端甲硫胺酸（其他修飾可能會發生在細菌及/或其他真核細胞中，諸如在起始密碼子處引入一甲醯基-甲硫胺酸殘基）。就本發明之核酸於真核細胞中之表現而言，其一般而言係將起始密碼子及編碼信號肽之核苷酸序列包括在本發明核酸序列（如，SEQ ID NO:80）之5'端，且一般而言將終止密碼子包括於該核酸（如，SEQ ID NO:80）之C端。其中一種例示性之信號肽係hCTLA-4信號肽序列（SEQ ID NO:182）；編碼該組織型纖維蛋

白溶酶原激活劑信號肽之核酸示於SEQ ID NO:181。另一種例示性之信號肽係hCTLA-4信號肽序列（SEQ ID NO:216）；其係由示於SEQ ID NO:215之核酸序列編碼。

終止序列於下文詳細討論。

此等元件可包括在所選載體建構物中。在表現時，由該核酸（如，SEQ ID NO:80）編碼之多肽變體最初將會包括一N-端甲硫胺酸殘基及該信號肽序列。然而，該N-端甲硫胺酸及信號肽序列將會在分泌時受到切除，因而產生該經編碼之多肽（如，SEQ ID NO:1）。

本發明核酸（或是對應之本發明多肽）之表現量可以任何適當之技術評估。其實例包括北方點漬分析（其於，如，McMaster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(11):4835-38（1977）及Sambrook, 上述文獻中討論）、逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應（RT-PCR）（如述於，如，U.S. 5,601,820及Zaheer et al., Neurochem. Res. 20:1457-63（1995））、以及原位雜交技術（如述於，如，美國專利第5,750,340及5,506,098號）。蛋白之定量亦可以Lowry分析及其他蛋白定量分析完成（參見，如，Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254（1976）；Lowry et al., J. Biol. Chem. 193:265（1951））。針對取自經編碼本發明重組多肽之聚核苷酸轉染之細胞裂解物的本發明重組多肽所進行之西方點漬分析係用以評估重組多肽表現量之另一適當技術。

本發明之載體（如，表現載體）或聚核苷酸可包含用以進行轉譯起始之核糖體結合位點以及轉錄終止區域。適當之轉錄終止區域係，例如，聚腺苷酸序列，其可協助由DNA序列所生成之RNA轉錄物的切割及聚腺苷酸化。可使用任何適當之聚腺苷酸序列，包括合成性之最適化序列，以及BGH（牛生長激素）、人生長激素基因、多瘤病毒、TK（胸苷激酶）、EBV（Epstein Barr病毒）、兔β球蛋白及乳頭狀瘤病毒（包括人類乳頭狀瘤病毒及BVP（牛乳頭狀瘤病毒））之聚腺苷酸序列。適當之聚腺苷酸（polyA）序列亦包括SV40（人類肉瘤病毒-40）聚腺苷酸序列及BGH polyA

序列。此等polyA序列述於，如，Goodwin et al. （1998） Nucleic Acids Res. 26（12）:2891-8，Schek et al. （1992） Mol. Cell. Biol. 12（12）:5386-93，及van den Hoff et al. （1993） Nucleic Acids Res. 21（21）:4987-8。有關於適當聚腺苷酸序列選擇之其他原則述於，如，Levitt et al. （1989） Genes Dev. 1989 3（7）:1019-1025，Jacob et al. （1990） Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 1（1）:49-59，Chen et al. （1995） Nucleic Acids Res. 23（14）:2614-2620，Moreira et al. （1995） EMBO J. 14（15）:3809-3819，Carswell et al. （1989） Mol. Cell. Biol. 9（10）:4248-4258。

本發明之載體或聚核苷酸可進一步包含位點專一性重組位點，其可用於調節目標核苷酸序列之轉錄，如述於，如，美國專利第4,959,317、5,801,030及6,063,627號，歐洲專利申請案第0 987 326號，以及國際專利申請公開案WO 97/09439。

本發明之載體或聚核苷酸亦可包含編碼分泌/定位序列之核酸，以使多肽表現靶向至所欲之細胞區隔、膜或胞器，或是指引多肽分泌至週質空間或進入細胞培養基。此等序列係為技藝中所已知，並包括分泌引導肽或信號肽、胞器靶向序列（如，核定位序列、ER滯留信號、粒線體轉運序列、葉綠體體轉運序列）、膜定位/錨定序列（如，停止轉運序列、GPI錨定序列）、以及其類似者。本發明之聚核苷酸可以，例如，符合框構此種編碼分泌及/或定位序列之核酸。由此等本發明之聚核苷酸所表現之多肽可包括對應於該（等）分泌及/或定位序列之胺基酸序列。

此外，本發明之載體或聚核苷酸可包含一或多種可選擇性標記核苷酸序列或基因，以提供表型特色進行經轉形宿主細胞之選擇，諸如，真核細胞培養物之二氫葉酸還原酶抗性、新黴素抗性、G418抗性、嘌呤黴素（puromycin）抗性及/或保米黴素（blasticidin）抗性，或是諸如大腸桿菌中之四環黴素或胺苄青黴素抗性。

本發明之載體或聚核苷酸亦可包含可用於在微生物中進行增殖之複製起點。所用之細菌複製起點（Ori）較佳係並不會負面影響哺乳動物細胞中之基因表現者。可用之複製起點序列實例包括f1

噬菌體ori、RK2 oriV、pUC ori及pSC101 ori。複製起點序列包括ColEI ori及p15 （可自質體pACYC177取得，New England Biolab, Inc.），或是另一低拷貝ori序列（類似p15）可為部分內容中所需要。在此態樣中之核酸係欲作為穿梭載體；可在真核及原核宿主兩者中進行複製及/或表現（如，包含可在真核及原核生物兩者中獲得辨識之複製起點的載體）。

本發明包括裸DNA或RNA載體，其包括，例如，線性表現元件（如述於，如，Sykes and Johnston （1997） Nat Biotech 17:355-59）、壓縮核酸載體（如述於，如，美國專利第6,077,835號及/或國際專利申請公開案WO 00/70087）、質體載體（諸如，pCDNA3.1、pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119）、「侏儒」最小尺寸核酸載體（如述於，如，Schakowski et al. （2001） Mol. Ther. 3:793-800），或是為沈澱核酸載體建構物，諸如，$CaPO_4$沈澱建構物（如述於，如，國際專利申請案WO 00/46147，Benvenisty and Reshef（1986） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9551-55，Wigler et al.（1978）, Cell 14:725，及Coraro and Pearson （1981） Somatic Cell Genetics 7:603），其包含本發明之核酸。舉例而言，本發明提供一種裸DNA質體，其包含SEQ ID NO:80，以可操作之方式連結CMV啟動子或CMV啟動子變體以及適當之聚腺苷酸序列。裸核苷酸載體及其使用係技藝中所已知（參見，如，美國專利第5,589,466及5,973,972號）。

本發明之載體一般而言係表現載體，其適用於細菌系統、真核系統、哺乳動物系統或其他系統之表現（相對於設計用以複製核酸序列而不進行表現之載體，其可被稱為選殖載體）。舉例而言，在一態樣中，本發明提供一種細菌表現載體，其包含本發明之核酸序列（如，編碼重組突變CTLA-4-Ig之核酸序列）。適當之載體包括，例如，可指引可輕易純化之融合蛋白高量表現之載體（如，多功能性大腸桿菌選殖及表現載體，諸如，BLUESCRIPT（Stratagene）；pIN載體（Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509 （1989）；pET載體（Novagen, Madison WI）；及其

類似者）。儘管此等細菌表現載體可用於表現特定之本發明多肽，本發明之糖蛋白較佳係在真核細胞中表現，並因此本發明亦提供真核表現載體。

該表現載體可為適於在酵母菌細胞中表現本發明核酸之載體。可使用任何適用於在酵母菌系統中進行表現之載體。可用於，如，釀酒酵母中之適當載體包括，如，包含組成性或誘發性啟動子（諸如，α因子、醇氧化酶及PGH）之載體（回顧評論於Ausubel, 上述文獻，Berger, 上述文獻，及Grant et al., Meth. Enzymol. 153:516-544 （1987））。通常，該表現載體將係適用於在哺乳動物細胞中表現本發明核酸之載體，諸如，昆蟲細胞（如，SF-9細胞）或哺乳動物細胞（如，CHO細胞、293細胞、HeLa細胞、人類纖維母細胞或已經詳細定性之類似細胞）。適當之哺乳動物表現載體係為技藝中所已知（參見，如，Kaufman, Mol. Biotechnol. 16（2）:151-160 （2000），Van Craenenbroeck, Eur. J. Biochem. 267（18）:5665-5678 （2000），Makrides, Protein Expr. Purif. 17（2）:183-202 （1999），及Yarranton, Curr. Opin. Biotechnol. 3（5）:506-511 （1992））。適當之昆蟲細胞質體表現載體亦為已知（Braun, Biotechniques 26（6）:1038-1040:1042 （1999））。

表現載體一般而言可在宿主細胞中增殖，該宿主細胞可為真核細胞（諸如，哺乳動物細胞、酵母菌細胞或植物細胞）或原核細胞（諸如，細菌細胞）。核酸載體或表現載體進入宿主細胞之引入（如，轉染）可以磷酸鈣轉染（參見，如，Graham et al., Virology 52:456-457 （1973）之磷酸鈣共沉澱法）、DEAE-葡聚糖中介性轉染、電穿孔、基因或疫苗槍、注射、脂質體轉染（lipofection）及生物彈道（biolistics），或是其他常用技術而進行（參見，如，Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual [基因轉移及表現：實驗室手冊], Stockton Press （1990）；關於活體內、活體外及活體外方法之敘述，參見Davis, L., Dibner, M., and Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology [分子生物學基礎方法] （1986））。包含此等及其他本發明載體之細胞形成本發明之一重要部分。

在一態樣中，本發明提供一種表現載體，其包含：(i) 第一聚核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該第多肽可結合人類CD86及/或人類CD80 以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及/或是可抑制免疫反應，以及 (ii) 第二聚核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含一免疫球蛋白 (Ig) 多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。該Ig多肽視情況係人類Ig Fc多肽，如，IgG1、IgG2、IgG4等，或是突變Ig Fc多肽，如，Ig Fc多肽，其中一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸 (如，絲胺酸) 取代，因而消除形成於兩Ig鏈間之一或多個雙硫鍵，或是其中一或多個脯胺酸殘基經另一胺基酸 (如，脯胺酸) 取代，以降低效應子功能 (減少Fc受體結合)。在另一態樣中，本發明提供一種表現載體，其包含核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

本發明所提供之其他核酸包括黏粒 (cosmid)。可使用任何適當之黏粒載體以複製、轉移及表現本發明之核酸序列。一般而言，黏粒包含細菌oriV、抗生素選擇標記、選殖位點、以及一或兩個衍生自噬菌體λ之cos位點。黏粒可為穿梭黏粒或哺乳動物黏粒，其包含SV40 oriV，以及，如所欲者，適當之哺乳動物選擇標記。黏粒載體進一步述於，如，Hohn et al. (1988) Biotechnology 10:113-27。

本發明之核酸可以適當傳遞載劑 (亦即，載體) 之形式而包括在宿主或宿主細胞中及/或對其進行投與。該載體可為任何適當之載體，包括染色體、非染色體及合成性核酸載體，或是其他上述之載體，且可包括上述表現元件以及/或噬其他轉染協助性及/或表現促進性序列元件之任何組合。此等載體之實例包括病毒、細菌質體、噬菌體、黏粒、噬菌質體 (phagemid)、SV40之衍生物、桿狀病毒、酵母菌質體、衍生自質體及噬菌體DNA之組合的載體、

以及病毒核酸（RNA或DNA）載體、聚離胺酸及細菌細胞。

本發明重組DNA序列之傳遞可以裸DNA質體或是連結一或多種轉染增強劑之質體而完成，如本文進一步討論。該質體DNA載體可具有任何適當之特徵組合。質體DNA載體可包含強啟動子/增強子區域（如，人類CMV、RSV、SV40、SL3-3、MMTV或HIV LTR啟動子）、有效之聚（A）終止序列、用於在大腸桿菌中生成質體之複製起點、作為選擇標記之抗生素抗性基因、以及便利之選殖位點（如，多位點連接子（polylinker））。在此態樣中之一種用以傳遞本發明核酸之特定質體載體示於圖1；此種載體之建構及特徵述於下文之實例中。

在另一態樣中，本發明提供一種非核酸載體，其包含至少一種本發明之核酸或多肽。此種非核酸載體包括，如，但不限於，重組病毒、病毒核酸-蛋白複合物（其與重組病毒顆粒有時可被稱作病毒載體）或細胞，諸如重組（且通常係經減毒）之沙門氏菌（*Salmonella*）、志賀氏菌（*Shigella*）、李斯特菌（*Listeria*）及卡介菌（*Bacillus Calmette-Guérin*）（BCG）細菌細胞。因此，舉例而言，本發明提供病毒載體、昆蟲載體、細菌載體或植物載體，其包含具本發明序列之核酸。可在此態樣中使用任何適當之病毒、昆蟲、植物或細菌載體，且諸多者係技藝中所已知。病毒載體可包含任何數目之病毒聚核苷酸，其係單獨存在（病毒核酸載體），或是更常見者為結合一或多種（一般而言係二、三種或以上）之病毒蛋白存在，該等蛋白可協助本發明之核酸在所欲宿主細胞中之傳遞、複製及/或表現。

在一態樣中，可使用胞內細菌（如，單核細胞增生性李斯特菌）而傳遞本發明之核酸。一種用以進行一或多種本發明核酸之質體DNA傳遞之例示性細菌載體係單核細胞增生性李斯特菌（Lieberman et al., Vaccine 20:2007-2010 （2002））。

本發明包括重組或分離之病毒載體，其已經修飾以包含一或多種本發明之核酸或多肽。病毒載體可包括包含所有或部分病毒基因組之聚核苷酸，病毒蛋白/核酸複合物、似病毒顆粒（VLP）、

類似該等述於美國專利第5,849,586號及國際專利申請公開案WO 97/04748之載體或是包含一或多種病毒核酸之完整病毒顆粒，且該病毒載體一般而言係經工程處理以包括至少一種本發明之核酸及/或多肽。病毒載體（亦即，重組病毒）可包含野生型之病毒顆粒或是經修飾之病毒顆粒，其特定實例於下文討論。諸多病毒皆一般而言可作為載體而傳遞外源核酸，包括至少一種本發明之核酸，諸如編碼本文所述之突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig之核酸。此等載體包括經重組修飾之具外膜或不具外膜之DNA及RNA病毒，一般而言係選自桿狀病毒科（*baculoviridiae*）、細小病毒科（*parvoviridiae*）、小RNA病毒科（*picomaviridiae*）、皰疹病毒科（*herpesviridiae*）、痘病毒科(*poxviridae*)、腺病毒科(*adenoviridiae*)或微小核糖核酸病毒科(*picornaviridiae*)。病毒載體可為野生型或是可由重組核酸技術修飾而成為複製缺陷型、複製型或條件複製型。

該病毒載體可為需要另一載體或野生型病毒之存在始可進行複製及/或表現之載體（亦即，輔助病毒依賴性載體），諸如，腺病毒載體複製子。一般而言，此等病毒載體包含野生型之病毒顆粒，或是在其蛋白及/或核酸內容中經修飾已增加轉基因能力或是協助核酸轉染及/或表現的病毒顆粒（此等載體之實例包括皰疹病毒/AAV複製子）。該病毒基因組可經修飾以包括誘發性啟動子，其可僅在特定條件下達成複製或表現。

該病毒載體可衍生自或包含一般而言感染動物（較佳係脊椎動物，諸如，哺乳動物，包括，如，人類）之病毒。在此態樣中之適當病毒載體顆粒包括，例如，腺病毒載體顆粒（包括任何腺病毒科之病毒或衍生自腺病毒科之病毒者）、腺相關病毒載體顆粒（AAV載體顆粒）或是其他細小病毒及細小病毒載體顆粒、乳頭瘤狀病毒載體顆粒、Semliki-Forest病毒載體、黃病毒載體、微小核糖核酸病毒載體、α病毒載體、皰疹病毒載體、痘病毒載體、逆轉錄病毒載體（包括慢病毒載體）。此等病毒及病毒載體之實例提供於，如，Fields Virology, 上述文獻，Fields et al., eds., Virology

[病毒學], Raven Press, Ltd., New York （3rd ed., 1996及4th ed., 2001），Encyclopedia of Virology [病毒學百科全書], R.G. Webster et al., eds., Academic Press （2nd ed., 1999），Fundamental Virology [基礎病毒學], Fields et al., eds., Lippincott-Raven （3rd ed., 1995），Levine, "Viruses [病毒]," Scientific American Library No. 37（1992），Medical Virology [醫學病毒學], D.O. White et al., eds., Academic Press （2nd ed. 1994），及Introduction to Modern Virology [現代病毒學介紹], Dimock, N.J. et al., eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. （1994）。

可與本發明之核酸及本文所述之方法共同使用之病毒載體包括腺相關病毒載體，其係於，如，Carter （1992） Curr. Opinion Biotech. 3:533-539 （1992）及Muzcyzka （1992） Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129 （1992）中進行回顧評論。AAV載體之其他類型及態樣述於，如，Buschacher et al., Blood 5（8）:2499-504，Carter, Contrib. Microbiol. 4:85-86 （2000），Smith-Arica, Curr. Cardiol. Rep. 3(1):41-49（2001），Taj, J. Biomed. Sci. 7(4):279-91 （2000），Vigna et al., J. Gene Med. 2(5):308-16（2000），Klimatcheva et al., Front. Biosci. 4:D481-96（1999），Lever et al., Biochem. Soc. Trans. 27(6):841-47 （1999），Snyder, J. Gene Med. 1（3）:166-75 （1999），Gerich et al., Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 5（2）:118-23 （1998），及During, Adv. Drug Deliv. Review 27（1）:83-94 （1997），及美國專利第4,797,368、5,139,941、5,173,414、5,614,404、5,658,785、5,858,775及5,994,136號，以及其他本文他處所論及之參考文獻。腺相關病毒載體可使用示於，例如，美國專利第4,797,368號及Laughlin et al., Gene 23:65-73 （1983）之方法而建構及/或純化。

α病毒載體可為其他內容中之基因傳遞載體。α病毒載體係技藝中所已知，並述於，如，Carter （1992） Curr Opinion Biotech 3:533-539，Schlesinger Expert Opin. Biol. Ther. （2001） 1（2）:177-91，Polo et al., Dev. Biol. （Basel）. 2000;104:181-5，

Wahlfors et al., Gene Ther. （2000） 7（6）:472-80，國際專利申請公開案WO 01/81609、WO 00/39318、WO 01/81553、WO 95/07994、WO 92/10578。

另一較佳之病毒載體群係皰疹病毒載體。其實例述於，如，Lachmann et al., Curr. Opin. Mol. Ther. （1999） 1（5）:622-32，Fraefel et al., Adv. Virus Res. （2000） 55:425-51，Huard et al., Neuromuscul. Disord. （1997） 7（5）:299-313，Frenkel et al., Gene Ther. （1994） Suppl 1:S40-6，美國專利第6,261,552及5,599,691號。

逆轉錄病毒，包括慢病毒載體，亦可為特定內容中之較佳基因傳遞載體。技藝中已知多種逆轉錄病毒載體。逆轉錄病毒載體之實例述於，如，Miller, Curr Top Microbiol. Immunol. （1992） 158:1-24，Weber et al., Curr. Opin. Mol. Ther. （2001） 3（5）:439-53，Hu et al., Pharmacol. Rev. （2000） 52（4）:493-511，Kim et al., Adv. Virus Res. （2000） 55:545-63，Palu et al., Rev. Med. Virol. （2000） 10（3）:185-202，Takeuchi et al., Adv. Exp. Med. Biol. （2000） 465:23-35，美國專利第6,326,195、5,888,502、5,580,766及5,672,510號。

桿狀病毒載體係另一較佳之病毒載體群，特別係就本發明多肽之製備而言。桿狀病毒載體之製備及使用係為已知（參見，如，Kost, Curr. Opin. Biotechnol. 10（5）:428-433 （1999）; Jones, Curr. Opin. Biotechnol. 7（5）:512-516 （1996））。在該載體係為治療用途而使用之情形下，該載體將會受到選擇以使其可適當感染（或是就核酸載體之情形而言為轉染或轉形）其中欲取得治療作用之目標細胞。

腺病毒載體亦可為用以進行基因轉移之適當病毒載體。腺病毒載體係為技藝中所熟知，且述於，如，Graham et al.（1995） Mol. Biotechnol. 33（3）:207-220，Stephenson （1998） Clin. Diagn. Virol. 10（2-3）:187-94，Jacobs （1993） Clin Sci （Lond）. 85（2）:117-22，美國專利第5,922,576、5,965,358及6,168,941號，及國際專利申請

案WO 98/22588、WO 98/56937、WO 99/15686、WO 99/54441及WO 00/32754。可用於本發明之實施並適用於進行生物之活體內轉導及本發明核酸之表現的腺病毒載體、皰疹病毒載體及辛得比斯（Sindbis）病毒載體廣泛述於，如，Jolly （1994） Cancer Gene Therapy 1:51-64，Latchman （1994） Molec. Biotechnol. 2:179-195，及Johanning et al. （1995） Nucl. Acids Res. 23:1495-1501。

病毒載體可為在宿主細胞中為複製缺陷者。其包括腺相關病毒（AAV）載體，其在無互補腺病毒或至少為腺病毒基因產物（其係由，如，輔助病毒、質體或補助細胞（complementing cell）提供）之存在下即係天然複製缺陷性者。「複製缺陷」意謂該病毒載體包含缺乏至少一種複製必要性基因功能之基因組。在本文中，基因、基因功能或是基因或基因組區域之缺陷係定義為刪除病毒基因組之足夠基因物質，以損害或刪除其核酸序列之全部或部分經刪除之該基因功能。

複製必要性基因功能係該等為使複製缺陷型病毒載體進行複製（亦即，增殖）所需之基因功能。病毒載體顆粒之必要基因功能隨該所論病毒載體顆粒之類型而各異。複製缺陷型病毒載體顆粒之實例述於，如，Marconi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93（21）:11319-20（1996），Johnson and Friedmann, Methods Cell Biol. 43 （pt. A）:211-30 （1994），Timiryasova et al., J. Gene Med. 3（5）:468-77 （2001），Burton et al., Stem Cells 19（5）:358-77（2001），Kim et al., Virology 282（1）:154-67 （2001），Jones et al., Virology 278（1）:137-50 （2000），Gill et al., J. Med. Virol. 62（2）:127-39 （2000）。其他複製缺陷型載體係基於單純MLV載體（Miller et al. （1990） Mol. Cell Biol. 10:4239；Kolberg （1992） J. NIH Res. 4:43，及Cornetta et al. （1991） Hum. Gene. Ther. 2:215）。金絲雀痘病毒載體係感染人類細胞之較佳者，但其天然無法在其中進行複製（亦即，無基因修飾）。

重組病毒載體之基礎建構係技藝中所詳細明瞭者，並涉及使用標準之分子生物學技術，諸如，該等述於，如，Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖：實驗室手冊]（Cold Spring Harbor Press 1989）及其第三版（2001），Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology [分子生物學之當前操作流程]（Wiley Interscience Publishers 1995），及Watson, 上述文獻，以及本文所提及之數種其他參考文獻。舉例而言，腺病毒載體可使用示於，舉例而言，Graham et al., Mol. Biotechnol. 33(3):207-220（1995），美國專利第5,965,358號，Donthine et al., Gene Ther. 7（20）:1707-14 （2000），及本文所述之其他參考文獻之方法而建構及/或純化。腺相關病毒載體可使用示於，舉例而言，美國專利第4,797,368號及Laughlin et al., Gene 23:65-73 （1983）之方法而建構及/或純化。有關其他病毒載體之類似技術係技藝中所已知，特別是有關皰疹病毒載體（參見，如，Lachman et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 1（5）:622-32 （1999））、慢病毒載體及其他逆轉錄病毒載體。一般而言，病毒載體包含核酸之插入（例如，野生型腺病毒載體可包含多達3 KB之插入而無缺失），或者，更一般而言，包含一或多個病毒基因組之缺失，以容納該核酸及其他核酸（如所需）之插入，並預防在宿主細胞中之複製。

非病毒載體，諸如，如，DNA質體、裸核酸及複合傳遞載劑（諸如，脂質體）之核酸亦可連結可使該載體靶向該宿主中特定區域（如，特定之器官、組織及/或細胞類型）之分子。舉例而言，可使核苷酸複合靶向蛋白，諸如可結合受體之病毒蛋白，或是可結合特定目標受體之蛋白（如，藉由修飾Wu et al., J. Biol. Chem. 263（29）:14621-24 （1988）中之技術）。靶向性之陽離子脂質組合物係為已知（參見，如，U.S. 6,120,799）。其他用以靶向基因建構物之技術提供於國際專利申請公開案WO 99/41402。

表現宿主

本發明亦提供經工程處理之宿主細胞，其經本發明之載體（如，選殖載體或表現載體）或本發明之核酸轉導、轉染或轉形。該經工程處理之宿主細胞可在習知之營養培養基中培養，該培養

基經修飾以適用於活化啟動子、選擇轉形株或擴增目標核酸。該培養條件，諸如，溫度、pH及其類似者，係該等先前用於該經選擇以進行表現之宿主細胞者，且將可為熟習技藝者明顯可知，並在本文所引述之參考文獻中明顯可知，其包括，如，Freshney（1994） Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique [動物細胞培養，基礎技術手冊], 3rd ed., Wiley - Liss, New York以及其中所引述之參考文獻。由此等本發明之載體或核酸所編碼之本發明多肽係在此等宿主細胞中表現，並可由標準技術分離。舉例而言，可以超離心或是類似之技術而自培養物中分離釋放至細胞培養物中之多肽。

本發明之多肽可在各種不同之表現宿主中生成，其包括，但不限於，動物細胞，諸如，哺乳動物細胞（如，CHO細胞），包括人類及非人類靈長類細胞，以及在非動物細胞中，諸如，植物、酵母菌、真菌、細菌及其類似者。適當表現宿主之實例包括細菌細胞，諸如，大腸桿菌、鏈黴菌及傷寒沙門氏菌；真菌細胞，諸如，釀酒酵母、畢赤酵母及粉色麵包黴菌；昆蟲細胞，諸如，果蠅及秋行軍蟲；哺乳動物細胞，諸如，CHO （如，CHO-K1）、COS （如，COS-1, COS-7）、BHK及HEK（如，HEK 293）細胞、Bowes黑色素瘤細胞，及植物細胞。如上所註記，本發明並不受到所用之宿主細胞限制。除外Sambrook, Berger and Ausubel, 皆為上述文獻，有關細胞培養之細節尚可見於，如，Payne et al. （1992） Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems [液態系統中之植物細胞及組織培養] John Wiley & Sons, Inc. New York, NY；Gamborg and Phillips （eds.） （1995） Plant Cell, Tissue and Organ Culture [植物細胞、組織及器官培養]；Fundamental Methods Springer Lab Manual [基礎方法 Springer實驗室手冊], Springer-Verlag （Berlin Heidelberg NY）；Atlas & Parks （eds.） The Handbook of Microbiological Media [微生物學培養基手冊]（1993） CRC Press, Boca Raton, FL。使用技藝中所知之流程，此等宿主細胞可經改製以在無血清、無蛋白培養基、無動物組成份培養基中生長，諸如，

如，化學限定（CD）培養基（諸如，如，CD OptiCHO™ （Invitrogen, #12681））。

本發明提供一種細胞，其包含本文所述之任何一或多種本發明之核酸、載體或其他建構物（如，表現突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig之建構物），或是其任何組合。其亦包括一種細胞，其包含本文所述之任何一或多種本發明之多肽、抗體或融合蛋白或其他建構物，或是此等一或多種之任何組合。本發明之細胞一般而言係分離或重組之細胞，且可包含宿主細胞。此種細胞，如，重組細胞，可以至少一種本發明之核酸、載體或其他建構物之轉形、轉染及/或感染而修飾。此種細胞可為真核細胞（如，哺乳動物、酵母菌或植物細胞）或原核細胞（如，細菌細胞），且其可使用各種已知之方法而以任何此種本發明之建構物轉形，其包括，如，磷酸鈣轉染（參見，如，磷酸鈣共沉澱法）、DEAE-葡聚糖中介性轉染、電穿孔（Irving et al., Cell 64:891-901 （1991））、基因或疫苗槍、注射、脂質體轉染及生物彈道，或是其他如上所註記之常用技術。亦參見全球資訊網址inovio.com之Inovio Biomedical Corp.電穿孔方法及技術。

宿主細胞株可視情形因其調控插入序列表現之能力或是以所欲方式加工經表現蛋白之能力而選擇。此等蛋白修飾包括，但不限於，乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化及醯化。不同之宿主細胞，諸如，大腸桿菌、桿菌屬、酵母菌或哺乳動物細胞，諸如，CHO、HeLa、BHK、MDCK、HEK 293、WI38等，具有特定之細胞機械及特徵機制以進行此等後轉譯活動，並可經選擇以確保該引入外源蛋白之正確修飾及加工。

本發明之核酸可插入適當之宿主細胞中（在培養物中或在宿主生物體中），以容許該宿主表現目標蛋白（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）。可以本發明之核酸轉形/轉導任何適當之宿主細胞。適當表現宿主之實例包括：細菌細胞，諸如，大腸桿菌、鏈黴菌、桿菌屬及傷寒沙門氏菌；真菌細胞，諸如，釀酒酵母、畢赤酵母及粉色麵包黴菌；昆蟲細胞，諸如，果蠅及秋行軍蟲；

哺乳動物細胞，諸如，Vero細胞、HeLa細胞、CHO細胞（如，CHO-K1）、COS細胞、WI38細胞、NIH-3T3細胞（以及其他纖維母細胞，諸如，MRC-5細胞）、MDCK細胞、KB細胞、SW-13細胞、MCF7細胞、BHK細胞、HEK-293細胞、Bowes黑色素瘤細胞，及植物細胞等。

本發明亦提供宿主細胞，其經至少一種本發明之核酸或載體轉導、轉形或轉染。如上所討論，本發明之載體一般而言包含本發明之核酸。宿主細胞係經本發明之載體進行基因工程處理（如，轉導、轉形、感染或轉染），該載體可為，如，選殖載體或表現載體。該載體可為質體、病毒顆粒、噬菌體、減毒細菌或任何其他適當類型載體之形式。適用於經本發明之病毒載體轉導及/或感染以製備本發明重組多肽及/或複製本發明病毒載體之宿主細胞包括上述之細胞。已經證實為適於包裝病毒載體顆粒之細胞實例述於，如，Polo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96（8）:4598-603 （1999），Farson et al., J. Gene Med. 1（3）:195-209 （1999），Sheridan et al., Mol. Ther. 2（3）:262-75 （2000），Chen et al., Gene Ther. 8（9）:697-703 （2001），及Pizzaro et al., Gene Ther. 8（10）:737-745（2001）。就複製缺陷型病毒載體而言，諸如，AAV載體，其需要補助細胞系、經輔助病毒轉形之細胞系或是經編碼必要基因之質體轉形之細胞系，以進行該病毒載體之複製。

該等經工程處理之宿主細胞可在習知之營養培養基中培養，該培養基經修飾以適用於活化啟動子、選擇轉形株或擴增目標核酸。宿主細胞可在含血清培養基或無血清培養基中培養。宿主細胞可在無血清、無蛋白、無動物組成份培養基中培養，包括，如，化學限定培養基（如，CD OptiCHO™ （Invitrogen, #12681））。如需要，該細胞培養基可經熟習技藝者所知之添加劑補充，諸如，如，一或多種胺基酸，諸如，L-麩醯胺（如，2% v/v之200 mM L-麩醯胺（Invitrogen, #25031））。該培養條件，諸如，溫度、pH及其類似者，係該等先前用於該經選擇以進行表現之宿主細胞者，且將可為熟習技藝者明顯可知，並在本文所引述之參考文獻中明

顯可知，其包括，如，Animal Cell Technology [動物細胞技術], Rhiel et al., eds., （Kluwer Academic Publishers 1999），Chaubard et al., Genetic Eng. News 20（18）（2000），Hu et al., ASM News 59:65-68（1993），Hu et al., Biotechnol. Prog. 1:209-215（1985），Martin et al., Biotechnol.（1987), Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique [動物細胞培養：基礎技術手冊], 4th ed.,（Wiley, 2000），Mather, Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique [細胞及組織培養介紹：理論及技術],（Plenum Press, 1998），Freshney, Culture of Immortalized Cells [無限增殖化細胞之培養], 3rd ed.,（John Wiley & Sons, 1996），Cell Culture: Essential Techniques [細胞培養：基礎技術], Doyle et al., eds.（John Wiley & Sons 1998），以及General Techniques of Cell Culture [細胞培養之一般性技術], Harrison et al., eds.,（Cambridge Univ. Press 1997）。

該核酸亦可在植物細胞中包含、複製及/或表現。有關植物細胞培養之技術述於，如，Payne et al.（1992） Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems [液態系統中之植物細胞及組織培養] John Wiley & Sons, Inc. New York, NY；Gamborg and Phillips（eds.）（1995） Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods Springer Lab Manual [植物細胞、組織及器官培養：基礎方法Springer實驗室手冊], Springer-Verlag（Berlin Heidelberg New York）；及Plant Molecular Biology [植物分子生物學]（1993） R.R.D. Croy（ed.） Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6。細胞培養基廣泛示於Atlas and Parks（eds.） The Handbook of Microbiological Media [微生物培養基手冊]（1993） CRC Press, Boca Raton, FL。

就重組蛋白之長期、高產率生成而言，可使用穩定之表現系統。舉例而言，可以包含病毒複製起點及/或內源表現元件及選擇標記基因之表現載體轉導穩定表現本發明多肽之細胞系。在引入該載體後，可使該細胞系中之細胞在富集培養基中進行生長1-2天，接著再將其轉換至選擇培養基中。該選擇標記之目的係產生

對於選擇之抗性，而其存在可容許成功表現該引入序列之細胞進行生長及回收。舉例而言，可以適用於該細胞類型之組織培養技術，使經穩定轉形細胞之抗性細胞叢進行增殖。無血清培養基可輕易取得（如，JRH Biosciences、SAFC Biosciences、Sigma-Aldrich Corporation，全球資訊網於 sigmaaldrich.com）。在部分情形下，無血清培養基或條件培養基（如，先前收穫自未經轉染或天然細胞培養物之生長培養基）可為進行蛋白生成或細胞貯存（cell-banking）之較佳者。

本發明包括無限增殖化細胞或細胞系，其包含一或多種本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或多聚體多肽）、複合物、核酸或載體。

經由表現載體及/或聚核苷酸轉形之宿主細胞視情況可在適於表現及自細胞培養物中回收該經編碼蛋白之條件下進行培養。由此種重組細胞所製備之多肽或其片段可為分泌性、膜連結性或包含於胞內者，根據該序列及/或所用之載體而定。包含編碼本發明成熟多肽之聚核苷酸的表現載體可經設計而具信號序列，其可指引該成熟多肽通過原核或真核細胞膜之分泌。此等信號序列一般而言係納入該載體中，以使該信號序列表現於本發明多肽之N-端。有關此等信號序列之原則於本文他處討論。

多肽生成及回收

在轉導適當之宿主株並使該宿主株生長至適當之細胞密度後，可以適當方式（如，溫度變遷或化學誘導）誘發該所選之啟動子，再使細胞培養一段額外期間。細胞一般而言係以離心收集，以物理或化學方法破壞，並保留該所得之粗萃取物以進行進一步之純化。用於表現蛋白之微生物細胞可以任何習知之方法破壞，包括冷凍-解凍循環、超音波處理、機械破壞或是使用細胞裂解劑，或是其他方法，其為熟習技藝者所熟知。

如所註記，可就諸多細胞之培養及製備取得諸多參考文獻，包括細菌、植物、動物（較佳為哺乳動物）及古細菌來源之細胞。

參見，如，Sambrook、Ausubel及Berger （皆為上述文獻），以及Freshney （1994） Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique [動物細胞培養，基礎技術手冊], 第三版, Wiley-Liss, New York以及其中所引述之參考文獻；Doyle and Griffiths （1997） Mammalian Cell Culture: Essential Techniques [哺乳動物細胞培養：必要技術], John Wiley and Sons, NY；Humason （1979） Animal Tissue Techniques [動物組織技術], 第四版, W.H. Freeman and Company；及Ricciardelli, et al., （1989） In vitro Cell Dev. Biol. 25:1016 1024。針對植物細胞之培養及再生，Payne et al. （1992） Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems [液態系統中之植物細胞及組織培養], John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.；Gamborg and Phillips （eds.） （1995） Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual [植物細胞、組織及器官培養：基礎方法Springer實驗室手冊], Springer-Verlag （Berlin Heidelberg New York）；及Plant Molecular Biology [植物分子生物學] （1993） R. R. D. Croy, Ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6。細胞培養基廣泛示於Atlas and Parks （eds.） The Handbook of Microbiological Media [微生物培養基手冊] （1993） CRC Press, Boca Raton, Fla。有關係胞培養之其他資訊可見於可得之商業文獻，諸如，取自Sigma-Aldrich, Inc. （St. Louis, Mo.）之Life Science Research Cell Culture Catalogue [Life Science Research 細胞培養物目錄] （1998） （"Sigma-LSRCCC"），以及，如，亦取自Sigma-Aldrich, Inc （St. Louis, Mo.）之Plant Culture Catalogue and supplement [植物培養物目錄及增刊] （1997） （"Sigma-PCCS"）。

本發明之多肽可以諸多技藝中所熟知方法中之任一者而自重組細胞培養物中回收及純化，包括硫酸銨或乙醇沈澱、酸萃取、陰離子或陽離子交換層析、磷酸纖維素層析、疏水作用層析、親和層析（如，使用任何本文所註記之標記系統）、羥基磷灰石層析及卵磷脂層析。如需要，可使用蛋白再折疊步驟，以完成該成熟

蛋白之構形。最後，可在該等終純化步驟中使用高效液相層析（HPLC）。除上文所註記之參考文獻之外，各種純化方法皆為技藝中所熟知，包括，如，該等示於Sandana （1997） Bioseparation of Proteins [蛋白之生物分離], Academic Press, Inc.；及Bollag et al. （1996） Protein Methods [蛋白方法], 2.sup.nd Edition Wiley-Liss, NY；Walker （1996） The Protein Protocols Handbook [蛋白操作流程手冊] Humana Press, NJ；Harris and Angal （1990） Protein Purification Applications: A Practical Approach [蛋白純化應用：實用方法] IRL Press at Oxford, Oxford, England；Harris and Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach [蛋白純化方法：實用方法] IRL Press at Oxford, Oxford, England；Scopes （1993） Protein Purification: Principles and Practice [蛋白純化：原則及實施] 3.sup.rd Edition Springer Verlag, NY；Janson and Ryden （1998） Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications [蛋白純化：原則，高解析度方法及應用], 第二版 Wiley-VCH, NY；以及Walker （1998） Protein Protocols on CD-ROM [光碟版蛋白操作流程] Humana Press, NJ中者。

熟習技藝者將可明瞭，本發明之融合蛋白（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）可以各種本文所述之方法製備，包括，如，該等述於實例1中以製備LEA29Y-Ig者。舉例而言，可以編碼本發明突變CTLA-4 ECD多肽（如，D3-54多肽）之核酸序列取代LEA29Y-編碼核酸而選殖進入該IgG2 Fc融合載體中，以產生編碼該突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-54-IgG2）之載體，表現此種突變CTLA-4-Ig融合蛋白之穩定CHO-K1細胞可藉著以該突變CTLA-4-Ig融合蛋白編碼載體轉染此等細胞而製備，而所得之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-54-IgG2）可如實例1所述進行表現（一般而言係為二聚體形式）及純化。

活體外之表現系統

可使用無細胞之轉錄/轉譯系統而使用本發明之DNAs及/或

RNAs製備本發明之重組多肽或其片段。數種此等系統係市售可購得者。有關活體外之轉錄及轉譯操作流程之廣泛指引可見於Tymms （1995） In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology [活體外之轉錄及轉譯操作流程：分子生物學方法], Volume 37, Garland Publishing, New York。

本發明之方法

本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白及多聚體多肽）、複合物、組合物、核酸、載體及細胞具有各種特性及特徵，且咸信可用於各種應用中，其包括，但不限於，如，用以治療其中免疫系統及免疫系統反應之調節或調控可具有效益之免疫系統疾病、病症及病況的預防性或治療性方法。舉例而言，咸信具有結合CD80及/或CD86或其任一或兩者之ECD之能力以及/或是抑制免疫反應之能力的本發明多肽、複合物、組合物、核酸、載體及細胞可用於用以抑制或壓抑對象體內免疫反應之預防及/或治療方法、用以抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞或器官移植之排斥的方法、以及其他本文他處所述之方法。部分此等本發明之多肽、複合物、組合物、核酸、載體及細胞預期可用於調節或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間作用之方法。

在一態樣中，本發明之治療或預防方法涉及對一對象投與有效量之至少一種此種多肽（包括，如，融合蛋白、多聚體等）、複合物、組合物、核酸、載體及/或細胞，以壓抑或抑制免疫反應。在治療性之內容中，該對象一般而言係罹患免疫系統疾病、病症或病況者，且該投與係進行以預防該疾病、病症或病況之進一步進展。舉例而言，對於罹患免疫系統疾病（如，自體免疫疾病）之對象投與本發明之分子可造成壓抑或抑制此種免疫系統攻擊或是與其相關之生物反應。藉由壓抑此種對於健康體組織之免疫系統攻擊，該等由此種對於健康組織之攻擊所造成或是與其相關之所得身體症狀（如，疼痛、關節炎、關節腫脹或壓痛）可獲得減少或減輕，且由該免疫系統攻擊所造成或是與其相關之生物及身

體損傷可獲得減少、延緩或中止。

在預防性之內容中，該對象可為罹患、易罹患或是咸信具有免疫系統疾病、病症或病況者，且該投與一般而言係進行以預防該疾病、病症或病況之進展、抑制或減輕與其相關之症狀、徵兆或生物反應、預防潛在由其產生之身體損傷及/或維持或改良該對象之身體機能。

在一態樣中，本發明提供一種調節表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間作用之方法，該方法包含使B7-陽性細胞與有效量之下列至少一者接觸，以調節B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞間之作用：(1) 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；(2) 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；(3) 包含至少一種本發明多肽之複合物；(4) 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；(5) 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；(6) 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或 (7) 本發明之組合物，其中B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞間之作用受到調節。一般而言，該調節作用係一種抑制作用，以使B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞間之作用受到抑制。在部分情形下，該等B7-陽性細胞係抗原呈遞細胞（APCs）。在部分此等方法中，其抑制B7-2-陽性細胞（如，表現B7-2 （CD86）之APCs）與CD28-陽性T細胞間之作用。在部分此等方法中，其抑制B7-1-陽性細胞（如，表現B7-1 （CD80）之APCs）與CD28-陽性T細胞間之作用。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞間作用之方法，該方法包含使B7-陽性細胞（如，B7-1-陽性細胞及/或B7-2-陽性細胞）與有效量之至少一種下列之本發明分子或組成份接觸，以抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞間之作用：(1) 本發

明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，其中CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞間之作用受到抑制。在部分情形下，該等B7-陽性細胞係APCs。在部分此等情形下，其抑制CD28-陽性T細胞與hB7-1-陽性細胞及/或hB7-2-陽性細胞間之作用。在部分此等方法中，CD28-陽性T細胞與hB7-1-陽性細胞及/或hB7-2-陽性細胞間作用之抑制造成下列一或多者之壓抑或抑制：T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、各種活化標記（如，CD25、IL-2受體）之誘發、發炎、關節腫脹或壓痛、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。

在部分此等方法中，其係對一對象投與有效量之至少一種此等本發明之分子或組成份，以在該對象體內抑制內源性CD28-陽性T細胞與內源性B7-1-陽性細胞及/或B7-2-陽性細胞間之作用。在部分此等方法中，其抑制內源性CD28-陽性T細胞與表現B7-2（CD86）或B7-1 （CD80）之B7-陽性細胞。在部分情形下，該B7-陽性細胞係表現B7-2或B7-1之APCs，且其抑制B7-2或B7-1與CD28-陽性T細胞間之作用。在部分情形下，其亦製表限於APCs上之B7-2及B7-1兩者與CD28-陽性T細胞間之作用。

在另一態樣中，本發明提供一種在活體外或活體內抑制免疫反應之方法。該方法包含使B7-陽性細胞與有效量之至少一種下列之本發明分子或組成份接觸，以抑制免疫反應：（1） 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚

體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，其中免疫反應因而受到抑制。其可抑制一或多種免疫反應，包括，如，T細胞反應、T細胞之增殖或活化、細胞因子之合成或生成、發炎、關節腫脹或壓痛、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。在該等包含使B7-陽性細胞與與本發明多肽接觸之方法中，該多肽可結合表現於B7-陽性細胞上之B7-1（如，人類B7-1），以及/或是結合表現於B7-陽性細胞上之B7-2（如，人類B7-2）。在部分情形下，該等B7-陽性細胞係APCs。在部分情形下，免疫反應係在試管中受到抑制，諸如，如，在活體外之分析中，包括該等於本文他處詳述者（參見，如，下文之實例）。在部分情形下，免疫反應係在對其投與有效量以抑制免疫反應之對象體內於活體中受到抑制，諸如，如，在治療性或預防性之治療方法中（如，治療關節疾病，諸如，類風濕性關節炎，或是其他免疫疾病之方法），其於本文他處詳述。

在另一態樣中，本發明提供一種在對象體內（如，哺乳動物，諸如，人類）抑制免疫反應之方法。該方法包含對需要該抑制之對象投與可在該對象體內抑制免疫反應之治療或預防有效量（如，治療或預防有效劑量）之至少一種下列之本發明分子或組成份：（1） 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，其中該對象體內之免疫反應因而受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種治療具有免疫系統疾病或病

症之對象的方法，該疾病或病症係由內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞間的作用而調控。該方法包含對需要此種治療之對象投與治療有效量之：（1） 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，因而治療該對象體內之免疫系統疾病或病症。如該對象係人類，CD80係人類CD80、CD86係人類CD86、而CD28係人類CD28。在部分此等方法中，其抑制表現CD28之內源性T細胞與表現CD86之內源性細胞及/或表現CD80之內源性細胞間的作用。

咸信各種免疫系統疾病或病症，包括關節或自體免疫系統之疾病或病症，皆可使用本文所揭示之一或多種本發明之分子而有效治療，諸如，突變CTLA-4 ECD多肽（如，SEQ ID NOS:1-73中之任一者，諸如，如，D3-54 （SEQ ID NO:36）、D3-69 （SEQ ID NO:50）或D3-27 （SEQ ID NO:24）突變CTLA-4 ECD），或是其融合蛋白（如，D3-54-IgG2 （SEQ ID NO:197或211）、D3-69-IgG2 （SEQ ID NO:199或213）、D3-29-IgG2 （SEQ ID NO:79或210））。該免疫系統之疾病或病症可為或是涉及，如，但不限於，愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、伯格氏症（Berger's Disease）、

大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿

病、第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應。移植物相關性疾病或病症包括移植物對抗宿主疾病（GVDH），諸如，與骨髓移植相關者，以及由與對於器官、組織或細胞移植物之移植（如，組織或細胞同種移植物或異種移植物，包括，如，皮膚、肌肉、神經元、胰島、器官、肝實質細胞等之移植物）的排斥造成或是與其相關之免疫病症。關於接受者對象體內之捐贈者組織、細胞、移植物或實體器官之移植而言，咸信本文所揭示之此等本發明分子（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是突變CTLA-4-Ig融合蛋白）可有效預防此種移植在接受者體內之急性排斥，及/或就長期之維持治療而言可預防此種移植在接受者體內之排斥（如，抑制來自捐贈者之胰島素生產性胰島細胞移植在罹患糖尿病之對象接受者體內的排斥）。

本發明包括任何此等本發明之突變CTLA-4-ECD多肽或是突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其用於抑制與至少一種上述之免疫系統疾病或病症相關之免疫反應。其亦提供任何此等本發明之突變CTLA-4-ECD多肽或是突變CTLA-4-Ig融合蛋白於製備用以抑制與至少一種上述免疫系統疾病或病症相關之免疫反應之藥物的用途。

於本文所述之方法中，本發明之分子，諸如，如，突變CTLA-4-ECD多肽（如，D3-54、D3-69、D3-29、D3-56、D3-75）或是包含本發明突變CTLA-4-ECD多肽之Ig融合蛋白（分別如，D3-54-IgG2、D3-69-IgG2、D3-29-IgG2、D3-56-IgG2、D3-75-IgG2），用以在對象體內抑制免疫反應或是治療由該對象體內內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症的有效量可包含自約0.0001微克每公斤（mg/kg）該對象體重至約200微克每公斤（mg/kg）該對象體重，諸如，如，自約0.001微克每公斤（mg/kg）該對象體重至約100微克每公斤（mg/kg）該對象體重，或是，如，自約0.001 mg/kg 該對象體重

至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50或75 mg/kg該對象體重。其可在該對象體內抑制一或多種免疫反應，包括，如，T細胞反應、T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2等之生成）、各種活化標記（如，CD25、IL-2受體等）之誘發、炎性分子之合成或生成、發炎、關節腫脹、關節壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。用以抑制免疫反應之本發明分子或組成份的有效量可為可以可偵測之量測量而抑制免疫反應或其症狀或徵兆的量。該免疫反應可經部份或完全抑制。用以治療免疫系統疾病或病症之有效量可為可舒緩、減少或減輕至少一種與該疾病或病症相關之症狀或生物反應或作用、預防該疾病或病症之進展或改善該對象之身體機能的量。

用以調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間反應的本發明分子或組成份之有效量可為可分別調控或抑制B7-陽性細胞與CD28-陽性及/或CTLA-4-陽性T細胞間結合之量。此（等）結合作用可經部份或完全之調控或抑制。

在部分此等方法中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體係以足以抑制免疫反應、治療由T細胞與B7-表現性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症或是調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間之反應的治療或預防有效量（或劑量）而對該對象進行投與。該經投與之融合蛋白二聚體一般而言係可溶性Ig融合蛋白二聚體。在部分此等方法中，本發明融合蛋白二聚體之有效量或劑量包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至約200毫克每公斤（mg/kg）該對象（諸如，如，人類）體重，或是自約0.001 mg/kg至約300 mg/kg該對象體重。舉例而言，該融合蛋白二聚體之有效量或劑量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、25、30、40、50、60、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250或300 mg/kg該對象

（諸如，如，人類，包括成人）體重。在部分情形下，該有效量或劑量係自約0.001毫克（mg）至約50毫克每公斤（kg）該對象體重，其包括，但不限於，對該對象投與自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg該對象（如，人類）體重，自約0.01 mg/kg至約50 mg/kg該對象體重，或是自約0.01 mg/kg至約25 mg/kg該對象體重；例如，約0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg、約10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg或100 mg/kg該對象（如，成人病患）體重。在部分情形下，該融合蛋白二聚體之有效量或劑量係自約2至10 mg/kg、約3至10 mg/kg、約3至5 mg/kg、約5至10 mg/kg、0.1至5 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至3 mg/kg、約0.05至2.0 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.1至2.0 mg/kg、約0.1至3.0 mg/kg、約0.1至0.5 mg/kg、約0.1至0.8 mg/kg、約0.1至0.6 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.1 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約1 mg/kg、約0.01至約5 mg/kg、約0.01 mg/kg至約3 mg/kg、約0.05 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.1 mg/kg至約1 mg/kg、約0.1 mg/kg至約5 mg/kg、約0.2至1 mg/kg、約0.2至0.6 mg/kg、約0.2至0.5 mg/kg 約0.3至1 mg/kg、約0.3至0.6 mg/kg、約0.3至0.5 mg/kg對象體重。在部分情形下，該有效量或劑量對於體重小於60 kg之對象而言係小於約500 mg（如，小於約100 mg、75 mg、50 mg、25 mg、12.5 mg或10 mg），對於體重介於60-100 kg之對象而言係小於約750 mg（如，小於約150 mg、100 mg、75 mg、37.5 mg或20 mg），或是對於體重超過100 kg之對象而言係小於約1000 mg（如，小於約500 mg、100 mg、50 mg、25 mg或10 mg）。

在另一態樣中，在部分此等本發明之方法中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白係以，如，足以抑制免疫反應、治療由T細胞與B7-表現性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症或是調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間之反應的

治療或預防有效量（或劑量）而對該對象進行投與。該融合蛋白（其通常係可溶性融合蛋白）之有效量或劑量可包含自約0.001 mg/kg至約300 mg/kg、約0.001 mg/kg至約200 mg/kg或約0.001 mg/kg至約300 mg/kg該對象（如，人類）體重。在一態樣中，該融合蛋白之有效量或劑量包含自約0.001 mg/kg至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、25、30、40、50、60、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250或300 mg/kg該對象體重。在另一態樣中，該有效量或劑量係自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg、自約0.01 mg/kg至約50 mg/kg或自約0.01 mg/kg至約25 mg/kg該對象體重。例示性之劑量或量包括約0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg、約10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg及100 mg/kg該對象（如，成人）體重。在另一態樣中，該融合蛋白之有效量或劑量係自約2至10 mg/kg、約3至10 mg/kg、約3至5 mg/kg、約5至10 mg/kg、0.1至5 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至3 mg/kg、約0.05至2.0 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.1至2.0 mg/kg、約0.1至3.0 mg/kg、約0.1至0.5 mg/kg、約0.1至0.8 mg/kg、約0.1至0.6 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.1 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約1 mg/kg、約0.01至約5 mg/kg、約0.01 mg/kg至約3 mg/kg、約0.05 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.1 mg/kg至約1 mg/kg、約0.1 mg/kg至約5 mg/kg、約0.2至1 mg/kg、約0.2至0.6 mg/kg、約0.2至0.5 mg/kg 約0.3至1 mg/kg、約0.3至0.6 mg/kg、約0.3至0.5 mg/kg對象體重。在部分態樣中，該有效量或劑量對於體重小於60 kg之對象而言係小於約500 mg（如，小於約100 mg、75 mg、50 mg、25 mg、12.5 mg或10 mg），對於體重介於60-100 kg之對象而言係小於約750 mg（如，小於約150 mg、100 mg、75 mg、37.5 mg或20 mg），或是對於體重超過100 kg之對象而言係小於約1000 mg （如，小於約500 mg、100 mg、50 mg、25

mg或10 mg）。

足以類似抑制免疫反應或是調控、治療由T細胞與B7-表現性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症或是調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間之反應的本發明核酸、載體、組合物及/或細胞之有效量可經判定。舉例而言，如欲將編碼此種本發明融合蛋白二聚體之載體投與至該對象，熟習技藝者可輕易判定該待投與之載體量，以使所欲之治療或預防有效量的該融合蛋白二聚體可能在該對象體內產生。

例示性之本發明融合蛋白二聚體包括任何該等述於上文及本文中者，其包括，如，包含兩個相同融合蛋白單體之融合蛋白二聚體，其中各個融合蛋白單體包含一本發明之突變CTLA-4-ECD多肽，以其C-端融合Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能之突變IgG Fc多肽）之N-端。例示性之突變CTLA-4-ECD多肽係包含選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列者。其中一種例示性之融合蛋白二具體細胞含兩個融合蛋白單體者，其中各個融合蛋白單體包含選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列。一般而言，該二聚體融合蛋白中之兩個單體融合蛋白係經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體中之半胱胺酸殘基間形成。

在任何上述之方法中，本發明之分子或組成份（如，本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或是多肽多聚體）、複合物、核酸、載體、組合物及/或細胞）可以組合物之形式對該對象進行投與。該組合物一般而言包含至少一種此等分子或組成份，以及賦形劑、載體或稀釋劑。該組合物可包含醫藥組合物，其包含至少一種此等分子或組成份，以及醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑（如，PBS）。本發明組合物之pH一般而言係介於自約pH 6.0至約pH 9.0，包括，如，自約pH 6.5至約pH 8.5，通常自約pH 7.0至約pH 8.0之間。在一態樣中，本發明組合物之pH一般而言係介於自約pH 3至約pH 10、自約pH 4至約pH 10、自約pH 5至

約pH 9、自約pH 6至約pH 9、自約pH 5.5至約pH 8.5、自約pH 6.0至約pH 6.7、自約pH 6.0至約pH 6.5、自約pH 6.2至約pH 8.7、自約pH 6.5至約pH 7.5、自約pH 6.2至約pH 7.0、自約pH 6.3至約pH 6.8、自約pH 6.4至約pH 6.8及約pH 7.0至約pH 7.4之間。在一態樣中，包含至少一種此等本發明之分子或組成份（諸如，如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）之組合物具有pH 5.5、pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4、pH 6.5、pH 6.6、pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9、pH 8.0、pH 8.1、pH 8.2、pH 8.3、pH 8.4、pH 8.5、pH 8.6、pH 8.7、pH 8.8、pH 8.9、pH 9.0、pH 9.1、pH 9.2、pH 9.3、pH 9.4、pH 9.5、pH 9.6、pH 9.7、pH 9.8、pH、9.9或pH 10.0之pH值。部分本發明之組合物包括一或多種鹽類（如，氯化鈉、磷酸鈉、氯化鈣及其類似者）、一或多種緩衝劑（如，HEPES、檸檬酸鈉、磷酸鈉（如，Na_2HPO_4/Na_3PO_4）、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、醋酸鹽、三（羥甲基）胺基甲烷（Tris）及其類似者）、一、二、三、四、五個或以上之醣類或糖類（如，蔗糖、甘露糖、麥芽糖、海藻糖、葡萄糖及其類似者）、以及/或是一、二、三、四個或以上之多元醇或糖醇（如，甘露糖醇、山梨糖醇、乙二醇、甘油、阿拉伯糖醇、赤藻糖醇、木糖醇、核糖醇、乳糖醇及其類似者）。可將一、二、三、四、五個或以上之單醣、雙醣及/或多醣包括於該組合物中。本發明之組合物可包含在對該對象進行投與時可有效抑制免疫反應之任何濃度的此種分子或組合物。舉例而言，在部分此等方法中（包括，如，其中需要免疫抑制之方法，諸如，但不限於，如，類風濕性關節炎或類似免疫病症之治療，或是用以抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或器官移植之排斥者），其係將包含醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑以及本發明之融合蛋白二聚體的醫藥組合物對該對象進行投與（如，經腸外、皮下、靜脈內、肌內等），其中該醫藥組合物包含本發明之融合蛋白二聚體，其濃度係自約0.001 mg/ml至約200 mg/ml、約0.001 mg/ml至約300

mg/ml、約0.01 mg/ml至約200 mg/ml、約0.01 mg/ml至約250 mg/ml、約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約0.001 mg/ml至約100 mg/ml、約0.001 mg/ml至約90 mg/ml、約0.01 mg/ml至約90 mg/ml、約0.01 mg/ml至約75 mg/ml、約0.1至約80 mg/ml、約0.1至約75 mg/ml、約0.1至約60 mg/ml、約0.1至約50 mg/ml、約0.1至約40 mg/ml、約0.1至約30 mg/ml、約1至約90 mg/ml、約1至約80 mg/ml、約1至約75 mg/ml、約1至約60 mg/ml、約1至約50 mg/ml、約1至約40 mg/ml、約1至約30 mg/ml、約1至約20 mg/ml、約1至約10 mg/ml、約1至約5 mg/ml、約5至約90 mg/ml、約5至約80 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約5至約60 mg/ml、約5至約50 mg/ml、約5至約40 mg/ml、約5至約30 mg/ml、約5至約20 mg/ml、約5至約10 mg/ml、約1至約5 mg/ml、約10至約75 mg/ml、約25 mg/ml至約75 mg/ml、約30 mg/ml至約60 mg/ml、約25至約50 mg/ml、約50 mg/ml至約100 mg/ml，其包括，如，約1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、約15 mg/ml、約25 mg/ml、約30 mg/ml、約40 mg/ml、約50 mg/ml、約60 mg/ml、約70 mg/ml、約80 mg/ml、約90 mg/ml或100 mg/ml。其他濃度亦可預期。在部分本文所述之本發明方法中，包括部分之治療或預防方法，其可經由單一之i.v.、s.c.、i.m.或i.p.注射而將介於約0.01毫升（ml）至約10 ml、約0.01 ml至約5 ml、約0.1 ml至約5 ml、約0.5 ml至約2ml、約1 ml至約2 ml之間之體積，其包括，如，0.01 ml、0.025 ml、0.05 ml、0.1ml、0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml、0.5 ml、0.75 ml、1 ml、2ml、3ml、4 ml、5 ml、10 ml、20ml、25 ml、50 ml、75 ml、100 ml、200 ml、250 ml、300 ml、500 ml、1000 ml等之體積的任何此種包含本發明融合蛋白之組合物（如，醫藥組合物）對該對象進行投與。關於本發明例示性組合物之進一步細節於本文他處討論。

對一特定對象進行投與之本發明分子的有效量或劑量可根據，如，該待治療之疾病、病症或病況、該待投與特定本發明突變CTLA-4分子之強度（亦即，其功效）（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體）、該分子之投藥模式、以及該對象耐

受特定量之該特定分子的個別能力而各異。舉例而言，在一種用以在罹患類風濕性關節炎（RA）之對象體內抑制免疫反應之方法中，或是一種用以治療RA之方法中，待對該對象投與之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體（如，D3-29-IGg2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2、D3-75-IgG2等）的有效量或劑量可根據各種因子而判定，包括該突變CTLA-4-Ig二聚體之強度、該二聚體之投藥模式及/或該對象類風濕性關節炎症狀或徵兆之嚴重性。在一態樣中，本發明特定突變CTLA-4-Ig二聚體之有效量或劑量可藉著比較此種突變CTLA-4-Ig二聚體之強度與Orencia®二聚體之強度而判定。可有效治療類風濕性關節炎及相關病症之Orencia®二聚體劑量係為技藝中所已知。舉例而言，Orencia®二聚體一般而言係以約10 mg Orencia®每公斤（kg）人類體重之劑量，經由靜脈內而對罹患類風濕性關節炎之人類投與。相較Orencia®約為「X」倍較強之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較該Orencia®二聚體劑量約為「X」倍較小之劑量而對罹患類風濕性關節炎之人類投與（如，經靜脈內、皮下或以其他本文所述之方式），以達成約相當於該Orencia®二聚體之治療作用（如，抑制免疫反應）。如需要較大之治療作用，可輕易判定比例增加之該突變CTLA-4-Ig二聚體之量或劑量，並對該人類進行投與。

在任何本文所述之該等方法中，本發明之分子或組成份（如，本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或是多肽多聚體）、複合物、核酸、載體、組合物及/或細胞）可經腸外、皮下或靜脈內，或是如本文他處所述進行投與。本發明之分子或組成份可以治療有效之量而每週、每雙週（每兩週）或每雙月（每兩個月）各一、二、三或四次進行投與。投與可持續1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個月或更長（如，一、二、三或四年或以上，包括該對象之一生）之週期。

任何本文所述之方法可進一步包含對該對象投與有效量之至少一種其他之治療性或免疫抑制性試劑或化合物。因此，舉例而言，本發明提供一種抑制免疫反應之方法，其包含對須要該方法

之對象投與（1） 有效量之至少一種第一免疫抑制劑，其中各個此種第一免疫抑制劑係本發明之多肽、核酸、載體、組合物及/或細胞，以及（2） 有效量之至少一種第二免疫抑制劑，其中該對象體內之免疫反應受到抑制。

各種其他之治療性或免疫抑制性試劑（其並非本發明之分子）皆可結合本發明之分子（如，本發明之多肽、核酸、載體、組合物及/或細胞）而使用或投與。此等試劑包括，如，疾病修飾性抗風溼藥物（DMARD） （諸如，如，胺甲蝶呤（MTX）、細胞因子拮抗劑（如，IL-2或IL-6拮抗劑）、類固醇化合物（如，皮質類固醇，糖皮質類固醇，如，強體松（prednisone）或甲基強體松）、非類固醇化合物、水楊酸鈉或鎂、伊布洛芬（ibuprofen）、乙醯水楊酸、乙醯胺苯酚、抗體、可阻斷抗炎細胞因子生成之生物劑、Raptiva® 依法利珠（efalizumab）、抗炎試劑或化合物及非類固醇抗炎藥物（NSAID）。此種其他之治療性或免疫抑制性試劑可在包含該其他試劑以及醫藥可接受性賦形劑或載體之醫藥組合物中對該對象進行投與。該待投與試劑之有藥量或劑量將取決於該特定試劑。部分此等試劑係目前用於免疫抑制療法中者，且適當之劑量可根據該待治療之疾病、病症或病況以及該對象耐受特定量或劑量之能力而決定。上述並非本發明分子之免疫抑制劑之例示性劑量係為已知。該並非本發明分子之其他免疫抑制劑可與本發明分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）之投與同時或是在其之前或之後進行投與。

治療之療程，包括，如，劑量、投藥時程、投藥方法（如，靜脈注射、皮下注射等）及包含至少一種此等本發明之分子或組成份的醫藥組合物，可根據該待治療之疾病、病症或病況而各異。可對一對象投與一或多種此等本發明之分子或組成份；各個此等分子或組成份並不需要在相同之醫藥調配物中、藉由相同之投藥方法、以相同之量或是藉由相同之投劑頻率時程而進行投與。

在部分此等方法中，舉例而言，可將約1 ml之包含醫藥可接受性賦形劑、載體或稀釋劑以及約50 mg/ml濃度之本發明融合蛋白

二聚體之醫藥組合物，經由皮下對需要免疫抑制之對象（如，成人）（如，罹患類風濕性關節炎之對象）進行投與。此種起始劑量係50 mg之融合蛋白二聚體。對於具有100 kg體重之對象而言，此起始劑量相當於每公斤該對象體重之0.5 mg融合蛋白二聚體。在該第一劑後一或兩週，經由皮下投與第二相同之量。視需要而每週、每雙週或一個月一次或是以更高或更低頻率經由皮下投與額外劑量。此等組合物及投藥形式咸信可用於，例如，治療罹患類風濕性關節炎或是其中需要免疫抑制之另一免疫病症，或是抑制人類接受者對於來自人類捐贈者之組織、細胞、移植物或器官移植之排斥。

治療類風濕性關節炎之方法

類風濕性關節炎係最常見之全身性炎性自體免疫疾病之一，且其估計影響1-2%之成人族群。參見，如，Dipiro, J.T., 類風濕性關節炎，於Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach [藥物治療：病生理學方法], 1671-1682 （Talbert, R.T. et al. eds., McGraw-Hill, New York, 6th ed. 2005）。該疾病之特徵為滑液膜之增生及炎性細胞之浸潤，包括活化之T細胞。活化之T細胞在類風濕性關節炎之進程中，藉由刺激各種細胞類型產生促炎性細胞因子（諸如，IL-1、IL-6及TNF-α）、自體抗體及基質金屬蛋白酶而扮演關鍵角色（Hoffman, R.W., Front. Biosci. 6:1369-1378 （2001）; Choy, E.K. et al., N. Engl. J. Med 344:907-916 （2001））。T細胞對於類風濕性關節炎之進程的強力貢獻使得T細胞之活化成為治療干預之合理目標。此等炎性分子咸信可造成與類風濕性關節炎相關之發炎反應、組織損傷（如，關節損傷）及疼痛。

藉由CD28受體與CD80及/或CD86配位體間之作用而中介之T細胞共刺激作用對於大部分T細胞之活化而言具有必要性（Riley, J.L. et al., Blood 105:13-21 （2005））。可拮抗該CD80/CD86 – CD28共刺激途徑之治療性或預防性試劑，諸如，Orencia® （阿巴西普（Abatacept））融合蛋白（其係一可溶性二聚體hCTLA-4-Ig融合蛋

白）已經顯示可臨床有效治療類風濕性關節炎（Kremer, J.M. et al., Ann. Intern. Med. 144:865-876 （2006）; Genovese, M.C. et al., N. Engl. J. Med. 353:1114-1123 （2005））。咸信阿巴西普在以治療或預防有效量而對一對象（如，成人）進行活體內之投藥時，可藉由結合抗原呈遞細胞上之CD80及/或CD86配位體而產生免疫抑制功能，因而預防此等配位體之任一或兩者與T細胞上之CD28受體作用。

目前阿巴西普已經核准用於治療具有中度至嚴重活性RA之成人病患，該等病患係對一或多種DMARDs （諸如，胺甲蝶呤）或TNF拮抗劑具有不適當之反應者。阿巴西普係以靜脈內之輸液，以10 mg/kg該對象體重之劑量對成人RA病患進行投藥。在該第一劑之後，分別在該第一劑後之二及四週時，投與10 mg/kg該融合蛋白之第二及第三劑。每四週（亦即，每個月一次）投與後續之劑量。阿巴西普之靜脈內輸液咸信為傳遞欲在類風濕性關節炎之治療中取得所欲功效所需之高劑量所必須者。

其他類風濕性關節炎之當前療法包括投藥非專一性免疫抑制劑（諸如，胺甲蝶呤），以及類固醇及非類固醇抗炎藥物。此外，亦已核准可靶向特定促炎細胞因子之生物試劑，諸如，TNF-α（如，Remicade® 英夫利西單抗（infliximab）、Enbrel® 益賽普（entanercept）、Humira® 阿達木單抗（adalimumab））及IL-1（如，Kineret® 阿那白滯素（anakinra））。然而，諸多此等法具有顯著之作用—其部分具毒性—特別係在長期投藥時。

盡管具有各種療法，RA之治療仍有顯著未達成之需求。舉例而言，60%具有失敗之先前DMARD治療之人類RA病患及80%具有失敗之先前抗-TNF治療之人類RA病患，在以Orencia治療6個月後，仍未達成ACR50分值（Kremer J.M. et al., Ann. Intern. Med. 144:865-876 （2006）; Genovese, M.C. et al., N. Engl. J. Med. 353:1114-11 （2005））。使用阿巴西普及貝拉西普（LEA29Y-Ig）融合蛋白於成人RA治療中之劑量反應實驗指出，該功效係劑量相關性者，且在最高試驗劑量下仍未飽和（Kremer, J.M. et al., N.

Engl. J. Med. 349:1907-1915（2003）；Moreland, L.W. et al., Arthrit. Rheum. 46:1470-1479 （2002））。

對於hCD80及/或hCD86之結合性高於阿巴西普之本發明可溶性二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白預期在對患有RA之病患投藥時可產生大於阿巴西普之較強免疫抑制作用。此種突變CTLA-4-Ig可以低於阿巴西普之較低濃度結合類似數目之CD80及/或CD86配位體。

分別具有較高之CD80或CD86結合性以及較慢之CD80或CD86解離速率的突變CTLA-4-Ig在此等配位體上具有較長之停留時間。此種較長之停留時間預期可與活體內之較高功效相關。咸信此種突變CTLA-4-Ig可以低於阿巴西普之劑量而對患有RA之對象有效進行治療性或預防性之治療。亦即，咸信此種突變CTLA-4-Ig在以低於10 mg/kg該對象體重阿巴西普劑量之劑量而對該RA對象投藥時，其可達成相當於阿巴西普之功效程度。本發明提供可溶性之二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其具有對於hCD80及/或hCD86之各異結合性。對於hCD86具有實質上高於阿巴西普之結合性的可溶性二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白在以實質上小於阿巴西普之劑量而對該RA對象投藥時，其可達成相當於阿巴西普之功效程度。較低劑量此種突變CTLA-4-Ig之投與可容許使用較目前用以投藥阿巴西普者（靜脈注射）更為便利之投藥方法（如，皮下注射）。

亦咸信，較阿巴西普或貝拉西普融合蛋白具有較高免疫抑制強度之本發明可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白將可在RA病患之治療中取得較高程度之功效。更具免疫抑制性之突變CTLA-4-Ig預期可較阿巴西普更為有效的減輕與RA相關之症狀，並抑制RA有害身體作用之進展。此種突變CTLA-4-Ig可以介於約0.1 – 200 mg/ml之濃度而調配在醫藥可接受之稀釋劑、賦形劑或載體（如，PBS）中。RA對象之治療可藉著以適當判定之投劑頻率（如，起始投劑接續每個月2至4次之一劑、每個月一劑或每兩個月一劑），以皮下注射或靜脈輸液，對該對象投與治療或預防有效量（劑量）之突變

CTLA-4-Ig而完成。該投劑將取決於該對象疾病或症狀之嚴重性。舉例而言，其可投與不超過約10 mg/kg （包括，如，歐1 mg/kg、0.5 mg/kg、0.25 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg或9 mg/kg）該對象體重之突變CTLA-4-Ig量或劑量。更具免疫抑制性之突變CTLA-4-Ig可容許使用較阿巴西普一般使用之投劑時程而言較不經常之投劑時程（如，每兩個月一次）。或者，可對患有RA之對象投與大於約10 mg/kg該對象體重（如，自約10 mg/kg至約100 mg/kg、自約10 mg/kg至約25 mg/kg、約10 mg/kg至約50 mg/kg、約10 mg/kg至約75 mg/kg等，包括，如，約15 mg/kg、 20 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、60 g/kg、70 mg/kg、75 mg/kg、80 mg/kg、90 mg/kg、100 mg/kg），如該對象之疾病病況及/或症狀可核准此種量或劑量。

用以在罹患RA之人類體內治療RA之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體的有效量可根據各種因子判定，諸如，該突變CTLA-4-Ig二聚體之強度、該二聚體之投藥模式及/或該對象風濕性關節炎症狀或徵兆之嚴重性。舉例而言，本發明突變CTLA-4-Ig二聚體之有效量或劑量可藉著比較此種二聚體與Orencia®二聚體之強度，並根據一般而言會對具有類似RA症狀或徵兆之人類對象投與之Orencia®量或劑量，判定可產生相較於Orencia®之所欲免疫抑制作用（如，改良或約相當之作用）之該突變CTLA-4-Ig二聚體之有效量或劑量而確認。

在一具體實例中，舉例而言，本發明提供一種在需要此種治療之病患體內治療類風濕性關節炎之方法，該方法包含藉由，如，靜脈或皮下注射而對該對象投與有效量之本發明可溶性二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白。該有效量或劑量可包含自約0.001毫克（mg）至約10毫克每公斤（kg）該對象體重，其包含，但不限於，如，對該對象投與自約0.01 mg/kg至約10 mg/kg該對象體重、自約0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg該成人病患體重。在部分情形下，該有效量或

劑量係自約2至10 mg/kg、約3至10 mg/kg、約3至5 mg/kg、約5至10 mg/kg, 0.1至5 mg/kg體重、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至3 mg/kg體重、約0.05至2.0 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至2.0 mg/kg、約0.1至2.0 mg/kg、約0.1至3.0 mg/kg、約0.1至0.5 mg/kg、約0.1至0.8 mg/kg、約0.1至0.6 mg/kg、約0.2至1 mg/kg、約0.2至0.6 mg/kg、約0.2至0.5 mg/kg、約0.3至1 mg/kg、約0.3至0.6 mg/kg、約0.3至0.5 mg/kg對象體重。在部分情形下，該有效量或劑量對於體重小於60 kg之對象而言係小於約500 mg （如，小於約100 mg、75 mg、50 mg、25 mg或12.5 mg)，對於體重介於60-100 kg之對象而言係小於約750 mg（如，小於約150 mg、100 mg、75 mg、37.5 mg或20 mg)，或是對於體重超過100 kg之對象而言係小於約1000 mg （如，小於約500 mg、100 mg、50 mg、25 mg或10 mg)。在該第一劑後，後續之相當劑量係以1、2、4、8、10、12、14或16週之間期投與。後續投劑之頻率可如所需進行判定。

此種突變CTLA-4-Ig融合物可與醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑共同調配，以產生適於對一對象（如，哺乳動物，包括人類）進行投藥之醫藥組合物。該融合蛋白在該組合物中之濃度可介於自約0.01 mg/ml至約300 mg/ml或自約0.01 mg/ml至約200 mg/ml，其包括，但不限於，如，自約0.1 mg/ml至約300 mg/ml、自約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約0.1 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約50 mg/ml、約1至約100 mg/ml、約1至約75 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約10至約75 mg/ml、約10至約60 mg/ml、約25至約60 mg/ml、約30至約60 mg/ml、約25至約50 mg/ml、約40至約50 mg/ml、約25 mg/ml或約50 mg/ml。亦可預期其他組合物，包括該等於上文及下文討論者。

此種治療預期可在該對象體內降低與類風濕性關節炎相關之一或多種徵兆及/或症狀，諸如，如，發炎、關節壓痛、關節腫脹、疼痛及僵硬。此種治療可在該對象體內減少該疾病之進一步進展。舉例而言，此種治療可在該對象體內見少結構損傷之進展。此種治療可改善該對象之身體機能。

抑制組織、細胞、移植物或器官移植排斥之方法

在另一態樣中，本發明提供一種抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細胞、皮膚移植物或器官移植之排斥，或是壓抑與其相關之免疫反應之方法，該方法包含對該接受者對象投與治療有效量之下列一或多者：(1) 本發明之多肽(如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白)；(2) 包含一或多個本發明多肽之多聚體(如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體)；(3) 包含至少一種本發明多肽之複合物；(4) 本發明之核酸(如，編碼本發明多肽之核酸)；(5) 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；(6) 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或(7) 本發明之組合物，因而抑制該接受者對象對於組織、細胞、皮膚移植物或器官移植之排斥。該捐贈者及接受者可為相同生物種或不同生物種。該捐贈者及接受者可為哺乳動物，諸如，人類、非人類靈長類(如，猴、猩猩)、羊、貓、狗、豬、牛、馬等。在部分此等方法中，該本發明之多肽、複合物、載體及/或細胞係在組織、細胞、皮膚移植物或器官移植之前、同時或之後而對該接受者對象投與。該有效量一般而言包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約200 mg/kg該對象體重。在部分此等方法中，舉例而言，該有效量包含自約0.001毫克每公斤(mg/kg)該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250或300毫克每公斤(mg/kg)該對象體重。在部分此等方法中，該有效量包含自約0.001毫克每公斤(mg/kg)該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、50或75毫克每公斤(mg/kg)該對象體重。該本發明之多肽、複合物、核酸、載體及/或細胞可在移植過程中、在其之前或是在其之後立即對該接受者對象進行投與。或者或是此外，此種本發明之分子可在移植後之一或多個小時後、在移植

後一天及/或在其後每日或是隨需要在移植後至少每週一次、至少每兩週一次或是至少每個月一次，如所需直到12, 24, 或36個月或以上或是更長時間而進行投與。該器官移植可涉及任何器官，諸如，如，腎臟、肝臟、心臟或肺。

該待對器官、組織或細胞移植之接受者對象投予以抑制移植排斥（或是壓抑與此種移植相關之免疫反應）之本發明突變CTLA-4分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體）的有效量或劑量一般而言係根據此種分子之強度、投藥途徑、移植類型（如，細胞、組織、器官）、該對象之病史及/或該移植接受者對象建議移植排斥之免疫反應症狀或徵兆的嚴重性而判定。舉例而言，該本發明突變CTLA-4二聚體（如，D3-29-IGg2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2、D3-75-IgG2二聚體等）之有效量或劑量可藉著比較此種二聚體與貝拉西普（Belatacept）二聚體之強度而判定。可用於預防或壓抑與腎臟移植相關之免疫反應的貝拉西普有效劑量係為已知。舉例而言，貝拉西普係以每個月約5 mg或10 mg每公斤該人類體重之量或劑量，在一人類自一腎臟捐贈者進行腎臟移植之後，以靜脈輸液對該人類進行投與。相較貝拉西普約為「X」倍較強之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較該貝拉西普劑量約為「X」倍較小之量或劑量而對具有腎臟移植之人類投與（如，經靜脈內、皮下或以其他本文所述之方式），以達成約相當於貝拉西普之治療作用（如，抑制免疫反應）。如需要較大之治療作用，可輕易判定並投與比例增加之該突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體之量或劑量。

在另一態樣中，本發明提供一種用以在由捐贈者接受此種組織、細胞或器官之對象體內治療組織、細胞或器官移植排斥之方法，該方法包含對該接受者投與治療有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體及/或細胞，因而抑制該接受者對象對於該捐贈者組織、細胞或器官移植之排斥。該本發明之多肽、複合物、核酸、載體及/或細胞可在細胞、組織或器官移植之前、同時或之後對該對象進行投與。

在一態樣中，本發明提供一種在需要該方法之接受者對象體內抑制對於來自捐贈者之胰島細胞移植排斥之方法，該方法包含在將胰島細胞自捐贈者之胰臟移植進入該對象體內之前、同時或之後，對該對象投與有效量或劑量之本發明突變CTLA-4分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）。該對象（如，人類）一般而言罹患糖尿病（如，IDDM），且此種方法可用於治療診斷具有或罹患糖尿病之對象。胰島移植流程係為技藝中所已知。一般而言，其係自一去世器官捐贈者之胰臟取出胰島，純化並加工，接著移植進入罹患糖尿病之接受者對象體內。在移植之後，該等胰島中之β細胞開始製造並釋出胰島素，因而降低該接受者對象對於胰島素之需求。

在此等抑制移植排斥之方法中，本發明之突變CTLA-4分子（如，突變CTLA-4-Ig）可與醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑共同調配，以產生適於對一對象（如，哺乳動物，包括人類）進行投藥之醫藥組合物。部分此等方法包含投與一醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑，以及具有自約0.01 mg/ml至約300 mg/ml或約0.01 mg/ml至約200 mg/ml，其包括，但不限於，如，自約0.1 mg/ml至約300 mg/ml、自約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約0.1 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約50 mg/ml、約1至約100 mg/ml、約1至約75 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約10至約75 mg/ml、約10至約60 mg/ml、約25至約60 mg/ml、約30至約60 mg/ml、約25至約50 mg/ml、約40至約50 mg/ml、約25 mg/ml或約50 mg/ml濃度之本發明CTLA-4-Ig二聚體。亦可預期其他組合物，包括該等於上文及下文討論者。

抑制免疫反應之方法

在另一態樣中，本發明包括本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或多聚體多肽）、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以在哺乳動物體內（如，人類或非人類靈長類）抑制或壓抑免疫反應之藥物的用途。可受到抑制之免疫反應包括，如，T細

胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之合成或生成、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。

本發明亦包括本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或多聚體多肽）、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以治療免疫系統疾病或病症之藥物的用途。該免疫系統疾病或病症可為由T細胞與CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞在哺乳動物體內之作用中介者。該免疫系統疾病或病症可為免疫系統之疾病或病症，諸如，風濕性之疾病或病症，或是自體免疫疾病或自體免疫病症。此種免疫系統疾病或病症可為或是涉及，如，但不限於，愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、貝西氏症候群（Behcet's syndrome）、伯格氏症（Berger's Disease）、大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小

板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿病、第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應。

本發明亦提供本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以抑制CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞與CD28-陽性及/或CTLA-4-陽性T細胞間作用之藥物的用途。在另一態樣中，本發明包括本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以在哺乳動物體內治療組織或器官移植排斥（如，實體器官移植排斥（如，腎臟、肺、肝臟、心臟等））之藥物的用途。

評估免疫反應

由本發明之多肽、核酸、載體、病毒、假病毒、VLP或組合物所壓抑之免疫反應可以任何適當之技術測量。可用以評估體液免疫反應之可用技術實例包括流式細胞計數、免疫印跡分析、免疫組織化學分析、免疫沈澱分析、放射免疫分析（RIA）及酶免疫分析。酶免疫分析包括酶連免疫流式分析（ELIFA）及酶連免疫吸附分析（ELISA），包括夾層ELISA及競爭性ELISA分析。亦可將HPLC及毛細電泳（CE）用於免疫分析中，以偵測抗體與目標物質之複合物。有關進行此等技術之廣泛指引及相關原則述於，如，Harlow and Lane （1988） Antibodies, A Laboratory Manual [抗體，實驗室手冊], Cold Spring Harbor Publications, New York，Hampton R et al. （1990） Serological Methods a Laboratory Manual [血清學方法實驗室手冊], APS Press, St. Paul Minn.，Stevens （1995） Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective [臨床免疫學及血清學：實驗室觀點], CRC press，Bjerrum （1988） Handbook of Immunoblotting of Proteins [蛋白免疫印跡手冊], Vol. 2，Zoa （1995） Diagnostic Immunopathology: Laboratory Practice and Clinical Application [診斷免疫病理學：實驗室操作及臨床應用], Cambridge University Press，Folds （1998） Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization [臨床診斷免疫學：品質確認及標準化之操作流程], Blackwell Science Inc.，Bryant （1992） Laboratory Immunology & Serology [實驗室免疫學及血清學] 3rd版, W B Saunders Co.，及Maddox D E et al. （1983） J. Exp. Med. 158:1211。有關ELISA技術之指引及相關原則述於，如，Reen （1994） Methods Mol. Biol. 32:461-6，Goldberg et al. （1993） Curr. Opin. Immunol. 5（2）:278-81，Voller et al. （1982） Lab. Res. Methods Biol. Med. 5:59-81，Yolken et al. （1983）Ann. NY Acad. Sci. 420:381-90，Vaughn et al.（1999）Am. J. Trop. Med. Hyg. 60（4）:693-8，及Kuno et al. （1991） J. Virol. Methods 33（1-2）:101-13。有關流式細胞計數技術之指引提供於，

如，Diamond（2000）In Living Color : Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting [彩色動畫：流式細胞計數及細胞分選操作流程], Springer Verlag，Jaroszeki （1998） Flow Cytometry Protocols [流式細胞計數操作流程], 1st Ed.，Shapiro （1995） Practical Flow Cytometry [實用流式細胞計數], 3rd 版，Rieseberg et al. （2001） Appl. Microbiol. Biotechnol. 56（3-4）:350-60，Scheffold and Kern （2000） J. Clin. Immunol. 20（6）:400-7，及McSharry （1994） Clin. Microbiol. Rev. （4）:576-604。

胞毒性及其他T細胞免疫反應亦可由任何適當之技術測量。此等技術之實例包括ELISpot分析（特別是IFN-γ ELISpot）、胞內細胞因子染色（ICC）（特別是結合FACS分析）、CD8+ T細胞四聚體染色/FACS、標準及經修飾之T細胞增殖分析、鉻釋放CTL分析、限制性稀釋分析（LDA）及CTL殺傷分析。有關T細胞增殖分析之指引及原則係述於，如，Plebanski and Burtles（1994） J. Immunol. Meth. 170:15，Sprent et al. （2000） Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 355(1395):317-22，及Messele et al.（2000） Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(4):687-92。LDA係述於，如，Sharrock et al.（1990） Immunol. Today 11:281-286。ELISpot分析及相關之原則係述於，如， Czerinsky et al.（1988） J. Immunol. Meth. 110:29-36，Olsson et al. （1990） J. Clin. Invest. 86:981-985，Schmittel et al. （2001） J. Immunol. Meth. 247（1-2）:17-24，Ogg and McMichael （1999） Immunol. Lett. 66(1-3):77-80，Schmittel et al.（2001） J. Immunol. Meth. 247（1-2）:17-24，Kurane et al. （1989） J. Exp. Med. 170（3）:763-75，Chain et al.（1987） J. Immunol. Meth. 99(2):221-8，Czerkinsky et al. （1988） J. Immunol. Meth. 110:29-36，及美國專利第5,750,356及6,218,132號。四聚體分析係述於，如，Skinner et al.（2000） J. Immunol. 165（2）:613-7。其他T細胞分析技術則述於Hartel et al. （1999） Scand. J. Immunol. 49（6）:649-54及Parish et al. （1983） J. Immunol. Meth. 58（1-2）:225-37。

T細胞之活化亦可藉由測量CTL之活性或是活化抗原（諸如，

IL-2受體、CD69或HLA-DR分子）之表現而分析。純化T細胞之增殖可在混合淋巴細胞反應（MLR）分析中測量；此等分析係為技藝中所熟知。

ELISpot分析係測量分泌特定細胞因子之T細胞數目，該等細胞因子諸如IFN-γ或TNF-α，其可作為T細胞效應子之標記。細胞因子專一性之ELISA套組係可由市售購得者（如，IFN-γ專一性ELISpot可由R&D Systems, Minneapolis, MN取得。

其他可用以評估及測量本發明分子（如，本發明之多肽，如，本發明之可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白）壓抑或抑制T細胞活化及/或T細胞增殖之能力的方法述於下文實例段落中之實例5-8。

投藥方法

在任何本文所述之方法中，包含適當醫藥可接受性賦形劑或載體(如，PBS)以及有效量之本發明分子(諸如本發明之多肽(如，突變CTLA-4 ECD或是單體、二聚體或多聚體突變CTLA-4-Ig）或複合物）之可注射性醫藥組合物可經由腸外、肌內、腹膜內、靜脈內、真皮下、穿皮、皮下或皮內而對宿主進行投與。或者，可使用生物彈道（biolistic）蛋白傳遞技術（疫苗槍傳遞）(其實例如本文他處所討論)。亦可使用任何其他適當之技術。多肽之投與可由脂質體協助。任何此種傳遞技術皆可結合本文所述之任何治療或預防方法而用以傳遞本發明之多肽或複合物。

儘管下列之討論主要係關於核酸，咸將可明瞭，其同樣可應用於本發明之核酸載體。本發明之核酸或其組合物可以任何適當之投藥途徑而對宿主進行投與。在本發明之部份態樣中，核酸之投與係經腸外（如，皮下（s.c.）、肌內（i.m.）或皮內（i.d.））、局部或穿皮進行。該核酸可使用針或其他類似之裝置，藉由注射而直接引入組織中（諸如，肌肉）。參見，如，Nabel et al. （1990），上述文獻；Wolff et al. （1990） Science 247:1465-1468)，Robbins （1996） Gene Therapy Protocols [基因療法操作流程], Humana Press, NJ，及Joyner （1993） Gene Targeting: A Practical Approach

[基因靶向：實用方法], IRL Press, Oxford, England，及美國專利第5,580,859及5,589,466號。其他方法，諸如，「生物彈道」或顆粒中介性之轉形作用（參見，如，美國專利第4,945,050及5,036,006號，Sanford et al., J. Particulate Sci. Tech. 5:27-37 （1987），Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568-72 （1990），及Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-30 （1991））。此等方法不僅可用於在活體內將DNA引入對象體內，諸如，哺乳動物，亦可用於進行細胞之活體外修飾，以再次引入哺乳動物體內（其在本文他處進一步討論）。

就標準之基因槍投藥而言，其係使該目標載體或核酸沈澱於顯微金屬珠之表面。該等微粒經由衝擊波或膨脹之氦氣加速，並穿透組織至數個細胞層之深度。舉例而言，由Agacetus, Inc. Middleton WI所製造之Accel™基因傳遞裝置可適用於此具體實例中。該核酸或載體可以此等技術而經由，如，肌內、穿皮、真皮下、皮下及/或腹膜內進行投與。有關生物彈道傳遞之其他裝置及技術述於國際專利申請公開案WO 99/2796、WO 99/08689、WO 99/04009及WO 98/10750，以及美國專利第5,525,510、5,630,796、5,865,796及6,010,478號。

該核酸可結合轉染協助劑而投與，其實例於上文討論。該核酸可局部及/或藉由液態顆粒傳遞(相對於固態顆粒生物彈道傳遞)而進行投與。可適用作為本發明核酸傳遞載劑之此等核酸傳遞技術、組合物及其他建構物的實例提供於美國專利第5,591,601、5,593,972、5,679,647、5,697,901、5,698,436、5,739,118、5,770,580、5,792,751、5,804,566、5,811,406、5,817,637、5,830,876、5,830,877、5,846,949、5,849,719、5,880,103、5,922,687、5,981,505、6,087,341、6,107,095、6,110,898號，以及國際專利申請公開案WO 98/06863、WO 98/55495及WO 99/57275。

或者，該核酸可藉由脂質體基礎性基因傳遞之方式而對該宿主進行投與。有關於脂質體基礎性基因傳遞之例示性技術及原則提供於，如，Debs and Zhu （1993） WO 93/24640；Mannino and

Gould-Fogerite （1988） BioTechniques 6（7）:682-691；Rose U.S. Pat No. 5,279,833；Brigham （1991） WO 91/06309；Brigham et al.（1989）Am. J. Med. Sci. 298:278-281；Nabel et al.（1990）Science 249:1285-1288；Hazinski et al. （1991） Am. J. Resp. Cell Molec. Biol. 4:206-209；及Wang and Huang （1987） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855），及Felgner et al.（1987） Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:7413-7414）。可用於傳遞核酸之適當脂質體醫藥可接受性組合物進一步述於本文他處。

可將任何量之本發明核酸用於本發明之方法中。舉例而言，可使足夠之核酸調配於醫藥可接受之賦形劑或載體中，並對一對象進行投與，以使該經編碼之多肽或複合物可以咸信可有效，例如，抑制該對象體內之免疫反應、抑制內源性B7-陽性及胞與CD28-陽性細胞在該對象體內之作用或是抑制組織、細胞、器官或移植物移植排斥的量而在該對象體內生成。在其中一種形式中，當該核酸係以注射投與時，其係投與約50微克（μg）至100 mg之核酸。在一例示性之應用中，為壓抑免疫反應，其以注射或電穿孔或其他適當之傳遞方法（如，基因槍、經由皮膚壓印及脂質轉染（lipofection）），將包含PBS以及編碼有效量突變CTLA-4多肽之DNA載體量的醫藥組合物，對需要治療之對象（如，罹患其中需要免疫抑制治療之免疫系統疾病或病症之對象）進行投與。其中一種例示性之載體示於圖1。

在經由基因槍而投與時，用於本發明方法中之DNA質體量係，如，自約100至約1000倍低於直接注射（如，經由標準之針注射）所用之量。儘管具有此種敏感性，可在此種生物彈道傳遞技術中使用至少約1 μg之核酸。

RNA或DNA病毒載體系統可用於傳遞編碼本發明多肽之核酸。病毒載體可在活體中直接對一對象進行投與，或者其可在試管中用於治療細胞，並以活體外之形式將該等經修飾之細胞對該對象進行投與。可用之病毒載體包括該等於上文討論者，諸如，腺相關病毒、腺病毒、逆轉錄病毒、慢病毒及單純皰疹病毒載體。

使用此等病毒載體，本發明之核酸可輕易轉移進入該對象之目標細胞及組織中。此外，使用逆轉錄病毒、慢病毒及腺相關病毒基因轉移法，其可能將本發明之核酸納入該宿主之基因組中，因而造成該經插入核酸之持續表現。

包含至少一種本發明核酸之本發明病毒載體的傳遞咸信可在該載體所投與之對象體內壓抑免疫反應。視情況者，部份本發明之預防及/或治療方法係以足以抑制可偵測性免疫反應的適當病毒載體劑量而實施。可使用任何適當濃度之包含本發明核酸的任何適當病毒載體而壓抑該免疫反應。舉例而言，可對該對象宿主投與一種群之逆轉錄病毒載體（其實例述於，如，Buchscher et al.（1992）J. Virol. 66(5) 2731-2739，Johann et al.（1992）J. Virol. 66 (5):1635-1640 (1992)，Sommerfelt et al.,（1990） Virol. 176:58-59，Wilson et al.（1989） J. Virol. 63:2374-2378，Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991)， Wong-Staal et al., PCT/US94/05700，Rosenburg and Fauci （1993） in Fundamental Immunology, Third Edition [基礎免疫學，第三版] Paul （ed.） Raven Press, Ltd., New York及其中之參考文獻），AAV載體（如述於，如，West et al.（1987） Virology 160:38-47，Kotin （1994） Human Gene Therapy 5:793-801，Muzyczka（1994） J. Clin. Invest. 94:1351，Tratschin et al.（1985） Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260，美國專利第4,797,368及5,173,414號，及國際專利申請公開案WO 93/24641），或是腺病毒載體 （如述於，如，Berns et al.（1995） Ann. NY Acad. Sci. 772:95-104; Ali et al.（1994） Gene Ther. 1:367-384; and Haddada et al.（1995） Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3) :297-306)，以使其產生該載體中所包含核酸之免疫抑制含量表現，因而造成所欲之免疫抑制反應。其他適當類型之病毒載體述於本文他處（包括適當逆轉錄病毒、AAV及腺病毒載體之替代實例）。

此等及其他類型病毒載體顆粒之適當感染條件述於，如，Bachrach et al., J. Virol., 74 (18), 8480-6 (2000)，Mackay et al., J.

Virol., 19（2）, 620-36 （1976），及Fields Virology [病毒學], 上述文獻。可用於製備及應用病毒載體之其他技術提供於，如，"Practical Molecular Virology: Viral Vectors for Gene Expression [實用分子病毒學：用於基因表現之病毒載體]"於 Methods in Molecular Biology [分子生物學方法], vol. 8, Collins, M. Ed.,（Humana Press 1991），Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy [病毒載體：基礎科學及基因療法], 1st Ed.（Cid-Arregui et al., Eds.） （Eaton Publishing 2000），"Viral Expression Vectors [病毒表現載體]," 於Current Topics in Microbiology and Immunology [微生物學及免疫學之當前主題], Oldstone et al., Eds.（Springer-Verlag, NY, 1992），及"Viral Vectors [病毒載體]"於 Current Communications in Biotechnology [生物技術之當前通訊], Gluzman and Hughes, eds.（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988）。

包括一或多種本發明分子之載體或病毒之毒性及治療功效係使用標準之醫藥流程而在細胞培養物或實驗動物中進行測定。咸可使用本文所提出之流程及該等其他在技藝中已知者，測定MLD_{50}（對於50%之種群具致命性之最小劑量）及/或ED_{50}（對於50%之種群具治療有效性之劑量）。關於已知病毒疫苗之建議劑量，亦參見S. Plotkin and W. Orenstein, Vaccines [疫苗]（W. B. Saunders Co. 1999 3d ed.）。本發明之核酸、多肽、蛋白、融合蛋白、經轉導細胞及其他調配物可以，如，由該調配物之MLD_{50}，以及其在應用於該病患之質量及整體健康情形下之各種濃度的副作用所判定之量而進行投藥。因此，舉例而言，本發明提供一種誘發免疫反應之方法，其係藉由投與等於或大於一醫藥可接受性組合物之ED_{50}的劑量而進行，該組合物包含一種群之似病毒顆粒或病毒（如，減毒或複製缺陷病毒），其包含本發明之多肽或核酸。投藥可經由單劑或分劑（其係藉由共投藥、系列投藥或其組合進行）而完成。投藥之技術及操作流程述於，如，Plotkin （Vaccines [疫苗]）上述文獻以及其他本文所引述之參考文獻。在相關之概念中，

用以評估可有效誘發免疫力之核酸、多肽、載體及細胞組合物劑量之技術述於，如，歐洲專利申請案第1 156 333號及其中所引述之參考文獻。

該病毒載體可靶向一對象（如，哺乳動物）之特定組織、細胞及/或器官。此等載體之實例述於上文。舉例而言，該病毒載體或核酸載體可用以將本發明之核酸序列選擇性地傳遞至單核細胞、樹狀細胞、與樹狀細胞相連之細胞（如，與郎格罕（Langerhans）細胞相連之角質細胞）、T細胞及/或B細胞。該病毒載體可為複製缺陷型病毒載體。該病毒載體顆粒亦可經修飾以減少對於該病毒載體之宿主免疫反應，因而達成持續之基因表現。此等「隱蔽（stealth）」載體述於Martin, Exp. Mol. Pathol. 66（1）:3-7 （1999），Croyle et al., J. Virol. 75（10）:4792-801 （2001），Rollins et al., Hum. Gene Ther. 7（5）:619-26 （1996），Ikeda et al., J. Virol. 74（10）:4765-75 （2000），Halbert et al., J. Virol. 74（3）:1524-32（2000），及國際專利申請公開案WO 98/40509。或者或是此外，該病毒載體顆粒可以經選擇之策略進行投與以減少對於該病毒載體之宿主免疫反應。用以在對宿主進行投與時減少對於該病毒載體之免疫反應的策略提供於，如，Maione et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98（11）:5986-91 （2001），Morral et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96（22）:2816-21 （1999），Pastore et al., Hum. Gene Ther. 10（11）:1773-81 （1999），Morsy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95（14）:7866-71 （1998），Joos et al., Hum. Gene Ther. 7（13）:1555-66 （1996），Kass-Eisler et al., Gene Ther. 3（2）:154-62（1996），美國專利第6,093,699、6,211,160、6,225,113號，美國專利申請公開案第2001-0066947A1號。

皮膚及肌肉一般而言係本發明多肽、複合物、核酸及載體之較佳投藥目標，以任何適當之技術進行。因此，本發明多肽、複合物、核酸及載體進入或通過對象（如，哺乳動物）皮膚之傳遞係本發明之特徵之一。此等本發明之分子可以醫藥可接受之可注射性溶液形式而進入或通過皮膚投與，如，經由肌內或是腹膜內。

投藥亦可以穿皮裝置完成，或者，更典型者，以生物彈道傳遞完成，將該多肽、複合物、核酸及/或載體送至、進入或通過該對象之皮膚，或是進入該對象之暴露肌肉中。舉例而言，可使本發明所提供之穿皮裝置（其述於本文他處）應用於宿主之皮膚一段適當期間，以產生聚核苷酸及/或載體至該對象之足夠傳遞，因而壓抑該對象體內之免疫反應，或是抑制移植物、細胞或組織移植排斥。肌肉之投藥更典型者係以包含本發明多肽、聚核苷酸或載體之液體溶液的注射而協助進行。可經靶向之特定細胞包括樹狀細胞、其他APCs、B細胞、單核細胞、T細胞（包括T輔助細胞）及與此等免疫系統細胞相連之細胞（如，與郎格罕細胞相連之角質細胞或其他皮膚細胞）。本發明載體及核酸之靶向述於本文他處。此等靶向投藥可以包含以可操作之方式連結細胞及/或組織專一性啟動子之核酸的核酸或載體而進行，該等啟動子之實例係為技藝中所已知。

本發明之聚核苷酸可以任何適當之傳遞系統投與，以使該宿主中產生重組多肽之表現，因而造成免疫反應之抑制、B7-陽性劑胞與CD28-陽性細胞間作用之抑制或是組織、細胞、器官或移植物移植排斥之抑制。舉例而言，可對一對象投與有效量之包含本發明核酸的細菌細胞種群，造成本發明重組突變CTLA-4多肽之表現，以及該對象體內免疫反應之抑制。經研發以進行哺乳動物基因傳遞之細菌細胞係為技藝中所已知。

本發明聚核苷酸或載體對於對象之投與可藉著對有效數目之細胞或有效之組織目標進行電穿孔而協助進行，以使該核酸及/或載體由該等細胞攝入，並在其中表現，因而造成本發明重組多肽在其中之製備，並後續在該對象體內抑制免疫反應。

製備及純化方法

本發明進一步提供製備及純化本發明多肽、核酸、載體及細胞之方法。在一態樣中，本發明提供一種製備本發明重組多肽之方法，其係藉著將本發明之核酸引入培養基中之一細胞種群，在

該培養基中培養該等細胞（其持續時間及所用條件適用於所欲之基因表現量）以產生該多肽，再自該等細胞、培養基或兩者中分離該多肽。該核酸一般而言係以可操作之方式連結可有效表現該核酸所編碼多肽之調控序列。

該多肽可自細胞裂解物、細胞上清液及/或細胞培養基中，以各種技藝中已知之適當方法進行分離，包括，如，細胞裂解物及/或細胞上清液之各種層析。舉例而言，該多肽可首先藉著使用離心濾器（Amicon）濃縮該培養基或是藉著以硫酸銨或聚乙二醇沈澱該等多肽，再接著使該等多肽重新懸浮於PBS或其他適當之緩衝液中，而自細胞裂解物及/或細胞培養基中分離。該多肽接著可在Sephacryl S-400管柱（Amersham Biosciences）上進行尺寸排除層析（如述於，如，Hjorth, R. and J. Moreno-Lopez, J. Virol. Methods 5:151-158 （1982））或是另一親和層析，或是通過20-60%之蔗糖梯度進行離心（如述於，如，Konish et al., Virology 188:714-720（1992））而進行純化。含有所欲多肽之級份可以ELISA或SDS-PAGE接續蛋白銀染或免疫印跡而辨識。收集該等所欲之級份並進一步進行濃縮。梯度離心級份中之蔗糖可使用PD-10管柱（Amersham Biosciences）凝膠過濾而除去。其他純化技術包括該等述於下文實例中者，以及疏水作用層析（Diogo, M. M, et al., J. Gene Med. 3:577-584 （2001）），以及任何其他技藝中已知之適當技術。

亦可使用技藝中已知之任何適當純化技術。技藝中已知之多肽純化方法包括該等述於，如，Sandana （1997） Bioseparation of Proteins [蛋白之生物分離], Academic Press, Inc.，Bollag et al.（1996） Protein Methods [蛋白方法], 2nd版 Wiley-Liss, NY，Walker （1996） The Protein Protocols Handbook [蛋白操作流程手冊] Humana Press, NJ，Harris and Angal（1990）Protein Purification Applications: A Practical Approach [蛋白純化應用：實用方法] IRL Press at Oxford, Oxford, England，Scopes （1993） Protein Purification: Principles and Practice [蛋白純化：原則及實施] 3rd版

Springer Verlag, NY，Janson and Ryden（1998）Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications [蛋白純化：原則、高解析度方法及應用], 第二版 Wiley-VCH, NY；及Walker（1998） Protein Protocols on CD-ROM [光碟版蛋白操作流程] Humana Press, NJ中者。適於進行蛋白製備之細胞係為技藝中所已知，且於本文他處討論（如，Vero細胞、293細胞、BHK、CHO（如，CHO-K1）及COS細胞可為適用）。細胞可以任何適當之技術進行裂解，包括，如，音波處理、微射流（microfluidization）、物理剪切、法式細胞壓碎（French press）裂解或清潔劑基礎性裂解。

在一態樣中，本發明提供一種純化本發明多肽之方法，其包含以本發明之核酸（如，重組核酸，其編碼包含SEQ ID NO:1多肽序列之重組多肽）轉形適當之宿主細胞，在該宿主細胞（如，CHO細胞或293細胞）中，以適當之裂解技術裂解該細胞（如，音波處理、清潔劑裂解或其他適當技術），再對該裂解物進行親和純化（使用包含樹脂之層析管柱，該樹脂包括至少一種本發明之新穎抗體（通常係本發明之單株抗體）或其抗原結合片段），以使該裂解物富含該所欲多肽（如，包含SEQ ID NO:1多肽序列之多肽）。

在另一態樣中，本發明提供一種純化此等目標多肽之方法，該方法與上述之方法不同在於其係使用一核酸，該核酸包含編碼包含本發明多肽（如，SEQ ID NO:1）之融合蛋白與適當標記（如，e-抗原表位/his標記）之核苷酸序列，且其係以免疫親和、扁豆凝集素親和管柱層析、固定化金屬離子親和層析（IMAC）或金屬螯合親和層析（MCAC）富集技術純化該多肽。其他純化方法揭示於本文他處。

在另一態樣中，本發明提供一種製備本發明多肽之方法，該方法包含將包含本發明核酸之重組表現載體引入一細胞種群中，在足以自該載體表現該核酸並製備由該核酸所編碼多肽之適當條件下於培養基中培養該等細胞，再自該等細胞、培養基或兩者中分離該多肽。該等所選細胞係根據該多肽之所欲加工，並根據該適當載體（如，大腸桿菌細胞係細菌質體之較佳者，而293細胞係

哺乳動物穿梭質體及/或腺病毒（特別係E1-缺失腺病毒）之較佳者）。

在又另一態樣中，本發明包括一種製備多肽之方法，該方法包含：(a) 將包含至少一種編碼本發明多肽之本發明核酸的重組表現載體引入一細胞種群中；(b) 將該表現載體投與至哺乳動物體內；及 (c) 自該哺乳動物或自該哺乳動物之副產品分離該多肽。

本發明之多肽亦可藉著在足以表現該多肽之條件下培養本發明之細胞或細胞種群（其，如，已經編碼此種多肽之本發明核酸轉形），再回收在該細胞中或是由該細胞表現之該多肽，使用技藝中已知之標準技術進行。

在另一態樣中，本發明提供一種製備本發明多肽之方法，其包含 (a) 將本發明之核酸引入一細胞種群中，其中該核酸係以可操作之方式連結可有效製備該核酸所編碼多肽之調控序列；(b) 在培養基中培養該等細胞以製備該多肽；及 (c) 自該等細胞或培養基中分離該多肽。亦包括一種經培養之細胞，該細胞中已引入本發明之載體（如，本發明之表現載體）。

亦包括一種製備本發明多肽之方法，其包含將編碼該多肽之核酸引入培養基中之一細胞種群中（該等細胞可容許表現該核酸），將該等細胞維持在其中可表現該核酸之條件下，再在之後自該培養基中分離該多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種製備融合蛋白之方法。該方法包含：(1) 在培養基中培養經核酸轉形之宿主細胞，其中該核酸包含：(i) 第一核苷酸序列，編碼多肽，其選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，其中該多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是CD86或CD80之胞外域；以及 (ii) 第二核苷酸序列，編碼Ig Fc多肽，其包含鉸鏈區、CH2域及CH3域，因而表現該核酸並製備融合蛋白；以及 (2) 回收該融合蛋白。可使用任何該Ig Fc多肽，包括，如，IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG4 Fc或是突變Ig Fc多肽。在部分此等方法中，該核酸尚包

含第三核苷酸序列，編碼一分泌或信號肽，以可操作之方式連結該融合蛋白，且該融合蛋白係以包含相同第一及第二融合蛋白之雙硫鍵結融合蛋白二聚體形式而自該宿主細胞分泌，且其自該培養基中回收該雙硫鍵結融合蛋白二聚體。在部分此等方法中，該雙硫鍵結融合蛋白二聚體係經由該第一融合蛋白之半胱胺酸殘基與該第二融合蛋白之半胱胺酸殘基間的共價雙硫鍵而形成。在部分此等方法中，其係自該培養基、宿主細胞或宿主細胞周質而回收該融合蛋白。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼（i） 第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該第多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及（ii） 第二多肽，其包含IgG多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。該第二多肽可包含本文他處所討論之任何適當Ig多肽，其包括，如，包含多肽序列SEQ ID NO:184或SEQ ID NO:218者。

在另一態樣中，本發明提供一種製備可溶性融合蛋白二聚體之方法。該方法包含培養經表現載體轉形之宿主細胞，該表現載體包含編碼本發明可溶性融合蛋白二聚體之核苷酸序列。例示性之融合蛋白包括該等包含SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任多肽序列者。該載體包括可協助該融合蛋白表現之核苷酸序列（如，編碼信號肽之核苷酸序列）。該融合蛋白係以包含兩相同融合蛋白之雙硫鍵結融合蛋白二聚體形式而自該宿主細胞分泌，且其自該培養基中回收該雙硫鍵結融合蛋白二聚體。在部分此等方法中，該雙硫鍵結融合蛋白二聚體係經由各個融合蛋白上之半胱胺酸殘基間的共價雙硫鍵而形成。該融合蛋白二聚體一般而言係自該培養基、宿主細胞或宿主細胞周質回收。實例12提供一種例示性之流程，創造表現本發明突變CTLA4-Ig融合蛋白之穩定轉染細胞，產生該突變CTLA4-Ig融合蛋白，並自培養物中純化該突變融合蛋白。

除重組製備之外，本發明之多肽尚可使用固相技術而以直接之肽合成製備（參見，如，Stewart et al.（1969）Solid-Phase Peptide Synthesis [固相肽合成], W.H. Freeman Co, San Francisco及Merrifield J.（1963）J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154）。肽合成可使用手動技術或自動進行。自動性之合成可，例如，使用Applied Biosystems 431A肽合成儀（Perkin Elmer, Foster City, Calif.），根據製造商所提供之指示而達成。舉例而言，可分別以化學合成亞序列，並使用化學方法結合，以產生本發明之多肽或其片段。或者，可自任何專門生產多肽之公司訂購合成多肽。最常見者，本發明之多肽係藉著表現編碼核酸並回收多肽而製備，如，如上所述。

本發明包括一種製備本發明多肽之方法，其包含將本發明之核酸、本發明之載體或其組合引入動物體內，諸如，哺乳動物（其包括，如，大鼠、非人類靈長類、蝙蝠、狨猿、豬或雞），以使本發明之多肽在該動物體內表現，再自該動物或自該動物之副產物分離該多肽。自該動物或動物副產物之多肽分離可以任何適當技術進行，根據該動物及所欲之回收策略而定。舉例而言，該多肽可自表現本發明動物之小鼠、猴或豬之血清而回收。本發明提供包含至少一種本發明核酸之轉基因動物（包括前述之哺乳動物）。該轉基因動物可具有整合進入其宿主基因組中之該核酸（如，藉由AAV載體、慢病毒載體、以整合促進序列所進行之生物彈道技術等），或是可具有維持在染色體外之該核酸（如，在一非整合性質體載體中，或是藉著插入非整合性病毒載體中）。可對染色體外之載體進行工程處理，以進行較整合性載體更為瞬時之基因表現。RNA基礎性載體可在此態樣中提供特別之優勢。

組合物

本發明進一步提供新穎及有用之組合物，其包含至少一種本發明之組成份，諸如，如，至少一種本發明之多肽（其包括，如，融合蛋白及多聚體多肽）、複合物、核酸、載體、病毒、似病毒顆粒（VLP）及/或細胞，或是其任何組合，以及載體、賦形劑或稀

釋劑。該載體、賦形劑或稀釋劑可為醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑。此種組合物可包含任何適當量之任何適當數目之本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLPs及/或細胞。其亦提供醫藥組合物，其包含至少一種該多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞，或是其任何組合，以及醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑。此等組合物可用於本文所述之本發明方法中，其包括，如，抑制免疫反應之方法。

舉例而言，在一非限制性之具體實例中，本發明提供一種組合物，其包含賦形劑、稀釋及及載體，以及至少一種此等本發明之多肽（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種或以上之多肽），諸如，突變CTLA-4 ECD多肽（如，SEQ ID NOS:1-73中之任一者）或突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中之任一者），其中至少一種多肽係以足以在投與該組合物之對象體內抑制免疫反應（包括，如，涉及移植排斥及/或自體免疫之免疫反應）、抑制對於經捐贈之組織、細胞或器官移植之排斥或是抑制內源性B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞間作用之量而存在於該組合物中。

其亦包括一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體，以及有效量之一或多種此等本發明之組成份。該有效量可為用於本文他處所述之治療或預防方法中之治療或預防有效量或劑量，諸如，治療自體免疫疾病之方法，或是抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或器官移植排斥之方法。

該組合物（或醫藥組合物）可為任何無毒性之組合物，其不會干擾其中所包括之本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞之免疫抑制特性。該組合物可包含一或多種賦形劑、稀釋劑或載體，且該醫藥組合物可包含一或多種醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。技藝中已知廣泛多種之可接受性載體、稀釋劑及賦形劑，且其可被包括在本發明之組合物及醫藥組合物中。舉例而言，可使用各種水性載體，如，蒸餾或純化水，無菌鹽水、緩衝鹽水（諸如，磷酸緩衝鹽水（PBS））及其類似者，其

可在本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞之可注射性調配物中為有利者。技藝中已知諸多可用以投與治療性蛋白之適當賦形劑、載體及稀釋劑。此等溶液較佳係無菌者，且一般而言不含非所欲之物質。組合物可以習知、既為熟知之滅菌技術而經滅菌。 本發明之組合物可如所需而包含醫藥可接受之輔助物質以接近生理條件。此等物質包括，如，pH調節劑、緩衝劑及滲透壓調節劑，其包括，如，醋酸鈉、抗壞血酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及其類似者。本發明之組合物，包括醫藥組合物，亦可包括一或多種適用於包括在醫藥組合物中之組成份，諸如，稀釋劑、充填劑、鹽、緩衝劑、界面活性劑、乳化劑、清潔劑（如，非離子性清潔劑或乳化劑，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80、pluronic F-68及其類似者）、防腐劑、組織固定劑、增溶劑及/或其他物質。

可用於醫藥組合物中之適當組成份實例述於，如，Berge et al., J. Pharm. Sci. 66(1):1-19 (1977)，Wang and Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech. 42:S4-S6 (1988)，美國專利第6,165,779及6,225,289號，以及本文他處。醫藥組合物亦可包括防腐劑（諸如，苯甲醇、疊氮化鈉、間-甲酚等）、抗氧化劑、金屬螯合劑（諸如，甲硫胺酸、ECTA等）及/或其他熟習技藝者所知之添加物。用於醫藥組合物之適當醫藥可接受性載體實例述於，如，Urquhart et al., Lancet 16:367 (1980)，Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms - Disperse Systems [醫藥劑形- 分散系統] (2nd ed., Vol. 3, 1998)，Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms & Drug Delivery Systems [醫藥劑形及藥物傳遞系統] (7th ed. 2000)，Martindale, The Extra Pharmacopeia [馬丁代爾大藥典] (31st版)，Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓醫藥科學] (16th-20th版)，The Pharmacological Basis of Therapeutics [療劑之藥學基礎], Goodman and Gilman, Eds. (9th ed. - 1996)，Wilson and Gisvolds Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry [威爾森及吉佛得有機醫學及醫藥化學教科書], Delgado and Remers, Eds. (10th ed. -

1998），及美國專利第5,708,025及5,994,106號。調配醫藥可接受性組合物之原則述於，如，Platt, Clin. Lab Med. 7:289-99 （1987），Aulton, Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design [藥物：劑形設計科學], Churchill Livingstone （New York） （1988），Extemporaneous Oral Liquid Dosage Preparations [即興口服液劑製備], CSHP （1998），以及"Drug Dosage [藥物劑量]," J. Kans. Med. Soc. 70（1）:30-32 （1969）。其他特別適用於投與載體之醫藥可接受性載體述於，如，國際專利申請公開案WO 98/32859。

本發明之組合物，包括醫藥組合物，可包括一或多種水性載體或賦形劑（包括，如，醫藥可接受之載體或賦形劑），以及一或多種組成份，諸如，一或多種緩衝劑、一或多種鹽類、一或多種清潔劑或乳化劑及/或一或多種糖類。緩衝系統一般而言係適用於使該組合物之pH維持在一範圍中，該範圍係有助於該組合物中所存在本發明分子（如，突變CTLA-4-Ig）之安定性。可用於該組合物中之例示性緩衝劑包括，但不限於，如，N-2-羥乙基哌嗪-N'-2-胺基乙烷磺酸（HEPES）緩衝劑、檸檬酸緩衝劑（如，檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉混合物）、磷酸鈉緩衝劑（如，磷酸二鈉-磷酸三鈉混合物（Na_2HPO_4/Na_3PO_4）、磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉混合物）、醋酸緩衝劑（如，醋酸-醋酸鈉混合物、醋酸-氫氧化鈉混合物）、組胺酸緩衝劑、Tris緩衝劑、Tris-順丁烯二酸緩衝劑、琥珀酸緩衝劑（如，琥珀酸-氫氧化鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸一鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸二鈉混合物、琥珀酸一鈉混合物-琥珀酸二鈉混合物）、順丁烯二酸緩衝劑、咪唑緩衝劑、酒石酸緩衝劑、反丁烯二酸緩衝劑、葡糖酸緩衝劑、草酸緩衝劑、乳酸緩衝劑、醋酸緩衝劑及其類似者，或是其任何之組合（如，檸檬酸及醋酸緩衝劑之混合物等）。緩衝劑在組合物中之濃度可為任何適用於包括於該組合物溶液中之該（等）本發明分子者（如，突變CTLA-4-Ig），諸如，但不限於，在約1 mM至約100 mM、約1 mM至約50 mM、約5 mM至約50 mM或約5 mM至約25 mM之範圍內，其包括，如，1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、40 mM、50 mM

（諸如，如，20 mM HEPES緩衝劑、20 mM檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉緩衝劑、20 mM琥珀酸緩衝劑等）。

可用於該組合物之例示性鹽類包括，但不限於，如，水溶性鹽類，包括有機鹽或無機鹽（如，水溶性無機鹽），諸如，氯化鈉、氯化鎂、碳酸氫鈉、氯化鉀、氯化鈣及氯化銨及其類似者，或是任何醫藥可接受性或生理相容性之鹽。鹽在該組合物溶液中之例示性濃度包括，但不限於，如，在約1 mM至約150 mM、約10 mM至約125 mM、or 約75 mM至約125 mM之範圍內，包括，如，10 mM、50 mM、75mM、100 mM、125 mM、150 mM （諸如，如，100 mM NaCl）。

可用於該組合物之例示性糖類或碳水化合物包括，但不限於，如，蔗糖、麥芽糖、海藻糖、葡萄糖、甘露糖、棉子糖、乳糖、麥芽糊精、葡聚糖、蔗糖等，其濃度範圍包括，但不限於，如，根據該組合物之以重量計自約0.1%至約10%之糖、以重量計約1%至約5%之糖或以重量計約1%至約3%之糖，包括，如，以重量計0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%之糖（如，以重量計2%之蔗糖、以重量計2%之海藻糖或以重量計2%之甘露糖）。可用於該組合物之例示性糖醇包括，但不限於，如，甘露糖醇、山梨糖醇、乙二醇、甘油、阿拉伯糖醇、赤藻糖醇、木糖醇、核糖醇、乳糖醇及其類似者，其濃度範圍包括，但不限於，如，根據該組合物之以重量計自約0.1%至約10%之糖醇、約1-5%、約1-3%，包括，如，以重量計0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%之糖醇。

本發明組合物（包括醫藥組合物）之滲透壓一般而言係類似血液之血清滲透壓，其範圍係自約250至約350滲透壓毫克分子每公斤（mOSm/kg）水。鹽在該組合物中之濃度一般而言係小於125 mM。該鹽及糖之濃度可經調整或變化，以使該組合物之滲透壓為自約250-350 mOSm/kg水。

可用於該組合物之例示性清潔劑包括，但不限於，如，聚山

梨醇酯，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68，其範圍包括，但不限於，如，根據該組合物之以重量計自約0.001%至約0.2%之清潔劑或乳化劑，包括，如，根據該組合物之以重量計0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.075%及0.1%之清潔劑或乳化劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68）

本發明之組合物，包括醫藥組合物，可包含一聚合物，諸如，PEG分子，其濃度足以降低或抑制二或多個本發明分子間（諸如，如，二或多個本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體）之非所欲性連結。該組合物可包含二或多種不同之聚合物（如，PEGs）。該聚合物（如，PEG分子）一般而言具有自約200 Da至約8000 Da之分子量（如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da，可自Dow Chemical取得）。在該組合物中添加聚合物（如，PEG分子）咸信可降低非所欲性凝聚物之形成，特別是二或多個本發明融合蛋白二聚體之非所欲性凝聚物。

本發明之組合物，包括醫藥組合物，可包括一環狀寡糖，諸如，環糊精（如，Captisol® （Cydex））。在一態樣中，該組合物包含二或多種不同之環狀寡糖。在該組合物中添加環狀寡糖可改良活性醫藥成分（如，突變CTLA-4分子）之溶解度、安定性、生物可利用性及/或投劑。

本發明組合物（包括醫藥組合物）之pH可介於自約pH 3至約pH 10、自約pH 4至約pH 10、自約pH 5至約pH 9、自約pH 6至約pH 9、自約pH 5.5至約pH 8.5、自約pH 6.0至約pH 6.7、自約pH 6.0至約pH 6.5、自約pH 6.2至約pH 8.7、自約pH 6.5至約pH 8.5、自約pH 6.5至約pH 7.5、自約pH 6.2至約pH 7.0、自約pH 6.3至約pH 6.8、自約pH 6.4至約pH 6.8、自約pH 7.0至約pH 8.0及約pH 7.0至約pH 7.4。在一態樣中，包含本發明分子（諸如，如，突變CTLA-4-IgG2）之組合物具有pH 5.0、pH 5.1、pH 5.2、pH 5.3、pH 5.4、5.5、pH 5.6、pH 5.7、pH 5.8、pH 5.9、pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4、

pH 6.5、pH 6.6、pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9、pH 8.0、pH 8.1、pH 8.2、pH 8.3、pH 8.4、pH 8.5、pH 8.6、pH 8.7、pH 8.8、pH 8.9、pH 9.0、pH 9.1、pH 9.2、pH 9.3、pH 9.4、pH 9.5、pH 9.6、pH 9.7、pH 9.8、pH、9.9或pH 10.0之pH值。

在一態樣中，本發明提供一種本發明之組合物，其包含賦形劑或載體（包括，如，醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑或載體），以及有效量之任何述於全文及本文中之本發明CTLA-4多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，並尚包含可使該組合物之pH維持在介於約pH 3至約pH 10之緩衝劑、水、視情況之非離子性清潔劑、視情況之鹽及視情況之糖醇、單醣、雙醣或多醣。部分此等組合物係在生理pH下。部分此等組合物具有自約4至約7.5、約5.0至約7.5或自約6.4至約6.6，包括，如，約pH 6.5、約pH 7.4或pH 7.5之pH值。部分此等組合物包含濃度自約1 mM至約100 mM、約1 mM至約50 mM、約5 mM至約35 mM、約10 mM至約25 mM，包括，如，約20 mM、25mM或30 mM之緩衝劑。部分此等組合物包含選自由HEPES緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、琥珀酸緩衝劑、乙酸緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、順丁烯二酸緩衝劑、磷酸緩衝劑及Tris緩衝劑所組成之群的緩衝劑。部分此等組合物包含選自由HEPES緩衝劑、檸檬酸鈉緩衝劑及琥珀酸鈉緩衝劑所組成之群的緩衝劑。就部分此等組合物而言，其pH係自約6.0至約6.7，且該緩衝劑係琥珀酸鈉或檸檬酸鈉。就部分此等組合物而言，其pH係自約7.0至約7.7，且該緩衝劑係HEPES。部分此等組合物尚包含糖醇或醣類，其中該醣類係單醣、雙醣（如，蔗糖或海藻糖）或多醣。部分此等組合物包含以約1 mM至約50 mM，包括，如，約20 mM、25 mM或30 mM之濃度存在之鹽。部分此等組合物包含非離子性清潔劑，諸如，如，選自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-40、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群的非離子性清潔劑。

在部分此等上段所述之組合物（包括醫藥組合物），該多肽、

多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約1 mg/ml（重量/體積或w/v）至約200 mg/ml（w/v）、約25 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）、約50 mg/ml至約300 mg/ml之濃度存在，視情形約在介於約50 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）之範圍。部分此等組合物包含自約0.1 mg/kg至約15 mg/kg之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係對哺乳動物（如，人類）進行投與。部分此等組合物包含自約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係經由腸外進行投與。部分此等組合物包含自約0.5 mg/kg至約5 mg/kg（且視情形為約0.5 mg/kg）之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係經由皮下進行投與。部分此等組合物包含自約5 mg/kg至約15 mg/kg（視情形為約10 mg/kg）之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係經由靜脈內進行投與。就部分此等組合物而言，該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。就部分此等組合物而言，該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。部分此等組合物係無菌及/或與血液等滲透壓者。部分此等組合物係液體組合物。部分此等組合物係為液體或乾燥形式，其中該乾燥形式係選自由凍乾形式、風乾形式及噴霧乾燥形式所組成之群。

在一例示性態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：(i)本發明之CTLA-4-Ig融合蛋白，其具有自約1 mg/ml至約300 mg/ml（如，約1 mg/ml至約100 mg/ml、約50 mg/ml 或約100 mg/ml等）之濃度（視情形為二聚體融合蛋白）；(ii) 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 9.0間之緩衝能力，濃度為約5 mM至約50 mM；

（iii） 醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；（iv）糖，其濃度係根據該組合物以重量計約0.5%至約10%之糖；（v）鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；（vi） 視情形之非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml；以及（vii） 視情形之環狀寡糖（如，環糊精（Captisol®）），其中該組合物之pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍。例示性之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白包括該等包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群（視情形為，如，選自由SEQ ID NOS:197、199、211及213所組成之群）的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列者，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此等融合蛋白可為單體或二聚體形式。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：（i） 包含本發明之CTLA-4-Ig融合蛋白（視情形為二聚體融合蛋白）與共價連附該融合蛋白之非多肽分子部分之複合物，該複合物具有自約1 mg/ml至約300 mg/ml （如，約1 mg/ml至約100 mg/ml、約50 mg/ml 或約100 mg/ml等）之濃度；（ii） 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 8.0間之緩衝能力，濃度為約5 mM至約50 mM；（iii）醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；（iv） 糖，其濃度係根據該組合物以重量計約0.5%至約10%之糖；（v） 鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；及（vi） 視情形之非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml；其中該組合物之pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍。該複合物可包含一、二、三、四個或以上之非多肽分子部分。各個非多肽分子部分可包含聚合物（如，PEG或PAO）或糖類分子部分。在部分情形下，該非多肽分子部分係聚合物分子，諸如，PEG分子。該聚合物分子可具有任何所欲之分子量，取決

於該所欲之功能效應（如，增加之半生期、融合蛋白分子間之較低連結）。在部分情形下，如，該聚合物係具有約1 kDa至約100 kDa Da （如，1、2、2.5、3、5、8、10、12、20、25、30、40、60 kDa, 等）之分子量的PEG。該非多肽分子部分（如，糖類分子部分或聚合物分子部分）係使用如上所述之標準流程而共價連附於該融合蛋白胺基酸殘基之連附基團。例示性之CTLA-4-Ig融合蛋白包括該等包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群（視情形為，如，選自由SEQ ID NOS:197、199、211及213所組成之群）的多肽序列具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列相同性之多肽序列者，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此等融合蛋白可為單體或二聚體形式。

在另一態樣，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含多肽序列，與選自SEQ ID NOS:1-73之群的多肽序列（諸如，如，SEQ ID NOS:36及50）具有至少約94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該多肽係以介於約1至約200 mg/ml （w/v）範圍之濃度存在；(b) 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 8.0間之緩衝能力，濃度為介於約5 mM至約50 mM之範圍；(c) 醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；(d) 糖，其濃度係以重量計約0.5%至約10%；(e) 鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；及 (f) 視情形之清潔劑；其中該pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍。在部分此等醫藥組合物中，(a) 該多肽包含SEQ ID NO:36之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；(b) 該緩衝劑係HEPES緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；(c) 該醫藥可接受之稀釋劑係水；(d) 該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；(e) 該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM；及 (f) 其視情況自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-40、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群選擇清潔劑，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml，其中該組合物之pH係約7.4。在

另一此等醫藥組合物中，(a) 該多肽包含SEQ ID NO:50之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；(b) 該緩衝劑係檸檬酸鈉緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；(c) 該醫藥可接受之稀釋劑係水；(d) 該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；(e) 該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM；及 (f) 其視情況自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-40、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群選擇清潔劑，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml，其中該組合物之pH係約6.5。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及(b) HEPES或檸檬酸鈉緩衝劑（如，檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸鈉-檸檬酸混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸一鈉-檸檬酸二鈉混合物或檸檬酸-檸檬酸一鈉混合物）。

其亦提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) 醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約7至約8之pH值。部分此等醫藥組合物具有約7.4或7.5之pH值。部分此等醫藥組合物包含HEPES或檸檬酸鈉緩衝劑。

其亦提供一種醫藥組合物，其包含 (a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) 檸檬酸鈉緩衝劑（如，檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸鈉-檸檬酸混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸一鈉-檸檬酸二鈉混合物或檸檬酸-檸檬酸一鈉混合物）。

其亦提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) 醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約6至約7之pH值。部分

此等醫藥組合物具有約6.5之pH值。部分此等醫藥組合物包含檸檬酸鈉緩衝劑。

在一例示性之範疇中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含自約1 mg/ml至約300 mg/ml之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-54-IgG2）（如，約1 mg/ml至約100 mg/ml，如，約50 mg/ml或約100 mg/ml），其一般而言係以二聚體融合蛋白之形式表現，包含在下列之中：20 mM HEPES緩衝劑於水中，100 mM NaCl，根據該組合物以重量計2%之蔗糖，pH 7.4，視情況包括非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml ，並視情況包括聚乙二醇（PEG），諸如，具有自約200道耳吞（Da）至約8000 Da （如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da，可自Dow Chemical取得）分子量之PEG分子。在另一例示性之範疇中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含自約1 mg/ml至約300 mg/ml之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-69-IgG2），其一般而言係以二聚體融合蛋白之形式表現，包含在下列之中：20 mM檸檬酸鈉緩衝劑於水中，100 mM NaCl，根據該組合物以重量計2%之蔗糖，pH 6.5，視情況包括非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml ，並視情況包括PEG分子，諸如，具有自約200 Da至約8000 Da （如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da，可自Dow Chemical取得）分子量之PEG分子。

本發明包括用以包含本發明組合物之容器，該組合物包含本發明之分子（如，突變CTLA-4分子，諸如，突變CTLA-4-Ig），以及賦形劑、稀釋劑或載體。該組合物可為醫藥組合物，其包含本發明之分子，以及醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。容器包括，但不限於，如，小瓶（如，玻璃小瓶，諸如，第I型玻璃小瓶）、自動注射器、筆形注射器（固定劑量或可變劑量）或預裝填針筒，

或是其他適當之容器。如需要，容器可含有一或多份可如本文他處所述而有效抑制免疫反應或是治療免疫系統疾病或病症之預定劑量之本發明分子。部分此等容器可用於對罹患免疫疾病或病症之對象投與其中所含之組合物（如，自動注射器、筆形注射器、預裝填針筒等）。部分此等容器可容許該對象自行投與該組合物（如，筆形注射器、自動注射器、預裝填針筒等）。

其亦提供本發明分子（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）之安定組合物或調配物，其包括本發明分子之醫藥可接受性組合物，以及醫藥可接受之載體。在另一態樣中，本發明包括冷凍乾燥或凍乾之組合物或調配物。名辭「冷凍乾燥」或「凍乾」一般而言係指一物質之狀態，該物質已經諸如冷凍乾燥或凍乾之乾燥流程處理，其中已除去至少50%之水分。預凍乾及凍乾流程係為技藝中所熟知（參見，如，Lyophilization of Biopharmaceuticals [生物醫藥之凍乾], Vol. 2 of Biotechnology: Pharmaceutical Aspects [生物技術：醫藥範疇 第2冊]（Henry R. Costantino et al. eds., 2004），U.S. 6,436,897，WO 06/104852），且可為熟習技藝者輕易明瞭。熟習技藝者可使用或隨需要修飾任何適當之凍乾流程，以製備本發明之凍乾組合物。冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾之組合物通常係自液體製備，諸如，溶液、懸浮液、乳液等。該待進行冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾之液體一般而言包括欲存在於該終重構液體組合物中之所有組成份（除外該液體，如，水）。以此方式，該經冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾之組合物再重構時將會具有所欲之液體組合物（如，醫藥組合物）。包含本發明分子（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，諸如，如，SEQ ID NO:197、199、211或213）之例示性組合物（包括醫藥組合物），其述於本申請案之全文，可藉著使用技藝中已知之標準流程而冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾，以分別產生安定之冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾組合物。參見，如，述於Lyophilization of Biopharmaceuticals [生物醫藥之凍乾], 上述文獻之例示性流程。

舉例而言，含有本發明分子（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，諸如，如，SEQ ID NO:197、199、211或213）之液體組合物的容器（如，小瓶，諸如，玻璃小瓶）可使用一般熟習技藝者所知之標準流程而進行凍乾。參見，如，述於Lyophilization of Biopharmaceuticals [生物醫藥之凍乾], 上述文獻。該經凍乾之本發明分子（如，本發明之突變CTLA-4-Ig）接著可以液體重構，以產生重構之液體組合物。凍乾調配物一般而言係藉由加入水溶液溶解該凍乾調配物而進行重構。可使用任何適當之水性液體或溶液而重構凍乾調配物。凍乾調配物通常係使用無菌或蒸餾水而重構，但包含載體、賦形劑、稀釋劑、緩衝劑及/或其他組成份（包括全文所述者）之溶液亦可用於進行重構。

在一態樣中，本發明提供一種凍乾形式之醫藥組合物，其中該組合物包含自約1 mg/ml至約300 mg/ml之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白，其通常係以二聚體融合蛋白形式表現，包含在下列之中：水中之適當緩衝劑（如，HEPES、檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉等），其濃度可維持所欲之pH值（如，pH 6.0至約pH 7.5），鹽（如，50 mM NaCl），糖（如，根據該組合物以重量計4-6%之蔗糖），並視情況包括非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml （如，Tween®-20、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68）。相較於未凍乾之液體組合物，凍乾形式之醫藥一般而言包括較低之鹽濃度及較高之糖濃度。

在一特定態樣中，本發明提供一種用於在以無菌水重構時進行治療性投藥之安定凍乾組合物，其包含治療有效量之本發明分子以及視情況之一或多種下列醫藥可接受之組成份：（a） 糖或醣，諸如，蔗糖、甘露糖、葡萄糖或海藻糖，其量係自以重量計約1%至以重量計約10%；（b） 清潔劑或乳化劑，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68；（c） 等滲劑或鹽，諸如，無機鹽（如，氯化鈉），其濃度為自0 mM

至約50 mM（包括，如，述於上文之濃度）；(d) 適當之緩衝劑，以使該組合物之pH維持在有助於該分子之安定性的範圍中；(e) 分散劑（如，其量足以進行本發明分子之長期分散，諸如，如，自0.001 w/v%至約1.0 w/v%）（如，聚山梨醇酯，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68。）；及(f) 安定劑，如，醣類、葡聚糖、低分子量（MW）PEG基團（諸如，具有自約200 Da至約8000 Da（如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da）MW之PEG）或防腐劑。在部分此等安定凍乾組合物中，本發明之分子係重組或分離之本發明融合蛋白，諸如包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群（視情形為，如，選自由SEQ ID NOS:197、199、211及213所組成之群）的多肽序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列相同性之多肽序列的融合蛋白，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此等融合蛋白可為單體或二聚體形式。

各個此等組成份在該凍乾組合物中之例示性含量包括該等述於上文及本文者。在一態樣中，該緩衝劑係經選擇，以使該組合物之pH維持在介於自約pH 3至約pH 8、自約pH 至約pH 7.5之範圍中。包含本發明重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白之凍乾組合物一般而言係在-80°至+40°C為安定，以及/或是在貯存於室溫下（如，約22°C至約30°C）時可實質上維持其生物活性至少一週、一或多個月（如，六個月）、一年、兩年、三年、四年或以上。在以液體（如，注射用無菌水（WFI））重構時，該凍乾組合物即適於對一對象（如，人類）進行投藥（如，i.v.、s.c.、腸外、i.m.、i.d.、i.p.等）。

本發明亦提供套組，其在第一容器（如，小瓶，諸如，玻璃小瓶）中包含一凍乾或冷凍乾燥之組合物，該組合物包含凍乾或冷凍乾燥之本發明分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白，諸如，如，SEQ ID NO:197、199、211或213），以及關於使用液體（如，無菌水、WFI或緩衝液）重構該冷凍乾燥或凍乾組合物之指示。視情況

者，該套組包含第二容器（如，小瓶，諸如，玻璃小瓶），其含有用以使該凍乾或冷凍乾燥組合物重構成為液體組合物之足量液體（如，無菌水、WFI或緩衝液）。在此情形下，重構係藉著使用針筒自該第二容器取出所欲體積之水，並將該水引入該第一容器中。接著溫和震盪該第一容器，以使該本發明之分子（如，融合蛋白）成為溶液。該套組可包括用以重構該凍乾或冷凍乾燥組合物及/或投藥該重構液體組合物之裝置。例示性之裝置包括，但不限於，如，雙組份混合針筒、雙腔針筒及雙腔自動注射器。其中一個組份或腔含有該凍乾組合物，且該第二組份或腔含有該用以進行重構之液體。使用此等裝置，重構一般而言係在投藥之前即時進行，且該重構組合物通常係經常外投與（如，s.c.、i.v.、i.m.、i.d.注射）。

本發明之組合物或醫藥組合物可包含脂質體或可為脂質體之形式。脂質體調配物用之適當脂質包括，但不限於，單酸甘油脂、雙酸甘油脂、硫脂、溶血卵磷脂、磷脂、皂苷、膽酸及其類似者。此等脂質體調配物之製備述於，如，美國專利第4,837,028及4,737,323號。

該等組合物或醫藥組合物之形式可（至少部分）由該目標多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP或細胞之投與途徑指定。由於諸多投與途徑皆係可能，該醫藥組合物之形式及其組成份可各有不同。舉例而言，在穿黏膜或穿皮投與中，可將適於該待滲透屏障之滲透劑包括在該組合物中。此等滲透劑係技藝中廣泛已知者，且其包括，例如，就穿黏膜之投與而言，清潔劑、膽酸及梭鏈孢酸衍生物。相對的，穿黏膜之投與可經由使用鼻噴劑或栓劑而協助進行。

本發明組合物（包括醫藥組合物）之常用投與形式係藉由注射進行。可注射之醫藥可接受性組合物一般而言包含一或多種適當之液體載體，諸如，水、石油、生理鹽水、制菌水、Cremophor ELTM （BASF, Parsippany, NJ）、PBS或油。液體醫藥組合物可進一步包括生理鹽水溶液、葡萄糖（或其他醣溶液）、醇（如，乙醇）、

多元醇（多元醇，諸如，甘露糖醇、山梨糖醇等）或二醇（諸如，乙二醇、丙二醇、PEG分子）、可促進適當流動性之塗覆劑（諸如，卵磷脂）、等滲劑（諸如，甘露糖醇或山梨糖醇）、有機酯（諸如，油酸乙酯）、以及吸收延遲劑（諸如，單硬脂酸鋁及明膠）。該可注射組合物可為無致熱原安定水溶液之形式。可注射之水溶液可包含等滲載劑，諸如，氯化鈉、林格氏（Ringer's）注射溶液、葡萄糖、乳酸化林格氏注射溶液或是相當之遞載劑（如，氯化鈉/葡萄糖注射溶液）。適於以動脈內、靜脈內、肌內、皮內、真皮下、腹膜內及皮下途徑進行注射之調配物包括水性及非水性之等滲無菌注射溶液，其可包括溶劑、共溶劑、抗氧化劑、還原劑、螯合劑、緩衝劑、制菌劑、抗微生物防腐劑及可使該調配物與該目標接受者之血液等滲之溶質（如，PBS及/或鹽水溶液，諸如，0.1 M NaCl），以及水性及非水性之無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、乳化劑、安定劑及防腐劑。

本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、假病毒、VLP或細胞（或是包含任何此等組成份之組合物）之投與可以由任何適當材料所形成之傳遞裝置進行。用以製備非生物可降解性投與裝置之適當基質材料包括羥基磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽或其他陶瓷。在部分應用中，可使用鉗合劑（諸如，羧甲基纖維素（CMC）、甲基纖維素或羥丙基甲基纖維素（HPMC））以使該特定組成份結合該裝置而進行定位傳遞。

本發明之核酸或載體可與一或多種泊洛沙姆（poloxamer）、聚氧乙烯/聚氧丙烯嵌段共聚物或是其他界面活性劑或似皂親脂性物質共同調配，以用於將該核酸或載體傳遞至對象之細胞種群或組織或皮膚。參見，如，美國專利第6,149,922、6,086,899及5,990,241號。

本發明之核酸或載體可連結一或多種轉染增進劑。在部分具體實例中，本發明之核酸及/或核酸載體一般而言係連結一或多種可協助轉染之安定促進性鹽類、載體（如，PEG）及/或調配物（如，磷酸鈉鹽、葡聚糖載體、氧化鐵載體或生物彈道傳遞（「基因槍」）

載體，諸如，金珠或粉末載體）。參見，如，美國專利第4,945,050號。其他轉染增進劑包括可複合該核酸或核酸載體之病毒顆粒、磷酸鈣沈澱劑、蛋白酶、脂酶、bipuvicaine溶液、皂苷、脂質（如，帶電荷脂質）、脂質體（如，陽離子脂質體）、轉染協助肽或蛋白複合物（如，聚（乙烯亞胺）、聚離胺酸或病毒蛋白-核酸複合物）、病毒脂質體（virosome）或經修飾之細胞或似細胞結構（如，融合細胞）。

本發明之核酸或載體亦可以活體內或活體外之電穿孔法傳遞，包括，如，該等述於美國專利第6,110,161及6,261,281號以及Widera et al., J. of Immunol. 164:4635-4640 （2000）者。

本發明組成份（如，本發明之多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞）之穿皮投與可以穿皮貼布協助進行，該貼布包含任何適當形式之任何適當組合之此等組成份。本發明提供此等穿皮貼布裝置。舉例而言，此種組成份可包含在藥物貯存貼布裝置中之液態貯物中，或是，替代言之，該組成份可分散在適於納入簡單單片穿皮貼布裝置中之材料中。一般而言，該貼布包含免疫抑制量之至少一種此等組成份—諸如可有效在接觸該貼布之對象體內抑制免疫反應之量。此等貼布裝置之實例係為技藝中所已知。該貼布裝置可為被動裝置或是可使至少一種此等組成份以離子導入傳遞至該對象之皮膚或組織之裝置。

組合物（特別係醫藥組合物）可包含任何足以在投藥之後在該對象體內達成所欲免疫抑制反應之適當劑量的至少一種本發明之此等組成份（如，多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞）。適當之劑量可以任何適當技術判定，且用以判定適當者之考量係為技藝中所已知。在一簡單之劑量試驗療程中，其係將低劑量之該組合物投與至試驗對象或系統中（如，動物模式、無細胞系統或全細胞分析系統）。劑量常以該待投與特定組成份之功效、該對象之病況、該對象之體重及/或該待治療對象之目標區域而判定。該投劑之大小亦可以特定對象體內伴隨任何此等特定組成份投與之任何負面副作用之存在、性質及程度而判定。有關治

療及預防劑之劑量的原則提供於，如，Platt, Clin. Lab Med. 7:289-99（1987），“Drug Dosage [藥物劑量],” J. Kans. Med. Soc. 70（1）:30-32 （1969），以及其他本文所述之參考文獻（如，Remington's, 上述文獻）。

舉例而言，用於作為治療自體免疫疾病起始投劑之本發明多肽之治療有效量可包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約100 mg/kg body該對象體重，諸如，如，自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至約100 毫克每公斤（mg/kg）該對象體重，或是，如，自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90或100 mg/kg該對象體重。此等投劑可以任何適當操作流程進行，如，諸如，每日、每週或每雙週投與，或其任何組合（如，間隔約0、1、2、4、5、6及7天，在其後每週，或是間隔約0、1、2、4及6週），接續1-、2-、3-個月之間期，且可以任何適當之傳遞方法進行，諸如，如，以電穿孔或是皮下（s.c.）、肌內（i.m.）、靜脈內（i.v.）或腹膜內（i.p.）、真皮下、穿皮、腸外或皮內（i.d.）注射進行。在部分情形下，本發明之多肽一般而言係以可溶性多肽之形式投與，諸如，如，包含共價連結Ig Fc多肽之本發明突變CTLA-4 ECD多肽的融合蛋白。舉例而言，包含醫藥可接受之載體、稀釋劑或賦形劑中之本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白的醫藥組合物可以任何適當之途徑（如，經由皮內、靜脈內或皮下），以根據該待治療自體免疫疾病（如，類風濕性關節炎）或病況（如，為抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或實體器官移植之排斥）而決定之有效量進行投與。

在一例示性之態樣中，本發明提供一種在需要該方法之對象體內抑制免疫反應之方法，其包含對該對象投與一醫藥組合物，該醫藥組合物包含，如，自約1 mg/ml至約300 mg/ml ，包括自約25 mg/ml至約150 mg/ml （如，50或100 mg/ml）之D3-54-IgG2融合蛋白，包含在下列之中：20 mM HEPES緩衝劑於水中，100 mM

NaCl，以重量計2%之蔗糖，pH 7.4，其中該對象罹患自體免疫疾病（如，類風濕性關節炎）。在另一例示性之態樣中，本發明提供一種在接受者對象體內抑制對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或實體器官移植之排斥的方法，其包含對該接受者對象投與一醫藥組合物，該醫藥組合物包含，如，自約25 mg/ml至約100 mg/ml（如，50或100 mg/ml）之D3-69-IgG2融合蛋白，包含在下列之中：20 mM檸檬酸鈉緩衝劑於水中，100 mM NaCl，以重量計2%之蔗糖，pH 6.5。

其亦提供一種病毒載體組合物，其包含載體或賦形劑，以及本發明之病毒載體。其亦提供包含醫藥可接受之載體或賦形劑以及病毒載體之醫藥組合物。病毒載體顆粒或病毒載體顆粒編碼性核酸之量或劑量取決於：(1) 就載體來源而言之病毒載體顆粒類型，其包括，但不限於，如，該載體係α病毒載體、Semliki-Forest病毒載體、腺病毒載體、腺相關（AAV）病毒載體、黃病毒載體、乳頭狀瘤病毒載體及/或單純皰疹病毒（HSV）載體，(2) 該載體係轉基因表現性載體或重組肽展示性載體，(3) 該宿主，及 (4) 其他如上所論之考量。一般而言，就基因轉移載體而言，該醫藥可接受之組合物在約1 ml之體積內包含至少約1 x 10^2個病毒載體顆粒（如，在約1 ml之內至少約1 x 10^2至1 x 10^8個顆粒）。較高之劑量亦可為適用（如，至少約1 x 10^6、約1 x 10^8、約1 x 10^9、約1 x 10^{10}個顆粒/ml）。

本發明亦提供一種組合物（包括醫藥組合物），其包含二或多個本發明之多肽或複合物之凝聚物。同時，本發明提供一種組合物（包括醫藥組合物），其包含一群之一或多個本發明之多聚體多肽或多聚體複合物。如上所註記，醫藥組合物包括醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。

套組

本發明亦提供套組，其包括一、二、三種或以上之本發明多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽、突變CTLA-4-Ig融合蛋白，包括

二聚體融合蛋白）、複合物、核酸、載體、細胞及/或組合物。本發明之套組視情況包含：（1） 至少一種本發明之多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體、VLP、細胞及/或組合物；（2） 視情況之至少一種第二免疫抑制劑（如，非類固醇抗炎劑、胺甲蝶呤、類固醇、TNFα拮抗劑等）；（3） 用以實施任何本文所述方法之指示，包括治療或預防方法，以及用以使用任何在（1）或（2）中所辨識組成份之指示；（4） 用以容納至少一種該等在（1）或（2）中所辨識組成份之容器；及/或（5） 包裝材料。可將一或多種本發明之多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體、VLPs、細胞及/或組合物，視情況結合一或多種第二免疫抑制劑，包裝在包裝組、分配裝置及套組中，以對一對象進行投與，諸如，哺乳動物，包括人類。其指定用於該所指定治療或預防方法之各個此等本發明之多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體、VLP、細胞及/或組合物或是該視情況之第二免疫抑制劑的有效量（如，劑量），並提供一或多份此等劑量。該一或多種多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體及/或細胞組合物以及（如需要）該視情況之第二免疫抑制劑可以粉末（如，凍乾）或液體形式提供，且其可結合賦形劑或載體而調配（包括，如，醫藥可接受之賦形劑或載體），因而形成組合物（包括，如，醫藥組合物）。其提供包含一或多份單元劑形之包裝組或分配裝置。一般而言，用以投與此等組成份之指示係與該包裝一同提供，同時在標籤上提供適當之標示，說明該化合物適於治療該所指定之病況。

實例

下述之實例進一步說明本發明，但不應以任何方式視為限制其範圍。

實例1

此實例提供用以創造LEA29Y-Ig融合蛋白之方法的敘述，該多肽係在Biacore™結合分析及細胞基礎性活性分析中作為控制組及

用於比較目的。

創造編碼LEA29Y-Ig融合蛋白之DNA質體載體

此實例敘述編碼LEA29Y-Ig融合蛋白之DNA質體載體的製備。LEA29Y-Ig包含一種特定之已知突變CTLA-4 ECD多肽，稱為"LEA29Y"（或"LEA"或"L104EA29Y"或"A29YL104E"），其在其C-端共價連結一種特定突變人類IgG1 Fc多肽之N-端。該LEA29Y多肽係一種突變CTLA-4 ECD多肽，其包含與人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有兩個突變之差異的多肽序列—A29Y取代及L104E取代—其中位置29及104係參照該人類CTLA-4 ECD多肽之多肽序列而編號，以人類CTLA-4之第一胺基酸殘基指定為胺基酸殘基位置1。參見U.S. 7,094,874。創造質體載體pCDNA3.1-LEA（其包括編碼LEA29Y-Ig之核苷酸序列）以製備此融合蛋白。

使用根據其與示於SEQ ID NO:167之編碼LEA29Y-Ig之核苷酸序列間的同源性而設計之重疊寡核苷酸，以PCR組合創造編碼LEA29Y-Ig之DNA。該等寡核苷酸係以一般熟習技藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。參見，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。

該等寡核苷酸係在100 μl之PCR反應中，以1 μM寡核苷酸、1x Taq 緩衝液（Qiagen; #201225）及200 μM dNTPs，進行30個擴增循環（94°C，30 s；60°C，30 s；72°C，60 s）而組合。將經擴增之DNA以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen, Cat. #28104）純化，並以限制酶*NheI*及*SacII*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議進行純化，並將其接合進入經類似酶切消化之質體pCDNA 3.1（+）（Invitrogen, Cat. #V790-20）中。根據製造商之建議，使接合物轉形進入TOP10大腸桿菌細胞（Qiagen, Cat. #C4040-10）中。使該等所得之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB培養基中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接

著以其製備質體DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液（其在後文中稱為質體載體pCDNA3.1-LEA）。

該質體載體pCDNA3.1-LEA係與示於圖1之質體載體pCDNA突變CTLA-4-IgG2載體相同，除外該編碼突變CTLA-4-IgG2多肽之核酸序列已經編碼LEA29Y-Ig融合蛋白之核酸序列置換。其包括編碼人類CTLA-4信號肽之核酸作為信號肽編碼性核苷酸序列。

編碼該預測LEA29Y-Ig融合蛋白之核酸序列示於SEQ ID NO:167。SEQ ID NO:167包括編碼信號肽之核苷酸序列（如，SEQ ID NO:165之胺基酸殘基1-37）。該預測LEA29Y-Ig及成熟LEA29Y-Ig融合蛋白（無該信號肽）之多肽序列分別示於SEQ ID NOS:165及166。如圖2C所指出，LEA29Y-Ig之預測胺基酸序列包括下列節段：預測之信號肽（胺基酸殘基1-37）、LEA29Y ECD多肽（胺基酸殘基38-161）、連接子（胺基酸殘基162）及人類IgG1多肽之突變（經修飾） Fc域（胺基酸殘基163-394）。位在此等不同節段間接合處之胺基酸殘基亦示於圖2C。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該LEA29Y ECD之首五個及末五個胺基酸殘基、該單一連接子胺基酸殘基（Q）及該突變IgG1 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。

該信號肽一般而言會在加工過程中受到切除，並因此該LEA29Y-Ig之分泌融合蛋白（亦即，成熟融合蛋白）通常並不含有該信號肽序列。該LEA29Y-Ig之成熟/分泌形式（其具有總共357個胺基酸）包含示於SEQ ID NO:165之預測序列之胺基酸殘基38-394（無該信號肽之全長序列），並係以胺基酸序列：甲硫胺酸-組胺酸-纈胺酸-丙胺酸起始。SEQ ID NO:165在其N-端包括該信號肽（如，殘基1-37）；該一般而言會受到切除以形成示於SEQ ID NO:166之成熟蛋白。如需要，該成熟形式之胺基酸可以該Met-His-Val-Ala序列之Met起始編號，將Met指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-124之胺基酸殘基），如在該具有示於SEQ ID NO:166之序列的成熟LEA29Y-Ig融合蛋白中者。在一態樣中，SEQ ID NO:165或166之序列並不包括該C-端離胺酸殘基；此殘基

可在加工過程或在分泌之前受到切除。

LEA29Y-Ig融合蛋白之蛋白序列述於U.S. 7,094,874。具體言之，U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:4顯示編碼非成熟形式單體LEA29Y-Ig之蛋白序列。在U.S. 7,094,874中，該LEA29Y-Ig融合蛋白係稱為"L104EA29YIg"。該包含示於本文所述SEQ ID NO:166之序列的成熟LEA29Y-Ig融合蛋白與示於U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:4的融合蛋白序列不同，因U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:4包括信號肽（亦即，SEQ ID NO:4之殘基1-26）。此一信號肽一般而言會在加工過程中受到切除，並因此該成熟(分泌)形式之LEA29Y-Ig融合蛋白通常並不包括該信號肽序列。U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:3提出編碼該L104EA29YIg融合蛋白（亦即，LEA29Y-Ig）之核酸序列。

LEA29Y-Ig一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟LEA29Y-Ig融合蛋白包含一LEA29Y ECD （SEQ ID NO:168）多肽，其以其C-端融合突變IgG1 Fc （SEQ ID NO:186）之N-端。該兩個LEA29Y-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該LEA29Y-Ig二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白形式。

<u>創造表現LEA29Y-Ig融合蛋白之穩定CHO-K1細胞系</u>

其創造一穩定之細胞系，以產生多毫克量之上述LEA29Y-Ig融合蛋白。

CHO-K1細胞之轉染

將CHO-K1細胞以1 x 10^6細胞/ml之密度，播種於含有40 ml生長培養基（添加10%胎牛血清（FBS）（Hyclone, #SV30014.03）及1x PS（青黴素+鏈黴素）(Invitrogen, #15140-122)之DMEM/F12培養基（Invitrogen, #10565-018））之T-175燒瓶（BD Falcon,

#353112）中。在37°C下培育細胞24小時（hrs），再接著以混合60 µl Fugene 6（Roche, #11814443001）之10 µg Maxiprep質體DNA（如，如上所述編碼LEA29Y-Ig之質體載體），根據製造商之建議條件而進行轉染。在37°C下於生長培養基中培育細胞2天（d），再接著於選擇培養基（含有300 µg/ml遺傳黴素（Geneticin）（Invitrogen, #10131-027）之生長培養基）中培育10 d，每2 d更換培養基。除去培養基，並藉著加入3 ml之0.05%胰蛋白酶（Invitrogen, Cat. #25300-054）而分散細胞，再在37°C下共置3 min。將經分散之細胞稀釋進入10 ml之生長培養基中，並在室溫（RT）下，於GH-3.8轉子（Beckman Coulter, #360581）中，以1000 rpm離心5 min而進行收集。在除去上清液後，使細胞懸浮於1 ml之生長培養基中，通過40 µm濾膜（BD Falcon, #352340）進行過濾，並調整至1 x 10^6 細胞/ml之密度。

獨特純系之分離

使用細胞分選器（Dako, MoFlo），將活細胞個別分散進入96孔培養盤（Sigma-Aldrich, #CLS-3596）中，該盤含有200 µl/孔之含有25%條件培養基（先前自未經轉染（或天然）細胞培養物所收集之生長培養基）之生長培養基。在37°C下培育10-14 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有200 µl/孔之生長培養基的新培養盤中。在37°C下於生長培養基中培育細胞，直到細胞密度達到70%鋪滿為止（約14 d，每7 d更換培養基）。

所欲純系之辨識

以點漬及西方分析辨識表現高含量重組LEA29Y-Ig融合蛋白之純系。就點漬分析而言，自該96孔培養盤之各孔收集100 µl之培養基，並根據製造商之建議而使其轉移至硝基纖維素膜（Whatman, #10439388）。在室溫（RT）下以200 ml之PBST（PBST係磷酸緩衝鹽水（PBS）+0.05% Tween®-20）清洗膜10分鐘共兩次，接著在RT下與含有5% 脫脂奶粉（EMD, #1.15363.0500）之PBST共置1

小時（hr）。如上所述清洗膜，再在RT下於含有稀釋至1:4000之辣根過氧化酶（HRP）-複合性山羊抗人類Ig抗體（Vector Labs, #BA-3000）之20 ml PBST中共置1 hr。如上所述清洗膜，再在RT下與含有稀釋至1:2000之鏈黴親和素-HRP試劑（BD Biosciences, #554066）之PBST共置1 hr。如上所述清洗膜，再使用ECL西方點漬偵測試劑（Amersham, Cat. #RPN2132），根據製造商之建議條件而偵測信號。將由高信號強度（亦即，表現高含量之融合蛋白）所辨識之陽性純系以胰蛋白酶水解而進行分散，再將其移至含有2 ml/孔之生長培養基的6孔培養盤（BD Falcon, Cat. #353046）中。在37°C下培育3-4 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有20 ml生長培養基之T-75燒瓶（BD Falcon, Cat. #353136）中。在37°C下培育2 d後，收集100 μl之培養基，並以西方分析進行蛋白表現量之分析。就西方分析而言，根據製造商之建議條件，使取自各個細胞培養物之等量（15 μl）培養基，通過MES （MES係2-（N-嗎啉基）乙烷磺酸，pH 7.3）移動緩衝液（Invitrogen, #NP0002）中之4-12% Bis-Tris NuPAGE凝膠（Invitrogen, #NP0322BOX）進行移動。根據製造商之建議條件，以電轉移使蛋白自凝膠轉移至硝基纖維素膜（Invitrogen, Cat. #LC2001）。如上點漬分析所述處理膜，並以信號強度及表觀分子量辨識陽性純系（表現目標融合蛋白）。如上所述以胰蛋白酶水解而分散陽性純系，並在含有40 ml生長培養基之T-175燒瓶中進行繁殖。

<u>製備及純化LEA29Y-Ig融合蛋白</u>

滾瓶培養物之繁殖

使已如上所述經由編碼目標融合蛋白之核酸轉染的穩定CHO-K1細胞系在含有40 ml生長培養基（添加10%胎牛血清（FBS）（Hyclone, #SV30014.03）及1x PS （Invitrogen, #15140-122）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, #10565-018））之T-175燒瓶中生長至鋪滿。藉著在37°C下於3 ml之0.05%胰蛋白酶（Invitrogen, Cat. #25300-054）中共置3 min而收集細胞，將其稀釋至12 ml之生長培

養基中，再接著將其移至含有250 ml生長培養基之滾瓶（Corning, Cat. #431191）中。在37°C下於溼潤之滾動式恆溫培育箱中培育該等滾瓶培養物2 d後，除去培養基，並以250 ml之新鮮生長培養基置換。在37°C下培育該等培養物2 d後，以250 ml之UltraCHO培養基（添加1/1000 EX-CYTE （Serologicals Proteins, Cat. #81129N）及1x PS之UltraCHO培養基（BioWhittaker, Cat. #12-724））置換培養基。在37°C下培育2 d後，以250 ml之新鮮UltraCHO培養基置換培養基。在37°C下培育2 d，接著以250 ml之製備培養基（添加1/100x ITSA （Life Technologies #51300-044）, 1/1000x EX-CYTE及1x PS之DMEM/F-12培養基）置換培養基。在製備過程中，收集培養基，並每隔一天以新鮮之製備培養基置換。

蛋白純化

在RT下以2500 x g離心30 min，接著通過0.2 μM濾膜（VWR, Cat. #73520-986）進行過濾，使取自滾瓶培養物之製備培養基變為澄清。使用10 kDa MWCO濾膜（Millipore, Cat. #P3C010C00），以切向流過濾將培養基濃縮10倍，接著以其使用BioCad vision HPLC系統進行蛋白-A親和層析。使Ig-融合蛋白連結PBS緩衝液中之Poros 20 蛋白-A樹脂 （Applied Biosystems, Cat. #1-5029-01），以相同緩衝液清洗，以含有160 mM氯化鈉之80 mM檸檬酸緩衝液（pH 4.0)溶析，再接著加入2M Tris鹼而進行中和。最後使用10 kDa MWCO濾膜（Pierce, Cat. #PI66810），使該蛋白溶液對抗6升（l）之PBS進行透析。

實例2

此實例敘述用以噬菌體展示法創造並篩選CTLA-4突變分子庫之變更人類CD80及/或人類CD86結合活性之例示性方法。

<u>人類CD80-Ig融合蛋白</u>

在噬菌體淘選及噬菌體ELISA實驗中，使用人類CD80-Ig（"hCD80-Ig"）及人類CD86-Ig （"hCD86-Ig"）融合蛋白作為配

位體，以辨識可結合人類CD80 （“hCD80”）及/或人類CD86（“hCD86”）以及/或是其任一或兩者之胞外域的突變CTLA-4分子。人類CD80-Ig（亦稱為“hB7.1-Ig”或“hB7-1-Ig”）及人類CD86-Ig（亦稱為“hB2.1-Ig” or “hB2-1-Ig”）融合蛋白可自R&D Systems（Minneapolis, MN）取得。

編碼預測WT人類CD80-IgG1融合蛋白（其包含人類CD80信號肽、人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc）之代表性核酸序列示於SEQ ID NO:172。hCD80-IgG1融合蛋白之預測及成熟多肽序列分別示於SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171。示於SEQ ID NO:170之預測融合蛋白包含以其C-端共價融合人類IgG1 Fc多肽之N-端的WT人類CD80 ECD，並在其N-端包括信號肽。該信號肽一般而言會自示於SEQ ID NO:171之成熟CD80-Ig融合蛋白切除。

人類CD80-IgG1一般而言在本文中縮寫為hCD80-Ig。如圖2A所示，hCD80-Ig融合蛋白（亦指名為“CD80-IgG1”）之預測胺基酸序列包括下列節段：預測之信號肽（胺基酸殘基1-34）、人類CD80 ECD （胺基酸殘基35-242）、連接子（胺基酸殘基243-245）及人類IgG1 Fc多肽（胺基酸殘基246-476）。位在此等不同節段間接合處之胺基酸殘基亦示於圖2A。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該人類CD80 ECD之首五個及末五個胺基酸殘基、該連接子之胺基酸殘基（GVT）及該人類IgG1 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。在該CD80-Ig融合蛋白中，三個殘基GVT存在於該CD80 ECD之C-端（其以胺基酸殘基FPDN結束）與該IgG1 Fc多肽之N-端（其以胺基酸殘基PKSC起始）間作為選殖人造序列（或連接子）。此一GVT選殖人造序列或連接子在分別示於SEQ ID NO:170及171之預測及成熟CD80-Ig多肽序列中顯示。

該信號肽一般而言會在加工過程中受到切除，並因此該hCD80-Ig之分泌融合蛋白（亦即，成熟融合蛋白）通常並不含有該信號肽。該hCD80-Ig之成熟/分泌形式（其具有總共442個胺基酸）包含SEQ ID NO:170之胺基酸殘基35-476 （無該信號肽之全長序列），並係以胺基酸殘基序列：纈胺酸-異白胺酸-組胺酸-纈胺酸起

始。如需要，該成熟形式之胺基酸可以該Val-Ile-His-Val序列之纈胺酸（Val）起始編號，將Val指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-208之胺基酸殘基），如在該包含示於SEQ ID NO:171之多肽序列的成熟形式hCD80-Ig中者。

該hCD80-Ig融合蛋白一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體成熟hCD80-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟hCD80-Ig融合蛋白（SEQ ID NO:171）包含一人類CD80 ECD （SEQ ID NO:174），其以其C-端融合人類IgG1 Fc（SEQ ID NO:185）之N-端。該兩個hCD80-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該hCD80-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該hCD80-Ig融合蛋白二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白分子形式。

編碼該預測全長人類CD80多肽之代表性核酸示於SEQ ID NO:196。示於SEQ ID NO:196之核酸序列編碼人類CD80之信號肽、ECD、穿膜域及胞質域，並在其C-端包括TAA中止密碼子。

人類CD86-Ig融合蛋白

編碼預測人類CD86-人類IgG1 （其一般而言在本文中縮寫為"hCD86-Ig"）融合蛋白之代表性核酸序列示於SEQ ID NO:179。此核酸序列包括一編碼成熟人類CD86-人類IgG1融合蛋白信號肽之核苷酸序列。該hCD86-Ig融合蛋白之預測胺基酸序列示於SEQ ID NO:177，且編碼該預測hCD86-Ig融合蛋白之例示性核酸示於SEQ ID NO:179。

如圖2B所示，hCD86-Ig融合蛋白之預測胺基酸序列包括下列節段：預測之信號肽（胺基酸殘基1-23）、人類CD86胞外域（胺基酸殘基24-243）、連接子序列（胺基酸殘基244-246）及人類IgG1 Fc多肽（胺基酸殘基247-477）。位在此等不同節段間接合處之胺基酸殘基亦示於圖2B。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該人類CD86 ECD之首五個及末七個胺基酸殘基、該連接子之

胺基酸殘基（GVT）及該人類IgG1 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。

該CD86信號肽一般而言會在加工過程中自該預測hCD86-Ig多肽切除，並因此該分泌之人類CD86-Ig融合蛋白（亦即，成熟融合蛋白）通常並不包括該信號肽。該hCD86-Ig之成熟/分泌形式（其具有總共454個胺基酸）包含SEQ ID NO:177之胺基酸殘基24-477（無該信號肽之全長序列），並係以胺基酸殘基序列：丙胺酸-脯胺酸-白胺酸起始。如需要，該成熟融合蛋白之胺基酸可以該Ala-Pro-Leu序列之丙胺酸（Ala）起始編號，將Ala指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-218之胺基酸殘基），如在該包含示於SEQ ID NO:178之多肽序列的成熟形式hCD86-Ig中者。該成熟蛋白（SEQ ID NO:178）包含以其C-端共價融合hIgG1 Fc多肽之N-端的WT hCD86 ECD蛋白。

該hCD86-Ig融合蛋白一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體成熟hCD86-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟hCD86-Ig融合蛋白（SEQ ID NO:178）包含一人類CD86 ECD （SEQ ID NO:180），其以其C-端融合人類IgG1 Fc（SEQ ID NO:185）之N-端。該兩個hCD86-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該hCD86-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該hCD86-Ig融合蛋白二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白分子形式。

在該CD86-Ig融合蛋白中（如，預測及成熟形式），三個殘基GVT存在於該CD86 ECD之C-端與該IgG1 Fc多肽之N-端間作為選殖人造序列（或連接子）。在另一態樣爭，該WT人類CD86 ECD蛋白包含多肽序列，其包含SEQ ID NO:180之胺基酸殘基1-218 （亦即，排除最末兩個C-端胺基酸殘基（PP））。

Orencia®融合蛋白

作為額外之控制組及用於比較目的，購買稱為Orencia®融合

蛋白（Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ）之市售可得融合蛋白。Orencia®融合蛋白係由以其C-端融合特定突變IgG1 Fc多肽之N-端的WT人類CTLA-4胞外域構成。Orencia®蛋白係包含兩個相同單體融合蛋白之二聚體融合蛋白，該等單體融合蛋白係由雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體融合蛋白中所存在之半胱胺酸殘基間形成。各個成熟Orencia®融合蛋白單體之多肽序列示於SEQ ID NO:164，且其係由下列節段構成：WT人類CTLA-4胞外域（胺基酸殘基1-124）、連接子序列（胺基酸殘基125）及突變IgG1 Fc多肽（胺基酸殘基126-357）。各個Orencia®融合蛋白單體具有類似示於圖2C之LEA29Y-Ig融合蛋白單體的結構，除外該LEA29Y ECD經WT人類CTLA-4 ECD置換，且在任一Orencia®融合蛋白單體中皆不存在信號肽，因各個單體皆係分泌或成熟之融合蛋白。非成熟形式Orencia®單體（其包括信號肽）之多肽序列以及編碼該非成熟形式Orencia®融合蛋白單體之核酸序列分別示於U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:8及SEQ ID NO:7。用以製備及使用Orencia®融合蛋白之方法亦揭示於U.S. 7,094,874。

<u>創造編碼突變CTLA-4多肽之DNA序列</u>

使用直接發展法而產生編碼重組突變CTLA-4胞外域多肽之重組非天然聚核苷酸庫。諸多天然哺乳動物CTLA-4同源物之蛋白及核苷酸序列係為已知。參見，如，國家生技資訊中心（NCBI）。將在各種天然存在哺乳動物CTLA-4胞外域同源物間所辨識之序列變異性用於直接發展法而產生編碼突變CTLA-4 ECD域多肽之重組聚核苷酸庫。直接發展流程包括，如，活體外之重組及誘變流程，如實質上述於；Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 （1994）；Chang et al., Nature Biotech 17:793-797（1999）；國際專利申請公開案WO 98/27230；以及美國專利第6,117,679及6,537,776號者。

<u>創造編碼突變CTLA-4多肽之DNA序列庫</u>

使用根據序列同源性所設計之正向及反向引子，以PCR，自組合反應物中擴增編碼重組突變CTLA-4 ECD多肽之突變DNA序列。該等引子係以一般熟習技藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。參見，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。例示性之正向及反向引子包括，但不限於，下列之正向引子（5'-ctattgctacggccgctatggccmtkcacgtcgctcaaccagccgtcgtactcgcgtcc-3' ）（SEQ ID NO:191）及反向引子（5'-gtgatggtgatggtgtgcggccgcatcaga-3'）（SEQ ID NO:192）。使用5 μl之組合反應物作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Taq 緩衝液（Qiagen; #201225）及200 μM dNTPs，進行15個擴增循環（94°C 30 s；50°C 30 s；72°C 40 s）。將編碼突變CTLA-4 ECD多肽之經擴增DNA以限制酶（*SfiI*及*NotI*）進行酶切消化，並以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議進行純化，並將其接合進入經類似酶切消化之噬菌體展示載體pSB0124中（其流程類似述於Chang et al., Nature Biotech 17:793-797 （1999）中者）。根據製造商之建議條件，以電穿孔而使該所得之庫轉形進入TOP10大腸桿菌細胞（Invitrogen, Inc; #C4040-50）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB （Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件以其製備庫DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液。

<u>篩選具有改良人類CD80及/或人類CD86結合活性之展示突變CTLA-4多肽之噬菌體庫</u>

產生突變CTLA-4多肽之噬菌體展示庫

根據製造商之建議條件，以電穿孔而使該所得之庫DNA（如，編碼CTLA-4 ECD突變體之DNA序列庫）轉形進入TG-1大腸桿菌細胞（Stratagene; #200123）中。在噬菌質體選擇條件下（含

有50 μg/ml羧苄青黴素之LB培養基），使該培養物生長1-2代，以M13KO7輔助噬菌體（以5-10之感染複數量）進行感染，在噬菌質體（50 μg/ml羧苄青黴素）及輔助噬菌體（70 μg/ml卡那黴素）之雙重選擇下，於37°C下並以250 rpm震盪進行隔夜培育。以離心澄清該等培養物（6000 rpm，15 min，4°C，於Sorvall 600TC轉子中），並使32 ml之培養物上清液與8 ml之PEG/NaCl溶液（20% PEG-8000; 2.5 M NaCl）在冰上共置30 min再進行離心（9500 rpm，40 min，4°C，於Sorvall 600TC轉子中），以沈澱噬菌體顆粒。使該噬菌體沈澱物懸浮於含有1% BSA（牛血清白蛋白，Sigma; #A7906）之1 ml PBS中，移至微離心管中，再以離心澄清（最大轉速，5 min，RT，於Eppendorf桌上型離心器中）。

淘選CTLA-4突變體噬菌體庫

使用標準條件，對噬菌體庫進行對抗hCD80-Ig或hCD86-Ig融合蛋白之共五輪之淘選。參見，如，Lowman, et al., Biochemistry 12;30（45）:10832-10838（1991）; Smith, G.P. et al., Chem. Rev. 97:391-410（1997）。各輪之淘選包括：（a）使該噬菌體展示性突變CTLA-4 ECD多肽與hCD80-Ig或hCD86-Ig配位體結合;（b）除去未連結之噬菌體;（c）溶析連結之噬菌體；及（d）擴增該經溶析之噬菌體以進行下一輪之淘選。使取自各輪之一小份噬菌體轉導進入大腸桿菌細胞中，以取得個別轉導株之純系。

以噬菌體ELISA辨識具有改良人類CD80及/或人類CD86結合性之CTLA-4突變體

將取自各輪淘選之個別純系接種進入含有150 μl/孔之含有50 μg/ml羧苄青黴素之2 x YT（酵母菌-胰蛋白腺）培養基的96孔培養盤（NUNC; #243656）中，再於37°C下並以250 rpm震盪進行隔夜培育。使用該等隔夜培養物以接種含有600 μl/孔之該相同培養基之深孔塊（Scienceware; #378600001）。在37°C下並以250 rpm震盪培育該培養物2 hrs，以M13K07輔助噬菌體（感染複數量（moi）

5-10）進行感染，接著在噬菌質體及輔助噬菌體標記之雙重選擇下（50 μg/ml羧苄青黴素及70 μg/ml卡那黴素），於37°C下並以250 rpm震盪進行隔夜培育。在Beckman GH 3.8轉子中，於4°C下，以4000 rpm離心20 min而澄清該等培養物。藉著添加50 μl/孔之含有10 μg/ml hCD80-Ig或hCD86-Ig之PBS，並在4°C下隔夜共置，以塗覆ELISA盤（NUNC; #449824）。以200 μl/孔之PBST清洗該等試驗盤三次，再藉著添加200 μl/孔之含有3%脫脂奶粉之PBS，並在RT下共置1小時（hr）而進行阻斷。將25 μl/孔之取自該深孔塊之噬菌體上清液移至含有25 μl/孔之6%脫脂奶粉之ELISA盤中，並在室溫（RT）下共置該等試驗盤1 hr。以200 μl/孔之PBST清洗該等試驗盤三次，再與50 μl/孔之以含有3%脫脂奶粉之PBST稀釋1:5000之HRP-複合性抗-M13單株抗體（GE Healthcare, #27-9421-01）在RT下共置1 hr。以200 μl/孔之PBST清洗該等試驗盤三次，再使用TMB受質套組（Pierce; #34021），根據製造商之建議條件而偵測信號。將相較於人類CTLA-4對於人類CD80及/或人類CD86之結合性（如以人類CTLA-4 ECD對於hCD80-Ig及/或hCD86-Ig之結合性而測量）而言之對於人類CD80及/或人類CD86具有增加結合性（如以對於hCD80-Ig及/或hCD86-Ig之增加結合性而測量)的突變CTLA-4 ECD多肽選擇進行進一步之分析。

實例3

<u>創造IgG2 Fc融合蛋白載體</u>

創造一質體IgG2-Fc融合蛋白表現載體以製備包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽及人類IgG2 Fc多肽之融合蛋白。以人類白細胞cDNA （BD Biosciences, Cat. #HL4050AH）之PCR擴增而產生編碼人類IgG2 Fc多肽之DNA，使用正向引子（5'-aagctgtcaccggtggatcgatcccgaaccctgccctgat tctgatgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcccaccgt-3'） （SEQ ID NO:189）及反向引子（5'- cagaattcattatttacccggagacagggagaggct cttctg-3'） （SEQ ID NO:190）而進行。該等引子係以一般熟習技

藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。參見，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。使用50-100ng之cDNA作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Taq緩衝液（Stratagene; #200435）及200 μM dNTPs，進行25個擴增循環（94°C，30 s；55°C，30 s；72°C，60 s）。根據製造商之建議條件，將該PCR產物以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen #28106）純化，並以限制酶*AgeI*及*EcoRI*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等PCR酶切消化片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議條件進行純化。可以*AgeI*及*EcoRI*對經修飾版本之pCDNA3.1-LEA載體（上述）（其在該CTLA-4信號序列中含有一AgeI限制位點（以沈默突變形式引入））進行酶切消化，並與上述之片段進行接合。根據製造商之建議條件，使接合物轉形進入One-shot TOP10大腸桿菌細胞（Invitrogen Cat. #C4040-03）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB （Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件，以其製備質體DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液。

該所得之質體表現載體稱為pCDNA IgG2 Fc融合蛋白表現載體。此一載體與示於圖1之pCDNA突變CTLA-4-IgG2質體載體相同，除外其移除該編碼突變CTLA-4 ECD多肽之核酸序列。在pCDNA IgG2 Fc融合載體中編碼信號肽之核酸序列（其在圖1中可為任何適當之信號肽編碼性核苷酸序列）係編碼人類CTLA-4信號肽之核酸（SEQ ID NO:181或SEQ ID NO:215）。此IgG2 Fc融合載體並不包括任何編碼本發明突變CTLA-4 ECD多肽或任何其他CTLA-4 ECD多肽之核酸序列。

<u>將編碼突變CTLA-4多肽之核酸序列選殖進入該IgG2 Fc融合載體</u>

為製備呈可溶性Fc融合蛋白形式之突變CTLA-4多肽，將編碼

該等由該噬菌體庫篩選辨識為具有改良人類CD80及/或人類CD86結合性（相較於人類CTLA-4 ECD對於人類CD80及/或人類CD86之結合性）之突變CTLA-4 ECD多肽的DNA序列各選殖進入該上述之IgG2 Fc融合蛋白載體中，使用，如，下列之流程進行。

首先，自該噬菌體展示載體中，以PCR擴增，使用根據其與該突變CTLA-4 ECD多肽N-及C-端處數個核苷酸殘基（如，30-60個核苷酸）之序列同源性而設計之正向及反向引子以及技藝中已知之標準流程，回收編碼具有較高hCD80及/或hCD86結合性之突變CTLA-4 ECD多肽的DNA序列。參見，如，述於，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻之流程。舉例而言，在一態樣中，編碼突變CTLA-4 ECD多肽的DNA序列係以PCR擴增而自該噬菌體展示載體回收，使用正向引子（5'-ggaataccggtttttgtaaagccatgcacgtcgctcaaccagccgtcgtactc-3'）（SEQ ID NO:191）及反向引子（5'-ggcactcagatctacgtcatcgatcccgaa-3'）（SEQ ID NO:192）進行。使用10納克（ng）之質體DNA（含有突變CTLA-4 ECD編碼核苷酸序列之噬菌體展示載體）作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Taq緩衝液（Stratagene; #200435）及200 μM dNTPs，進行25個擴增循環（94°C，30 s；55°C，30 s；72°C，60 s）。根據製造商之建議條件，將該PCR產物以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen #28106）純化，並以限制酶*AgeI*及*ClaI*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議條件進行純化，再使其接合進入經類似酶切消化之質體IgG2 Fc融合載體中。根據製造商之建議條件，使接合物轉形進入One-shot TOP10大腸桿菌細胞（Invitrogen Cat. #C4040-03）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB（Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件，以其製備質體DNA之maxiprep（Qiagen; #12362）貯液。

該所得之質體表現載體，其包含編碼本發明突變CTLA-4-IgG2

融合蛋白之核酸，稱為pCDNA突變CTLA-4 ECD IgG2 Fc質體表現載體。此載體之圖式示於圖1。此載體包括Bla啟動子；氨苄青黴素抗性基因；pUC起點；SV40聚腺苷酸（poly A）信號序列；f1起點；SV40啟動子；新黴素抗性基因；CMV啟動子，以協助表現本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（其包含，如，人類CTLA-4信號肽、突變CTLA-4 ECD多肽及人類IgG2 Fc多肽）；編碼人類CTLA-4信號肽之核酸序列（SEQ ID NO:181或SEQ ID NO:215）；編碼本發明突變CTLA-4 ECD多肽之核酸序列（其包括，但不限於，編碼SEQ ID NOS:80-152中任一者之核苷酸序列）及示於SEQ ID NO:183或SEQ ID NO:217之編碼人類IgG2 Fc多肽之例示性核酸序列；以及牛生長激素（bGH） poly A終止信號序列。SEQ ID NO:183之核酸序列編碼具有C-端離胺酸（K）殘基之hIgG2 Fc多肽（SEQ ID NO:184）；而SEQ ID NO:217之核酸序列編碼不具有C-端離胺酸殘基之hIgG2 Fc多肽（SEQ ID NO:218）。

該質體IgG2 Fc融合蛋白載體亦可用於製備人類CTLA-4-IgG2（"hCTLA-4-Ig"）融合蛋白。在此情形下，其使用類似該等上述者之標準選殖流程，將編碼人類CTLA-4 ECD之核酸序列（如，SEQ ID NO:193）取代編碼突變CTLA-4 ECD之核苷酸序列而選殖進入該質體IgG2 Fc融合蛋白載體中。該hCTLA-4-Ig融合蛋白一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體成熟hCTLA-4-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟hCTLA-4-Ig融合蛋白包含一人類CTLA-4 ECD （SEQ ID NO:159），其以其C-端融合人類IgG2 Fc （SEQ ID NO:218或SEQ ID NO:184）之N-端。該兩個hCTLA-4-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該hCTLA-4-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該成熟hCTLA-4-Ig融合蛋白二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白分子形式。

咸已實驗發現，藉由轉染包含編碼hCTLA-4-Ig或突變CTLA-4-Ig融合蛋白以及SEQ ID NO:184中所示hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的表現載體而在CHO細胞中製備之人類CTLA-4-Ig融合

蛋白或突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基，如以LCMS分析所測定；因此，hCTLA-4-IgG2或突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之多肽序列一般而言並不包括該C-端離胺酸殘基。

COS細胞之瞬時轉染

在含有40 ml生長培養基（添加10%胎牛血清（FBS）（Hyclone Cat. #SV30014.03）及1x PSG （青黴素、鏈黴素及麩醯胺）（Invitrogen, Cat. #10378-016）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, Cat. #10565-018））之T-175燒瓶中，使COS-7細胞生長至80-90%鋪滿。在以質體表現載體轉染細胞之前即時除去該培養基，並以35 ml之表現培養基（含有1x PSG之OptiMem培養基（Gibco #51985））置換。使質體DNA （10 μg）（如，編碼本發明突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之pCDNA突變CTLA-4 ECD IgG2 Fc表現載體）與FuGENE6轉染試劑（Roche #11 815 075 001）以1:3之體積比混合，並加入1 ml之生長培養基中。接著將此混合物緩慢加入該T-175燒瓶中，並溫和攪拌混合。在37°C下培育3天後，收集該培養基，加入新鮮之表現培養基，再使該培養物培育另外3 d。

可使用類似之流程，製備經由編碼人類CTLA-4-IgG2之類似質體載體或是編碼LEA29Y-Ig之質體載體轉染之COS-7細胞。

蛋白之純化

在RT下以1000x g離心10 min，並過濾通過0.2 μm濾膜（Nalgene, VWR #73520-982），以澄清取自轉染培養物（如，包含經由編碼突變CTLA-4-Ig融合蛋白之pCDNA突變CTLA-4 ECD IgG2 Fc載體轉染之細胞）之上清液。使用AKTA Explorer HPLC系統（GE Healthcare），以蛋白-A親和層析純化蛋白。使突變CTLA-4-Ig融合蛋白在PBS緩衝液中連結Hitrap Protein A FF管柱（GE Healthcare, #17-5079-01），以該相同緩衝液清洗，以100 mM

檸檬酸緩衝液（pH 4.0）溶析，再接著加入1/10體積之2M Tris鹼而進行中和。最後使用10 kDa MWCO濾膜（Pierce, Cat. #PI66810），使該蛋白溶液中之緩衝液以透析交換為PBS。

可使用類似之流程，純化人類CTLA-4-IgG2或LEA29Y-Ig融合蛋白。

蛋白品質之評估

SDS/PAGE分析

在非還原條件下，以SDS/PAGE分析，測量經純化之本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表觀分子量（MW）。在非還原條件下，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言係以包含兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在一態樣中，該二聚體係同型二聚體，包含兩個相同之突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體。在一態樣中，各個CTLA-4-Ig融合蛋白單體包含成熟/分泌之突變CTLA-4 ECD，其以其C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。該兩個突變CTLA-4-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成。除非另有明示，該同型二聚體係一般而言述於此等實例中之本發明突變融合蛋白分子形式。除非另有明示，示於此等實例中之數據係關於突變CTLA-4-Ig融合蛋白同型二聚體。

如下進行SDS/PAGE分析。將2 μg之純化蛋白加至20 μl之LDS樣本緩衝液（Invitrogen #NP0007）中，並根據製造商之建議條件，使其通過1x MES十二烷基硫酸鈉（SDS） /PAGE移動緩衝液（Invitrogen #NP0002）中之NuPAGE 4-12% Bis-Tris凝膠（Invitrogen #NP0321BOX）進行移動。於RT下，在50 ml SimplyBlue SafeStain （Invitrogen #LC6060）中並溫和震盪處理1 hr，以對凝膠進行染色。於RT下，以200 ml水並溫和震盪處理1 hr兩次，再根據製造商之建議條件，在染色緩衝液（Bio RAD 161-0752）中加工，以對凝膠進行脫染。

兩種例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白同型二聚體（稱為

純系D3及D4）以及Orencia®融合蛋白（其作為比較控制組）之代表性SDS/PAGE凝膠示於圖3。該D3-Ig融合蛋白二聚體包含兩個相同之D3-Ig融合蛋白單體，其以在各個D3-Ig單體中之半胱胺酸殘基間所形成之雙硫鍵共價連結。各個D3-Ig單體包含突變CTLA-4 ECD多肽（稱為"D3"），包含示於SEQ ID NO:61之多肽序列，其以其C-端直接（亦即，無「連接子」胺基酸殘基）融合示於SEQ ID NO:218之hIgG2 Fc多肽之N-端。該D4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個相同之D4-Ig單體，其以在各個D4-Ig單體中之半胱胺酸殘基間所形成之雙硫鍵共價連結。各個單體D4-IgG2融合蛋白包含突變CTLA-4 ECD多肽（稱為"D4"），包含示於SEQ ID NO:62之多肽序列，其以其C-端直接（亦即，無「連接子」胺基酸殘基）融合示於SEQ ID NO:218之hIgG2 Fc多肽之N-端。

如上所解釋，咸已實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中製備之突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基，如以LCMS分析所測定；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之多肽序列一般而言並不包括該C-端離胺酸殘基。

對所有之蛋白製備物進行SDS/PAGE分析，以確認就表觀分子量、蛋白濃度及純度而言之蛋白品質。該等SDS/PAGE分析之結果就所有之蛋白製備物而言皆為相似。由示於圖3之例示性凝膠結果可見，經純化之D3-IgG2及D4-IgG2融合蛋白二聚體具有約為80 kDa之表觀MW，其與圖10所示例示性同型二聚體突變CTLA-4-IgG2融合蛋白結構之預測MW相符（預測MW = 78-79 kDa）。（經純化之突變CTLA-4-IgG2蛋白單體一般而言具有39-40 kDa之表觀MW。）該等示於圖3凝膠中之蛋白條帶已經相等之強度染色；此可確認測量不同樣本蛋白濃度之精確性。至於蛋白純度，圖3中可觀察到一較低MW條帶位於約44 kDa之表觀MW，其與單體IgG2融合蛋白之預測MW相符。此一較低MW條帶之相對強

度亦相符為較低，且其估計為小於總蛋白量之5%。

可使用類似之SDS/PAGE分析，評估使用類似該等上述者之方法所製備之人類CTLA-4-IgG2或LEA29Y-Ig融合蛋白的純度。

內毒素分析

使用QCL-1000鱟變形細胞裂解物分析套組（Cambrex #50-648U），根據製造商之建議條件，測量突變CTLA-4融合蛋白之內毒素含量。用於細胞基礎性分析中之蛋白最大內毒素含量設定為10內毒素單位（EU）/mg蛋白。

可使用類似之分析，測量人類CTLA-4-IgG2或LEA29Y-Ig蛋白製備物之內毒素含量。

尺寸排除層析（SEC）分析

使用Dionex BioLC system （Dionex），以尺寸排除層析，測量蛋白凝聚量（包括突變CTLA-4多肽及控制組多肽之凝聚量）。使用20 min之等強度移動，使蛋白（5 μg）在PBS移動緩衝液中通過Tosoh G3000Wxl管柱（Tosoh Bioscience）移動，並以214奈米（nm）之吸收值（A）進行偵測。將用於後續分析之蛋白最大凝聚量設定為10%。

對所有之蛋白製備物進行SEC分析，以確認就蛋白凝聚量而言之蛋白品質。該等結果就所有之蛋白製備物而言皆為相似，且突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（D3-Ig）之代表性SEC分析溶析內容示於圖4。其y軸顯示毫吸收單位（mAU）；x軸顯示以分鐘計之溶析時間。該D3-Ig二聚體之結構解釋於上文之「SDS/PAGE分析」章節中。此一經純化之突變CTLA-4-Ig二聚體在尺寸上大多勻質，且並不含有高量之凝聚分子種。其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白亦進行類似分析並顯示類似結果（數據未示）。本發明之純化突變CTLA-4-Ig融合蛋白經發現係在尺寸上勻質且並不含有高量（>10%）之凝聚蛋白。確認本發明純化突變CTLA-4-Ig融合蛋白之凝聚狀態係重要者，因為經高度凝聚之突變CTLA-4-Ig融合蛋白

可以較高之結合性結合人類CD80及/或人類CD86分子，並因此可能具有較高之生物活性。

實例4

使用表面電漿子共振（SPR）（Biacore™分析）測量突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於人類CD80-小鼠Ig （hCD80-mIg）及人類CD86-小鼠Ig （hCD86-mIg）融合蛋白之結合性

此實例敘述用以使用Biacore作用分析而篩選突變CTLA-4-Ig融合蛋白之改良hCD80-mIg及/或hCD86-mIg配位體結合性的流程。在用以敘述此種類型分析之術語之中，經固定之結合配對物稱為「配位體」，而在該移動相中之結合配對物則稱為「分析物」。含有Ig域之融合蛋白一般而言會藉由兩Ig域間之強連結力而在溶液中形成二聚體結構。除非另有明示，此等二聚體之構形預期為此實例中所述融合蛋白（亦即，突變CTLA-4-Ig、Orencia®融合蛋白、LEA29Y-Ig、hCD80-mIg及hCD86-mIg）所存在者。名辭「結合性」一般而言係關於二聚體分析物（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）與二聚體配位體（如，hCD80-mIg或hCD86-mIg融合蛋白）間之結合強度。突變CTLA-4-Ig融合蛋白所述之結合性增加係由各個CTLA-4 ECD域與其對應配位體間之結合性增加所造成。結合性之強度一般而言係以平衡解離常數（K_D）敘述，其敘述平衡連結50%可用配位體的分析物莫耳濃度。

在此篩選法中，其以hCD80-mIg或hCD86-mIg配位體衍化Biacore感應晶片，並使緩衝液中之突變CTLA-4-Ig融合蛋白流過該等經配位體塗覆之感應晶片。突變CTLA-4-Ig融合蛋白結合特定結合配對物（亦即，hCD80-mIg或hCD86-mIg）之能力獲得評估。亦使控制組融合蛋白（亦即，人類CTLA-4-IgG2融合蛋白、Orencia®融合蛋白及突變LEA29Y-Ig融合蛋白）流過該等經配位體塗覆之感應晶片，並以類似方式評估此等分子結合hCD80-mIg或hCD86-mIg之能力以進行比較。使用該Biacore系統，其可評估目標蛋白結合hCD80-mIg或hCD86-mIg配位體之結合（k_{on}）及解離（k_{off}）常數，

並以其計算平衡解離常數K_D。該人類CTLA-4-IgG2融合蛋白（其包含融合人類IgG2多肽之WT人類CTLA-4 ECD多肽）可作為野生型人類CTLA-4-Ig「控制組」。此外或是或者，由於該Orencia®融合蛋白係由融合經修飾IgG1 Fc多肽之WT人類CTLA-4 ECD多肽組成，其亦可有效作為野生型人類CTLA-4-Ig控制組以進行比較。其辨識出相較於人類CTLA-4-IgG2、Orencia®融合蛋白及/或LEA29Y-Ig而具有增加hCD80-mIg及/或hCD86-mIg結合性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白。如下文詳細討論者，本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD80-mIg及/或hCD86-mIg之增加結合性（如相較於Orencia®融合蛋白（亦即，hCTLA-4-IgG1）及/或LEA29Y-Ig對於hCD80-mIg及/或hCD86-mIg之結合性）並非係因存在於該突變CTLA-4-Ig分子中之IgG2與存在於該Orencia®或LEA29Y-Ig分子中之突變IgG1的差異而造成。

所有之Biacore™分析皆係在Biacore™ 2000系統（GE Healthcare）上於室溫（RT，25°C）下進行。在所有實驗中使用HBS-EP緩衝液（10 mM HEPES （pH 7.4），150 mM NaCl，3 mM EDTA，0.005%界面活性劑P20）作為該流動緩衝液。

標準動力分析

標準動力分析係測量塗覆於感應晶片上之二聚體配位體（如，hCD80-mIg融合蛋白或hCD86-mIg融合蛋白）與移動相中之二聚體分析物（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白）間之結合動力學。根據製造商之操作流程，將兔抗小鼠IgG抗體（GE Healthcare, #BR-1005-14）固定在CM5感應晶片（GE Healthcare, #BR-1000-14）上。將抗體以固定緩衝液（10mM醋酸鈉，pH 5.0（BR-1003-51））稀釋至30 μg/ml。使用5 μl/分鐘之流速，注射35 μl之1-乙基-3-[3-二甲胺基丙基]碳化二亞胺鹽酸化物（EDC）及N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）混合物（以混合等體積之11.5 mg/ml EDC及75 mg/ml NHS而製備）（GE Healthcare, #BR-1000-50），再接著注射35 μl之未經稀釋抗體，以活化感應晶片CM5。將未經反應之

位點以35 μl之1M乙醇胺-HCL, pH 8.5 （GE Healthcare, #BR-1000-50）淬滅。此一流程一般而言可產生15,000反應單位（RU）之偶合抗體。以10 μl/min之流速，藉由分別注射10 μl或16 μl之配位體溶液（2 μg/ml蛋白於HBS-EP緩衝液中[10mM HEPES pH 7.4，150mM NaCl，3 mM EDTA，0.005% （v/v）界面活性劑P-20，GE Healthcare, #BR-1001-88]），使CTLA-4配位體人類CD80-小鼠Ig （hCD80-mIg） （Ancell, #510-820）或人類CD86-小鼠Ig（hCD86-mIg）（Ancell, #509-820）連結經抗體塗覆之感應晶片。配位體捕捉量一般而言係135-170 RU。使突變CTLA-4-Ig蛋白（或以HBS-EP緩衝液稀釋）以30 μl/min流過經配位體塗覆之感應晶片2 min，再使不含蛋白之HBS-EP緩衝液以相同流速進行5 min之共置。對於自hCD86-mIg具有極緩慢解離速率之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，亦使用較長之解離時間（如，20 min）進行動力分析。突變CTLA-4-Ig蛋白之Rmax信號量係介於約70–100 RU。各循環間之再生係藉著使10 mM甘胺酸緩衝液（pH 1.7）以50 μl/min進行3 min之共置而進行。在用於實際實驗之前，對新晶片進行4-5循環之捕捉/結合/再生。由自含有經捕捉之hCD80-mIg或hCD86-mIg的流細胞所取得之數據中減去自僅含有兔抗小鼠IgG捕捉抗體的參照細胞所取得之數據。一般而言，其係使介於自500 nM至0.2 nM之8種突變CTLA-4-Ig蛋白稀釋物相對空白參照組（僅含HBS-EP緩衝液）進行分析。

取自一典型Biacore分析之感應譜蹤跡圖示於圖5。此圖顯示隨時間（以秒（s）為單位）而取得之反應（RU），以下列三種融合蛋白與hCD86-mIg融合蛋白之結合產生：（1） Orencia®融合蛋白（作為控制組並用以進行比較） （Bristol-Myers Squibb Co.；參見，如，Larson C.P. et al., Am. J. Trans. 5:443-453 （2005））；（2） LEA29Y-Ig融合蛋白（用以進行比較）；及（3） 稱為「純系D3」（亦稱為D3-IgG2）之本發明例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白。該D3-IgG2融合蛋白包含兩個相同之單體融合蛋白，其以在各個單體中之半胱胺酸殘基間所形成之一或多個雙硫鍵彼此共價連結。參

見上文「SDS/PAGE分析」章節中之討論。各個單體融合蛋白包含示於SEQ ID NO:159之成熟突變CTLA-4 ECD多肽，其以其C-端融合示於SEQ ID NO:184或218之人類IgG2多肽之N-端。其他本發明之二聚體融合蛋白可包含類似該二聚體D3-IgG2融合蛋白之結構—除外各個單體融合蛋白之D3突變CTLA-4 ECD多肽經不同之突變CTLA-4 ECD多肽取代。

該結合期反應該目標分析物與該目標配位體間之結合。在圖5中，各個分析物之結合期係以該由箭頭所標記之時間前的時間曲線表示，且其係以分析物（D3-IgG2、Orencia®融合蛋白或LEA29Y-Ig）與該hCD86-mIg配位體之結合而定性。分析物離開該hCD86-mIg配位體之解離速率亦反應在該曲線中—參見，如，自約510秒起始之急遽反應單位增加率。

該分析之解離期係自圖5中之該由箭頭所標記之時間起始。在該解離期中，該分析物與該配位體自其結合之構形中解離。在圖5中，分析物離開該配位體之解離速率係由反應單位之降低表示(隨時間所測得之反應單位降低率)。根據此等數據，可測定相對解離速率常數（“off”速率，k_{off}或k_d）及結合速率常數（“on”速率，k_{on}或k_a）。該作用之總結合性可以K_D，(k_{off}) / (k_{on}) 敘述。較高之結合性通常會以較低之解離速率展現。如該較低之解離速率伴隨相等、較高或臨界較慢之結合速率，以使該計算之平衡解離常數K_D為較低，該結合性將係較高。在此情形下，對於hCD86-mIg配位體之結合性大於Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合性的突變CTLA-4-Ig融合蛋白亦將具有低於Orencia®蛋白之離開該配位體的較慢解離速率。對於hCD86-mIg配位體之結合性大於LEA29Y-Ig對於該相同配位體之結合性的突變CTLA-4-Ig融合蛋白亦將具有低於LEA29Y-Ig之離開該配位體的較慢解離速率。

圖5顯示LEA29Y-Ig離開該hCD86-mIg配位體之解離速率顯著較慢於Orencia®蛋白自該相同配位體之解離速率。LEA29Y-Ig結合hCD86-mIg之結合速率亦類似於Orencia®融合蛋白所觀察到者。因此，LEA29Y-Ig具有大於Orencia®蛋白之較高hCD86-mIg結合性。

此一發現與敘述LEA29Y-Ig具有大於Orencia®融合蛋白之較高hCD86-mIg配位體結合性的先前研究相符(Larson C.P. et al., Am. J. Trans. 5:443-453 (2005))。圖5亦顯示本發明之突變D3-IgG2融合蛋白具有小於Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白之離開hCD86-mIg配位體的較慢解離速率。該D3-IgG2融合蛋白亦具有相較Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白對於hCD86-mIg配位體之結合速率的類似(但稍微較快)結合速率結合hCD86-mIg配位體。因此,該D3-IgG2融合蛋白具有大於Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高hCD86-mIg配位體結合性。因此,該D3-IgG2融合蛋白預期可以較高之結合性結合天然CD86,包括,如,在哺乳動物(諸如,人類)中於活體內表現於APCs上之CD86。此一觀點可由下文實例中所討論之功能性細胞基礎性分析進一步支持。

使用其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行Biacore分析。此外,使用經hCD80-mIg塗覆之感應晶片以及本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行Biacore分析。判定此等突變分子之解離速率及結合性,並與Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白之解離速率及結合性進行比較。代表性之結果示於表3及4,並在下文詳細討論。

標準Biacore數據分析

在除去該等感應譜之再生及補充部分後,將曲線歸零至樣本注射前約10 s之所有曲線之5 s平均值。自各試驗曲線減去空白曲線。以BIAevaluation軟體(v4.1,可自GE Healthcare取得),使用"Fit kinetics, Simultaneous k_a/k_d"功能而分析數據。注射起始時間定義為所有曲線皆接近零點之結合期前時間。針對該結合期之數據選擇起始於注射起始時間後約10 s,並結束於注射中止時間前約10 s。注射中止時間定義為任何與解離期相關之信號峰值出現前的時間。解離期係選擇為起始於注射中止時間後約10 s,並包括該5 min解離期之280-295 s。該1:1 Langmuir模式敘述反應A + B <=> AB。此一模式代表單一配位體對單一目標蛋白(如,受體)之結合。使用取自該BIAevaluation軟體之該1:1 Langmuir模式以判定結

合速率常數（k_a）及解離速率常數（k_d），並計算平衡解離常數K_D。$K_D = k_d/k_a$。$K_D =$ （[A]・[B]）/[AB]。平衡解離常數K_D係等於平衡結合常數K_A之倒數。$K_D = 1/K_A$。該反應（分析物A加配位體B產生複合物AB）之速率方程式（其中A= 經注射分析物，B= 自由配位體，且t= 時間）為：$d[B]/dt = -$ （k_a [A][B] - k_d [AB]）及$d[AB]/dt = k_a[A][B] - k_d[AB]$。以R （特定時間之Biacore反應單位（RU））取代[AB]，Rmax-R取代[B]，及C（分析物濃度）取代[A]，以Biacore單位表現之淨速率為$dR/dt = k_aC$（Rmax-R） $- k_dR$，其中R在t0 = 0，B[0] = Rmax，且AB[0] = 0 RU，其總反應 =[AB] + RI。將大平移（RI）設定為零，並使Rmax、k_a及k_d對所有曲線進行整體擬合。

對於本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白製備物以及LEA29Y-Ig及Orencia®融合蛋白進行上述之標準動力分析及數據分析。表3及4摘述代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之結合數據。

表3提出代表性突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD86-mIg之結合性，如以上述之標準Biacore分析測量。具體言之，表3顯示各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白之名稱；對應該單體突變CTLA-4 ECD融合蛋白多肽序列之序列辨識號（SEQ ID NO）；根據該突變蛋白對於hCD86-mIg之結合性所測定之平衡解離常數（K_D （莫耳濃度（M））；以及相對Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg結合性的各突變蛋白之hCD86-mIg結合性。此一相對結合性（示於最右欄）係以突變融合蛋白之hCD86-mIg結合性相較於Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg結合性的倍數改良而表示。表3中之各個本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言在溶液中係以包含兩個相同單體融合蛋白的二聚體融合蛋白形式存在，其中各個單體蛋白包含突變CTLA-4 ECD多肽（如，稱為D1、D1T、D2、D3、D4等），其在其C-端直接融合包含SEQ ID NO:184或218序列之IgG2多肽之N-端。各個此等二聚體突變CTLA-4-Ig可以技藝中已知之標準技術製備。或者，各個此等二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體可使用示於上文實例3之方法製備。簡言之，其可將編碼表3所辨識之特

定突變CTLA-4 ECD的核酸序列（如，編碼表3中所辨識突變CTLA-4 ECD多肽序列之核酸序列）選殖進入該IgG2 Fc融合載體中，以該載體轉染哺乳動物細胞，在進行該所得融合蛋白之表現、純化及評估，如實例3所述。各個突變CTLA-4 ECD之例示性核酸序列示於本文所包括之序列表中。Orencia®融合蛋白（其包含兩個單體融合蛋白，各個單體融合蛋白包含融合經修飾IgG1 Fc之野生型人類CTLA-4 ECD）係作為控制組，亦即，其對於hCD86-mIg之結合性係設定為1。其亦顯示LEA29Y-Ig融合蛋白以及人類CTLA-4-Ig融合蛋白之K_D值。此外，其亦顯示LEA29Y-Ig之hCD86-mIg結合性相較於Orencia®蛋白之hCD86-mIg結合性的倍數改良。CTLA-4-IgG2及Orencia®融合蛋白對於hCD86-mIg之結合性約為相等，因此確認，人類CTLA-4-IgG2中所存在之人類IgG2與Orencia®蛋白中所存在之經修飾IgG1間的差異，對於此等分子個別之hCD86-mIg結合親和性僅有極小之貢獻（如其有任何貢獻）。如下文實例5中所詳細討論，茲以確認，本發明突變CTLA-4-Ig多肽與Orencia®蛋白（或LEA29Y-Ig）間之免疫抑制功能活性差異並非由其包含不同IgG同種型之個別Ig Fc區域造成。

如表3所示，本發明之代表性突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有如下之hCD86-mIg結合性：（1） 至少約等於大於人類CTLA-4-IgG2（"hCTLA-4-IgG2"）（其包含兩個共價連結之單體融合蛋白，各個此種單體蛋白包含融合IgG2 Fc多肽之人類CTLA-4 ECD多肽）之結合性；（2） 至少約等於大於Orencia®蛋白對於hCD86-mIg配位體之結合性；及/或（3） 至少約等於大於LEA29Y-Ig對於hCD86-mIg配位體之結合性。其指出各個CTLA-4-Ig突變體相對於Orencia®蛋白之hCD86-mIg結合性的CD86-mIg結合性倍數改良（表3第4欄）。

茲發現大部分之突變CTLA-4-Ig融合蛋白離開hCD86-mIg融合蛋白之解離速率係較Orencia®融合蛋白離開hCD86-mIg融合蛋白之解離速率緩慢（數據未顯示）。茲發現諸多之突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD86-mIg之結合速率係大於Orencia®融合蛋白對

於該相同配位體之結合速率（數據未顯示）。

所有示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有小於人類CTLA-4-IgG2或Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg平衡解離常數的hCD86-mIg平衡解離常數（K_D）。同時，大部分示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有低於LEA29Y-Ig之hCD86-mIg平衡常數的hCD86-mIg平衡解離常數。

所有示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有大於人類CTLA-4-IgG2 或 Orencia® 融合蛋白之hCD86-mIg結合性的hCD86-mIg結合性（相對於Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg結合性的經計算倍數改良示於表3第4欄）。同時，諸多示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於LEA29Y-Ig之hCD86-mIg結合性的hCD86-mIg結合性（表3第4欄）。

具有大於Orencia® 或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高hCD86-mIg配位體結合性的本發明突變CTLA-4-Ig將可能具有較高之活體內免疫抑制強度（分別相較於hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白），諸如，在，如，用以在對象體內抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在其中需要免疫抑制或免疫壓抑之哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法或是本文他處所述之其他方法。

表3

融合蛋白（二聚體）	SEQ ID NO*（如，突變CTLA-4 ECD者）	hCD86-mIg K_D（M）	hCD86-mIg結合力（相對於Orencia®融合蛋白二聚體）
人類CTLA-4-IgG2	162	3.95×10^{-9}	1.32x
Orencia®融合蛋白二聚體	164	5.23×10^{-9}	1
LEA29Y-Ig	166	$1.05 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	5x – 10x

D1-IgG2	58	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D1T-IgG2	59	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D2-IgG2	60	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-IgG2	61	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D4-IgG2	62	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D5-IgG2	63	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D6-IgG2	64	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D20-IgG2	65	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D21-IgG2	66	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D23-IgG2	67	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D24-IgG2	68	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D26-IgG2	69	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D27-IgG2	70	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D28-IgG2	71	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D29-IgG2	72	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D31-IgG2	73	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-1-IgG2	1	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-2-IgG2	2	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-3-IgG2	3	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-4-IgG2	4	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-5-IgG2	5	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-6-IgG2	6	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-7-IgG2	7	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-8-IgG2	8	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-9-IgG2	9	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-11-IgG2	10	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-12-IgG2	11	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-14-IgG2	12	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-15-IgG2	13	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-16-IgG2	14	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-17-IgG2	15	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-19-IgG2	16	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-20-IgG2	17	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-21-IgG2	18	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-22-IgG2	19	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-23-IgG2	20	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-24-IgG2	21	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-25-IgG2	22	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-26-IgG2	23	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-27-IgG2	24	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-28-IgG2	25	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D3-29-IgG2	26	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x

D3-30-IgG2	27	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-31-IgG2	28	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-32-IgG2	29	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-33-IgG2	30	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-34-IgG2	31	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-39-IgG2	32	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D3-50-IgG2	33	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-52-IgG2	34	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D3-53-IgG2	35	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-54-IgG2	36	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-56-IgG2	38	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-62-IgG2	44	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-65-IgG2	47	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-66-IgG2	48	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-69-IgG2	50	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-70-IgG2	51	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-71-IgG2	52	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-72-IgG2	53	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-73-IgG2	54	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-74-IgG2	55	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-75-IgG2	56	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-76-IgG2	57	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x

*註記：表3中針對人類CTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白之序列辨識號（SEQ ID NOS）分別係此等Ig融合蛋白之多肽序列者。表3中為各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NO係辨識該經辨識突變CTLA-4-Ig融合蛋白之突變CTLA-4 ECD的多肽序列。該等數據係有關於突變CTLA-4-Ig，其包含突變CTLA-4 ECD（如，SEQ ID NOS:1-48及58-73中之任一者），其在其N-端直接融合示於SEQ ID NO:184或218之IgG2 Fc多肽之C-端。用以製備此等融合蛋白之方法係為技藝中所已知且述於本文之中。然而，如上所註記，咸已實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中所製備之突變CTLA-4-Ig一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184

中所示之序列並不包括該C-端離胺酸殘基。不包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:205-214、219及221。

表4提出突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD80-mIg之結合性，如以標準Biacore分析測量。具體言之，表4顯示突變CTLA-4-Ig融合蛋白之純系名稱；對應該單體突變CTLA-4 ECD融合蛋白多肽序列之序列辨識號（SEQ ID NO）；hCD80-mIg配位體結合性分析之平衡解離常數（K_D（莫耳濃度（M））；以及相對Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合性的該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之hCD80-mIg配位體結合性。針對各個突變蛋白，其顯示該hCD80-mIg配位體結合性相較於Orencia®融合蛋白之hCD80-mIg配位體結合性的倍數改良（表4第4欄）。Orencia®融合蛋白係作為控制組，亦即，其對於hCD80-mIg之結合性係設定為1。該等突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言在溶液中係以二聚體融合蛋白之形式存在。如表4所示，本發明之二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有如下之hCD80-mIg結合性：（1） 至少約等於大於人類CTLA-4-IgG2之結合性；（2） 至少約等於大於Orencia®融合蛋白對於hCD80-mIg配位體之結合性；及/或（3） 至少約等於大於LEA29Y-Ig對於hCD80-mIg配位體之結合性。如上所討論，各個二聚體突變CTLA-4-Ig二聚體可使用上文實例3所示之方法製備。

茲發現諸多之突變CTLA-4-Ig融合蛋白離開hCD80-mIg融合蛋白之解離速率係約等於或大於Orencia®融合蛋白離開該相同配位體之解離速率（數據未顯示）。茲發現部分之突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD80-mIg之結合速率係約等於或大於Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合速率（數據未顯示）。

諸多示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有低於人類CTLA-4-IgG2或Orencia®融合蛋白之hCD80-mIg平衡解離常數

的hCD80-mIg平衡解離常數（K_D）。同時，數種示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有至少約等於LEA29Y-Ig之hCD80-mIg平衡常數的hCD80-mIg平衡解離常數。

諸多示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有大於人類CTLA-4-IgG2或Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合性的hCD80-mIg結合性（相對於Orencia®融合蛋白之hCD80-mIg結合性倍數改良示於第4欄）。同時，數種示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有至少約等於或大於LEA29Y-Ig對於該相同配位體之結合性的hCD80-mIg結合性。

具有大於hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高hCD80-mIg結合性的本發明突變CTLA-4-Ig將可能具有較高之活體內免疫抑制強度（分別相較於hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白），諸如，在，如，用以在對象體內抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在其中需要免疫抑制或免疫壓抑之哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法或是本文他處所述之其他方法。

表4

融合蛋白（二聚體）	SEQ ID NO*（如，突變CTLA-4 ECD者）	hCD80-mIg K_D（M）	hCD80-mIg結合力（相對於Orencia®融合蛋白二聚體）
hCTLA-4-Ig G2	162	6.55×10^{-10}	1.34x
Orencia®融合蛋白二聚體	164	8.77×10^{-10}	1
LEA29Y-Ig	166	4.39×10^{-10} – 2.19×10^{-10}	2x – 4x
D1-IgG2	58	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D1T-IgG2	59	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D2-IgG2	60	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-IgG2	61	1.75×10^{-9} – 4.39×10^{-10}	0.5x - 2x
D4-IgG2	62	1.75×10^{-9} – 4.39×10^{-10}	0.5x - 2x
D5-IgG2	63	1.75×10^{-9} – 4.39×10^{-10}	0.5x - 2x

D6-IgG2	64	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D20-IgG2	65	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D21-IgG2	66	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D23-IgG2	67	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D24-IgG2	68	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D26-IgG2	69	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D27-IgG2	70	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D28-IgG2	71	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D29-IgG2	72	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D31-IgG2	73	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-1-IgG2	1	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-2-IgG2	2	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-3-IgG2	3	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-4-IgG2	4	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-5-IgG2	5	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-6-IgG2	6	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-7-IgG2	7	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-8-IgG2	8	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-9-IgG2	9	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-11-IgG2	10	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-12-IgG2	11	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-14-IgG2	12	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-15-IgG2	13	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-16-IgG2	14	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-17-IgG2	15	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-19-IgG2	16	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-20-IgG2	17	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-21-IgG2	18	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-22-IgG2	19	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-23-IgG2	20	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-24-IgG2	21	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-25-IgG2	22	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-26-IgG2	23	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-27-IgG2	24	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-28-IgG2	25	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-29-IgG2	26	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-30-IgG2	27	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-31-IgG2	28	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-32-IgG2	29	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-33-IgG2	30	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-34-IgG2	31	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-39-IgG2	32	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x

D3-50-IgG2	33	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-52-IgG2	34	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-53-IgG2	35	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-54-IgG2	36	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-56-IgG2	38	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-62-IgG2	44	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-65-IgG2	47	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-66-IgG2	48	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-69-IgG2	50	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-70-IgG2	51	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-71-IgG2	52	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-72-IgG2	53	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-73-IgG2	54	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-74-IgG2	55	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-75-IgG2	56	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-76-IgG2	57	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x

*註記：表4中針對人類CTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NOS分別係此等融合蛋白之多肽序列者。表4中為各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NO係辨識該經辨識突變CTLA-4-Ig融合蛋白之突變CTLA-4 ECD的多肽序列。該等數據係有關於突變CTLA-4-Ig，其包含突變CTLA-4 ECD（如，SEQ ID NOS:1-48及58-73中之任一者），其在其N-端融合示於SEQ ID NO:184或218之IgG2 Fc多肽之C-端。然而，茲已藉由LCMS分析而實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中所製備之突變CTLA-4-Ig一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之序列並不包括該C-端離胺酸殘基。不包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:205-214、219及221。

單體動力分析

對於突變CTLA-4-Ig融合蛋白結合特性之進一步確認可由單價動力結合分析取得。此等分析係測量塗覆於感應晶片上之二價試驗蛋白（如，二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）與移動相中之單價配位體（如，經木瓜蛋白酶酶切消化之hCD86-mIg）間之結合動力學。根據製造商之操作流程，將山羊抗人類IgG抗體（Jackson ImmunoResearch, #109-005-098）偶合在CM5感應晶片上，一般而言可產生15,000反應單位（RU）。以10 μl/min之流速，藉著使經抗體塗覆之晶片與10 μl之二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白於HBS-EP緩衝液中之2 μg/ml溶液進行共置而捕捉配位體。配位體捕捉量一般而言係25-80 RU。將單體hCD86-mIg配位體（由hCD86-mIg之木瓜蛋白酶酶切消化及蛋白-A瓊脂糖吸收而產生，如Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques [生物複合技術], Academic Press, 1996中所述）以HBS-EP緩衝液稀釋，並使其以30 μl/min流過經試驗蛋白塗覆之感應晶片2 min，再使不含蛋白之HBS-EP緩衝液以相同流速進行2 min之共置。各循環間之再生係藉著使10 mM甘胺酸緩衝液（pH 1.7）以30 μl/min進行3 min之共置而進行。一般而言，其係使介於自3000 nM至0.2 nM之8種單體分析物蛋白稀釋物相對空白參照組（僅含HBS-EP緩衝液）而以雙重試驗進行分析。與突變CTLA-4-Ig蛋白結合之Rmax信號量係介於約10-60 RU。

針對動力分析，如上選擇進行單體結合分析之數據，除外該結合數據選擇係起始及結束於距注射起始及中止時間5 s，且解離數據選擇係起始於注射中止時間後5 s，並一般而言包括該解離期之1-60 s。亦使用BIAevaluation軟體分析此等數據之穩態平衡親和性。使用BIAevaluation之"General fit: average"功能，在接近樣本注射結束之5-20 s範圍內，平均各個濃度之穩態結合量（$Response_{eq}$ （"R_{eq}"）值）。使用BIAevaluation軟體，根據方程式$Req=K_A \times C \times Rmax/(K_A \times C \times n+1)$ （其中C係分析物濃度，且立體干擾因子n係1，且$K_D= 1/ K_A$），自Req對

濃度作圖而判定穩態親和性。在部分情形下，其可觀查到實質性之非專一性結合，如以解離後之殘餘平坦R-值蹤跡表示。此等數據可藉著自該等R_{eq}值中減去該殘餘R值而校正。接著在GraphPad Prism軟體（GraphPad Software, Inc.）中，使用"one site-specific binding"模式而計算值K_D。

對於代表性突變CTLA-4-Ig蛋白之亞群進行此一單體結合分析，且該等結果摘述於表5。整體言之，在該單體結合分析中相對於LEA29Y-Ig所觀察到之對於突變CTLA-4-Ig融合蛋白之hCD86 ECD結合改良程度，與標準動力分析中相對於LEA29Y-Ig所觀察到之對於突變CTLA-4-Ig融合蛋白之hCD86 ECD結合改良程度相似。此等結果支持突變蛋白在結合動力學中所觀察到之改良係由該等突變蛋白在結合親和性方面之真正改良（如，相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白）所造成，且並不係由因凝聚蛋白製備物之高價性而造成之潛在人造物所造成。

表 5

融合蛋白（二聚體）	SEQ ID NO*（如，突變CTLA-4 ECD者）	單體 hCD86 ECD K_D （M）	單體 hCD86 ECD 之結合親和性 （相對於 LEA29Y-Ig）
LEA29Y-Ig	166	1.68×10^{-6}	1
D3-IgG2	61	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-4-IgG2	4	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-11-IgG2	10	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-12-IgG2	11	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-14-IgG2	12	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-17-IgG2	15	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-20-IgG2	17	8.4×10^{-7} - 3.36×10^{-7}	2x-5x
D3-27-IgG2	24	8.4×10^{-7} - 3.36×10^{-7}	2x-5x
D3-29-IgG2	26	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-31-IgG2	28	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-53-IgG2	35	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x

*註記：表5中針對LEA29Y-Ig所示之SEQ ID NO係

LEA29Y-Ig融合蛋白之多肽序列者。表5中為各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NO係辨識該經辨識突變CTLA-4-Ig融合蛋白之突變CTLA-4 ECD的多肽序列。該等數據係有關於突變CTLA-4-Ig，其包含突變CTLA-4 ECD （如，SEQ ID NOS:4、10-12、15、17、24、26、28、35及61中之任一者），其在其N-端融合示於SEQ ID NO:184或218之IgG2 Fc多肽之C-端。然而，茲已藉由LCMS分析而實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中所製備之突變CTLA-4-Ig一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之序列並不包括該C-端離胺酸殘基。不包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:205-214、219及221。包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222。

實例5

使用人類PBMC增殖分析（抗-CD3抗體刺激）而測量CTLA-4突變體之生物活性

CTLA-4-Ig及其特定變體已經顯示為活體外T細胞增殖之強抑制劑（參見，如，Larson et al., Am. J. Transplant. 5, 443）。為在此等分析中測量突變CTLA-4-Ig蛋白之改良活性，茲發展出周邊血液單核細胞（PBMC）增殖分析。

以等體積之PBS稀釋人血（由捐贈者計畫新鮮收集），再使用Histopaque （Sigma, #10771） Ficoll梯度，根據製造商之建議條件進行分級分離以分離PBMCs。以生長培養基（添加10% FBS （Hyclone #SV30014.03）及1x PSG （Invitrogen, #10378-016）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, #10565-018））稀釋PBMCs，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入96孔培養盤（BD

Biosciences, #353077）中。以生長培養基系列稀釋試驗化合物，並以三重試驗形式加入該等孔中。添加小鼠抗-人類CD3抗體（BD Pharmingen: 555329）至5 μg/ml之終濃度以起始細胞增殖。在37°C下培育2天（d）後，以1 μCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE Healthcare, #TRK758-5MCI），再使該等試驗盤在37°C下培育額外16 hr。在細胞收集器（FilterMate Omnifilter-96 Harvester）中，使用製造商之建議條件而收集細胞，並使用閃爍計數器（Wallac Trilux, #1450-421）測量^{3}H胸苷之納入。^{3}H胸苷納入之程度（^{3}H胸苷攝入）係T細胞增殖程度之指標。^{3}H胸苷之納入係以標準技術測量。T細胞之增殖係以三重試驗孔之平均每分鐘計數（cpm）表示。

使用非線性回歸曲線擬合模式（S型劑量反應，可變斜率）及最小平方擬合法，以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據。茲報告取自該等結果之IC50（亦顯示為IC_{50}）參數及其相關之95%信賴區間（表6）。圖6顯示取自涉及一組本發明例示突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D3-04-IgG2、D3-11-IgG2、D3-12-IgG2及D3-14-IgG2融合蛋白）之代表性PBMC增殖分析（使用抗-CD3抗體刺激）的細胞增殖曲線。該圖係^{3}H胸苷納入（每分鐘計數（cpm））對蛋白濃度（納莫耳濃度（nM））之作圖。^{3}H胸苷納入（^{3}H胸苷攝入）（其係T細胞增殖程度之指標）係以標準技術測量。

其亦包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。此等結果說明，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高強度或較大能力，以在活體外抑制或壓抑多株T細胞之活化或T細胞之增殖。

茲使用其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行PBMC增殖分析。表6提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表6提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對控制組（Orencia®、hCTLA-4-IgG2及LEA29Y-Ig融合蛋白）在該

PBMC增殖分析（使用抗-CD3抗體刺激）中之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。IC50值表示在活體外產生T細胞增殖之50%抑制所需之化合物（如，突變CTLA-4-Ig、hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白）濃度。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。使用單因子ANOVA及事後比較Dunnett或Bonferroni試驗，分別使突變CTLA-4-Ig融合蛋白及hCTLA-4-IgG2與Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白進行比較（C.W. Dunnett, New Tables for Multiple Comparisons with a Control [用以與控制組進行多重比對之新穎表格], Biometrics 20(3):482-491（Sept. 1964）; Abdi, Herve, "The Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons [多重比對之Bonferroni及Sidak校正]", 於Encyclopedia of Measurement and Statistics [測量及統計百科全書]（N.J. Salkind ed., Thousand Oaks, CA 2007）；亦可在全球資訊網於網址utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf取得）。Ig融合蛋白之統計分析係使下列突變CTLA-4 ECD多肽（純系D24、D3-07、D3-15及D3-16）中之一種作為n = 1不進行分析而構成。名辭「SD（平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。

表6. 使用抗-CD3抗體刺激之例示性PBMC增殖分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50（nM）	平均 Log IC50（nM）	SD（平均 Log IC50）（nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	5.16	0.71	0.51
hCTLA-4-IgG2	8.46	0.93	0.43
LEA29Y-Ig	0.48[1]	-0.32	0.54
D3-4-IgG2	0.05[1,2]	-1.27	0.45
D3-7-IgG2	0.12	-0.93	NA
D3-11-IgG2	0.08[1,2]	-1.07	0.40
D3-12-IgG2	0.06[1,2]	-1.27	0.17
D3-14-IgG2	0.07[1,2]	-1.17	0.15

D3-15-IgG2	0.21	-0.69	NA
D3-17-IgG2	0.04[1,2]	-1.36	0.37
D3-20-IgG2	0.07[1,2]	-1.19	0.37
D3-26-IgG2	0.15[1]	-0.83	0.49
D3-27-IgG2	0.10[1,2]	-1.00	0.41
D3-29-IgG2	0.07[1,2]	-1.13	0.53
D3-30-IgG2	0.18[1]	-0.74	0.35
D3-31-IgG2	0.04[1,2]	-1.42	0.25
D3-32-IgG2	0.10[1]	-1.00	0.47
D3-33-IgG2	0.12[1]	-0.94	0.69
D3-34-IgG2	0.41[1]	-0.39	0.18
D3-39-IgG2	0.47[1]	-0.33	0.21
D3-50-IgG2	0.35[1]	-0.46	0.23
D3-52-IgG2	0.49[1]	-0.31	0.20
D3-53-IgG2	0.02[1,2]	-1.69	0.24
D3-54-IgG2	0.17[1]	-0.77	0.22
D3-56-IgG2	0.08[1]	-1.08	0.20
D3-62-IgG2	0.05[1,2]	-1.29	0.23
D3-69-IgG2	0.05[1,2]	-1.34	0.19
D3-70-IgG2	0.08[1]	-1.10	0.10
D3-71-IgG2	0.05	-1.32	NA
D3-72-IgG2	0.03[1,2]	-1.54	0.19
D3-73-IgG2	0.23[1]	-0.64	0.25
D3-75-IgG2	0.08[1]	-1.11	0.33
D3-76-IgG2	0.13[1]	-0.88	0.36
D3-IgG2	0.14[1]	-0.85	0.13
D24-IgG2	0.12	-0.93	NA

表6中之上標註記如下：[1]與Orencia之統計差異$p<0.05$，如以單因子ANOVA及事後比較Dunnett試驗測定。

[2]與LEA之統計差異$p<0.05$，如以單因子ANOVA事後比較Bonferroni試驗測定。包含D3-7、D3-15、D3-71及D24突變CTLA-4 ECDs之融合蛋白僅試驗一次，並因此無法進行統計比較。註記：表6中之名辭「NA」意謂「未取得」。

統計分析顯示，在至少兩次不同分析中試驗並以上標註記（1）指明（參見表6）之所有突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆在強度上統計優於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較大

能力，以在活體外之PBMC分析中壓抑或抑制T細胞之增殖）。該等以上標註記（2）指明者（參見表6）亦在強度上統計優於LEA29Y-Ig融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之PBMC分析中壓抑或抑制T細胞之增殖），如以上文所討論之單因子ANOVA及事後比較Dunnett及Bonferroni試驗測定。在包含經修飾之IgG1 Fc（如於Orencia®中）或野生型IgG2 Fc（如於hCTLA4-IgG2中）之人類CTLA-4-Ig融合蛋白間並無統計差異。此等發現說明，表6所示本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（其包含人類IgG2 Fc）與Orencia®或hCTLA-4-IgG2間之功能活性差異係CTLA-4 ECD區域中所為胺基酸變化（亦即，胺基酸取代）之直接結果。本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白與，例如，Orencia®（其包含經修飾之IgG1 Fc）間之功能活性差異並不係其個別Ig Fc多肽序列中差異之結果。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制T細胞增殖之較高能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較高免疫抑制強度。各個此等本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之預防或應用中具有相對於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較高能力而壓抑或抑制T細胞增殖，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

應用相同之統計分析，茲發現，在Orencia®融合蛋白（其包含人類CTLA-4 ECD-突變IgG1）及人類CTLA-4-IgG2間並無

統計差異。因此，咸信此等分子Ig域間之差異（亦即，Orencia®融合蛋白之突變IgG1與hCTLA-4-IgG2之人類IgG2）並不會影響此等分子之功能性。參見圖11。隨著漸增劑量之Orencia®融合蛋白所觀察到之增殖抑制並未顯著不同於以CTLA-4-IgG2所觀察到者，此指出其分別之免疫抑制活性並不會根據其不同之IgG同種型而有所偏移，而是由其hCTLA-4 ECD多肽所造成。因此，本發明突變CTLA-4-Ig多肽與Orencia®融合蛋白（或LEA29Y-Ig，因其與Orencia®蛋白含有相同之Ig）間之不同免疫抑制活性並不可歸因於其包含不同IgG同種型之個別Fc區域。

本發明包括單體突變CTLA-4 ECD蛋白，其具有能力，且在部分情形下，具有大於單體人類CTLA-4蛋白或其胞外域之較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。其亦提供單體突變CTLA-4 ECD融合蛋白，其具有能力，且在部分情形下，具有大於單體hCTLA-4-Ig蛋白或其胞外域之較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。其亦包括突變CTLA-4 ECD蛋白，其具有能力，且在部分情形下，具有大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體的較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。部分之本發明突變CTLA-4 ECD融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-ECD-Ig融合蛋白二聚體）具有能力，且在部分情形下，具有大於hCTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體、Orencia®融合蛋白二聚體及/或LEA29YIg融合蛋白二聚體之較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。

實例6

使用人類$CD4^+$ T細胞增殖分析而測量突變CTLA-4-Ig分子之生物活性

人類CTLA-4-Ig以及其特定變體已經顯示可藉著阻斷CD80及CD86經由CD28之信號傳導而抑制T細胞之增殖（Linsley P.S., Immunity 1:793-801 （1994）; Larson C. P. et al.,

Am. J. Transplant. 5:443-453 （2005））。由於本發明之突變CTLA-4-Ig蛋白具有改良之CD86-Ig配位體結合性，茲發展出$CD4^+$ T細胞增殖分析以測量該等突變CTLA-4-Ig蛋白阻斷經由CD86之信號傳導的能力。

創造編碼全長人類CD86蛋白之DNA序列

茲創造質體pCDNA3.1 hB7.2 FL，以編碼全長人類CD86蛋白，而在經轉染細胞之表面表現。以衍生自人類白細胞（BD Biosciences, Cat# HL4050AH）之cDNA的PCR擴增，使用根據其與示於SEQ ID NO:176之CD86-編碼核苷酸序列之序列同源性而設計之正向及反向寡核苷酸引子進行。該等引子係以一般熟習技藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。此等技術述於，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。使用50納克（ng）之cDNA作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Herculase聚合酶緩衝液（Stratagene; #600260）及200 μM dNTPs，進行30個擴增循環（94°C，30 s；50°C，30 s；72°C，60 s）。根據製造商之建議條件，將該PCR產物以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen #28106）純化，並以限制酶*KpnI*及*NotI*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議條件進行純化，再使其接合進入經類似酶切消化之質體pCDNA 3.1（+）（Invitrogen, Cat. #V790-20）中。根據製造商之建議條件，使接合物轉形進入TOP10大腸桿菌細胞（Qiagen, Cat. #C4040-10）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB（Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件，以其製備質體DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液。

該全長人類CD86蛋白之預測胺基酸序列示於SEQ ID

NO:175。在此序列中，胺基酸殘基1-23係預測之信號序列，胺基酸殘基21-241包含人類CD86胞外域，胺基酸殘基242-270包含穿膜域，且胺基酸殘基271-329包含胞質域。

創造在細胞表面表現人類CD86之穩定細胞系

在含有20 ml生長培養基（添加10% FBS （Hyclone Cat. #SV30014.03）及1x PSG （Invitrogen, Cat. #10378-016）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, Cat. #10565-018））之T-175燒瓶中，使HEK293細胞生長至80-90%鋪滿。以混合60 µl Fugene 6 （Roche, #11814443001）之10 µg質體DNA（pCDNA3.1 hB7.2 FL），根據製造商之建議條件而轉染細胞。在37°C下於生長培養基中培育細胞2天（d），再接著於選擇培養基（含有300 µg/ml遺傳黴素（Invitrogen, #10131-027）之生長培養基）中培育10 d，每2 d更換培養基。為容許進行FACS分選，以FITC-標記性抗-CD86抗體（BD Biosciences, #555），根據製造商之建議條件，染色經轉染之細胞。使用門控FITC信號之細胞分選器（Dako, MoFlo），將CD86-陽性細胞分別分選進入96孔細胞培養盤（Sigma-Aldrich, #CLS-3596）中，該盤含有200 µl/孔之含有25%條件培養基（先前自未經轉染（或天然）細胞培養物所收集之生長培養基）之生長培養基。在37°C下培育13-19 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有0.5 ml/孔之生長培養基的24孔培養盤中。在37°C下培育7 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有20 ml生長培養基之T-175燒瓶中。根據高含量之細胞表面CD86表現而選擇終細胞系，如使用FACS Caliber （BD Biosciences），根據製造商之建議條件，以經FITC-標記性抗-CD86抗體染色之細胞的FACS分析所測量。

$CD4^+$ T細胞增殖分析

自人類Buffy蛋白殼製備物coat preps （Stanford University

Blood Center, Stanford, CA），使用EasySep人類CD4陽性選擇套組（StemCell Technologies, #18052R），以磁性細胞分離器（RoboSep, StemCell Technologies, #20000），根據製造商之建議，使$CD4^+$ T細胞富集至>96%。以添加10% FBS （Hyclone SV30014.03）之Yssel氏培養基（Gemini Bio-Products, #400-102），將經富集之$CD4^+$ T細胞調整至1 x 10^6細胞/ml之密度，並以50 µl/孔加入96孔組織培養盤中。對於表現膜連人類CD86之HEK293細胞以6000 rads （Stanford Research Institute, Menlo Park, CA）進行輻射照射，以該相同培養基調整至1 x 10^6細胞/ml，再以50 µl/孔加入培養盤中。以該相同培養基系列稀釋試驗化合物，並以三重試驗形式加入該等孔中。添加小鼠抗-人類CD3抗體（BD Pharmingen: 555329）至5 µg/ml之終濃度以起始細胞增殖。在37°C下培育3 d後，以1 µCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE Healthcare, #TRK758-5MCI），再使該等試驗盤在37°C下培育額外18 hr。使用細胞收集器（Perkin Elmer Filter Harvester D961962）收集細胞，並根據製造商之建議條件，使用液體閃爍計數器（Wallac Trilux 1450）測量^{3}H胸苷。使用可變斜率方程式

（Y=底值 + （頂值-底值）/（1+10^((LogIC50-X)(斜率))），以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據，以產生各試驗化合物之IC50。名辭「(LogIC50-X)(斜率)」係該方程式中之一指數。

圖7顯示取自涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組（亦即，D3-04-IgG2、D3-11-IgG2、D3-12-IgG2及D3-14-IgG2融合蛋白）之代表性$CD4^+$ T細胞增殖分析的細胞增殖曲線。其亦包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。該圖係^{3}H胸苷納入（cpm）對蛋白濃度（nM）之作圖。^{3}H胸苷納入係細胞增殖程度之指標，且係以標準技術測量。此等結果說明，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高強度或較大能力，以

在活體外抑制或壓抑CD86共刺激。

茲對諸多其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行此$CD4^+$ T細胞增殖分析。表7提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表7提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對控制組（Orencia®、LEA29Y-Ig及人類CTLA-4-IgG2融合蛋白）使用該$CD4^+$ T細胞增殖分析之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。名辭「SD （平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。

表 7. 例示性 $CD4^+$ T 細胞增殖分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50 （nM）	平均 Log IC50 （nM）	SD （平均 Log IC50） （nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	1.56	0.19	0.22
hCTLA-4-IgG2	2.24	0.35	0.28
LEA29Y-Ig	0.21[1]	-0.67	0.25
D3-02-IgG2	0.03	-1.56	NA
D3-03-IgG2	0.04[1,2]	-1.40	0.11
D3-04-IgG2	0.03[1,2]	-1.47	0.02
D3-06-IgG2	0.05[1]	-1.32	0.03
D3-11-IgG2	0.03[1,2]	-1.52	0.07
D3-12-IgG2	0.04[1,2]	-1.45	0.09
D3-14-IgG2	0.04[1,2]	-1.37	0.11
D3-15-IgG2	0.02[1,2]	-1.62	0.08
D3-17-IgG2	0.03[1,2]	-1.47	0.11
D3-20-IgG2	0.04[1,2]	-1.40	0.11
D3-27-IgG2	0.04[1,2]	-1.37	0.10
D3-29-IgG2	0.04[1,2]	-1.36	0.13
D3-31-IgG2	0.03[1,2]	-1.58	0.21
D3-34-IgG2	0.05[1,2]	-1.28	0.13
D3-39-IgG2	0.05[1,2]	-1.35	0.10
D3-50-IgG2	0.06[1,2]	-1.23	0.24
D3-52-IgG2	0.07[1,2]	-1.14	0.24
D3-53-IgG2	0.02[1,2]	-1.70	0.25
D3-54-IgG2	0.04[1,2]	-1.40	0.12
D3-56-IgG2	0.04[1,2]	-1.41	0.07
D3-62-IgG2	0.04[1,2]	-1.44	0.09
D3-65-IgG2	0.06[1,2]	-1.26	0.14

D3-69-IgG2	0.03[1,2]	-1.59	0.14
D3-70-IgG2	0.05[1,2]	-1.30	0.06
D3-71-IgG2	0.04[1,2]	-1.43	0.09
D3-72-IgG2	0.03[1,2]	-1.48	0.05
D3-73-IgG2	0.06[1,2]	-1.26	0.18
D3-75-IgG2	0.03[1,2]	-1.51	0.12
D2-IgG2	0.03[1,2]	-1.52	0.18
D3-IgG2	0.04[1,2]	-1.45	0.17

表7中之上標註記如下：[1]與Orencia之統計差異為$p<0.05$，如以單因子ANOVA及事後比較Dunnett試驗測定。[2]與LEA之統計差異為$p<0.05$，如以單因子ANOVA事後比較Bonferroni試驗測定。包含D3-02突變CTLA-4 ECD之融合蛋白僅試驗一次，並因此無法進行統計比較。

統計分析顯示，在至少兩次不同分析中試驗並以上標註記（1）指明（參見表7）之所有突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆在強度上統計優於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較大能力，以在活體外之$CD4^+$ T細胞分析中壓抑或抑制T細胞之增殖）。該等以上標註記（2）指明者（參見表7）亦在強度上統計優於LEA29Y-Ig融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之$CD4^+$ T細胞分析中壓抑或抑制T細胞之增殖），如以上文所討論之單因子ANOVA及事後比較Dunnett及Bonferroni試驗測定。在包含經修飾之IgG1 Fc（如於Orencia®中）或野生型IgG2 Fc（如於hCTLA4-IgG2中）之人類CTLA-4-Ig融合蛋白間並無統計差異。此等發現說明，表7所示本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（其包含人類IgG2 Fc）與Orencia®或hCTLA-4-IgG2間之功能活性差異係CTLA-4 ECD區域中所為胺基酸變化（亦即，胺基酸取代）之直接結果。此等本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白與，例如，Orencia®（其包含經修飾之IgG1 Fc）間之功能活性差異並不係其個別Ig Fc多肽序列中差異之結果。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於

Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制CD86共刺激之較高能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法或應用中具有分別相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig融合蛋白（如，人類CTLA-4-IgG2融合蛋白（"hCTLA-4-IgG2"））之較高免疫抑制強度。在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之方法或應用中具有分別相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig （如，hCTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高能力而壓抑或抑制T細胞(如，人類T細胞)之CD86-中介性共刺激，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及/或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

實例7

使用人類PBMC增殖分析（回憶抗原刺激）而測量突變CTLA-4-Ig分子之生物活性

記憶T細胞之活化係自體免疫力之一重要態樣（Rogers N.J., et al. Eur. J. Immunol 35:2909-2919 （2005））。為測量突變CTLA-4-Ig蛋白在此態樣中之免疫抑制活性，茲使用PPD抗原刺激而發展周邊血液單核細胞（PBMC）增殖分析。

以等體積之PBS稀釋人血（由捐贈者計畫新鮮收集），再使用Histopaque （Sigma, #10771） Ficoll梯度，根據製造商之建議條件進行分級分離以分離PBMCs。以添加10% FBS（Hyclone #SV30014.03）及1x PSG （青黴素、鏈黴素及麩醯胺）（Invitrogen, #10378-016）之RPMI培養基（Sigma, #R8758）稀釋PBMCs，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入96孔培養盤（BD Biosciences, #353077）中。以該相同培養基系列稀釋試驗化合

物，並以四重試驗形式加入該等孔中。添加PPD抗原（取自結核桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*，Mycos, #P-1000-001）之純化蛋白衍生物）至5 μg/ml之終濃度以起始細胞增殖。在37°C下培育5 d後，以1 μCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE Healthcare, #TRK758-5MCI），再使該等試驗盤在37°C下培育額外18 hr。以細胞收集器（FilterMate Omnifilter-96 Harvester, Perkin Elmer），使用製造商之建議條件而收集細胞，並使用閃爍計數器（Wallac Trilux, #1450-421）測量^{3}H胸苷之納入。使用非線性回歸曲線擬合模式（S型劑量反應，可變斜率）及最小平方擬合法，以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據。茲報告IC_{50}（或"IC50"）參數及其相關之95%信賴區間。

圖8顯示取自涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組（亦即，D3-IgG2、D3-12-IgG2、D3-17-IgG2及D3-29-IgG2融合蛋白）之代表性PBMC增殖分析的細胞增殖曲線。其亦包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。該圖係^{3}H胸苷納入（cpm）對蛋白濃度（nM）之作圖。^{3}H胸苷納入（其係T細胞增殖程度之指標）係以標準技術測量。此等結果說明，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig蛋白之較高強度，以在活體外抑制或壓抑記憶T細胞之增殖（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig蛋白之較大能力，以在人類PBMC增殖分析（回憶抗原刺激）中，在活體外抑制或壓抑記憶T細胞之增殖）。

茲使用其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行此使用PPD抗原刺激之PBMC增殖分析。表8提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表8提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對控制組（Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白）使用該以回憶抗原刺激之PBMC增殖分析之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。名辭「SD

（平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。

表8. 使用PPD抗原刺激之例示性PBMC增殖分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50（nM）	平均 Log IC50（nM）	SD （平均 Log IC50） （nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	5.92	0.67	0.37
LEA29Y-Ig	0.31	-0.71	0.53
D3-IgG2	0.03	-1.49	NA
D3-12-IgG2	0.06	-1.27	0.17
D3-14-IgG2	0.07	-1.17	0.15
D3-17-IgG2	0.07	-1.24	0.25
D3-20-IgG2	0.13	-0.91	0.18
D3-27-IgG2	0.17	-0.84	0.30
D3-29-IgG2	0.07	-1.16	0.18
D3-34-IgG2	0.51	-0.29	NA
D3-50-IgG2	0.28	-0.55	NA
D3-53-IgG2	0.05	-1.29	NA
D3-54-IgG2	0.01	-2.00	NA
D3-56-IgG2	0.01	-1.92	NA
D3-69-IgG2	0.01	-2.00	NA
D3-71-IgG2	0.01	-1.87	NA
D3-75-IgG2	0.01	-2.02	NA
D3-76-IgG2	0.01	-1.89	NA

註記：表8中之名辭「NA」意謂「未取得」。

統計分析顯示，在所有試驗之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆在強度上統計優於Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白兩者，其$p < 0.05$，如分別以上文所討論之單因子ANOVA及事後比較Dunnett及Bonferroni試驗測定（亦即，突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在人類PBMC增殖分析（回憶抗原刺激）中，在活體外抑制或壓抑記憶T細胞之增殖）。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制記憶T細胞（如，人類記憶T細胞）增殖之較高能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法或應用中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig （如，人類

CTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高免疫抑制強度。在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之方法或應用中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高能力而壓抑或抑制記憶T細胞（如，人類記憶T細胞）之增殖，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及/或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

實例8

使用人類MLR（混合淋巴細胞反應）分析而測量突變CTLA-4-Ig分子之生物活性

CTLA-4-Ig以及其特定變體係試管中初級同種異體反應之強抑制劑（Vaughan, A. N. et al., J. Immunol. 165:3175-3181（2000）; Wallace P. M., et al., Transplantation 58:602-610（1994））。為在此等分析中測量突變CTLA-4-Ig蛋白之改良活性，茲發展出人類混合淋巴細胞反應（MLR）分析。

以等體積之PBS稀釋人血（由捐贈者計畫新鮮收集），再使用Histopaque（Sigma, #10771） Ficoll梯度，根據製造商之建議條件進行分級分離以分離PBMCs。以添加10% FBS（Hyclone #SV30014.03）及1x PSG（Invitrogen, #10378-016）之RPMI培養基（Sigma, #R8758）稀釋取自一捐贈者之PBMCs，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入96孔培養盤（BD Biosciences, #353077）中。對於取自取自一不同捐贈者之PBMCs以2500 rads進行輻射照射，以該相同培養基稀釋，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入該相同培養盤中。以該相同培養基系列稀釋試驗化合物，並以四重試驗形式加入該等孔中。在37°C下培育5 d後，以1 μCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE

Healthcare, #TRK758-5MCI)，再使該等試驗盤在37°C下培育額外18 hr。以細胞收集器（FilterMate Omnifilter-96 Harvester, Perkin Elmer），使用製造商之建議條件而收集細胞，並使用閃爍計數器（Wallac Trilux, #1450-421）測量^{3}H胸苷之納入。使用非線性回歸曲線擬合模式（S型劑量反應，可變斜率）及最小平方擬合法，以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據。茲報告IC50參數及其相關之95%信賴區間。

圖9顯示取自涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白D3-IgG2之代表性MLR增殖分析的細胞增殖曲線。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。該圖係^{3}H胸苷納入（cpm）對蛋白濃度（nM）之作圖。^{3}H胸苷納入（其係T細胞增殖程度之指標）係以標準技術測量。此等結果說明，D3-IgG2具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig蛋白之較高強度，以在活體外分析中抑制或壓抑T細胞之初級同種異體刺激（如，D3-IgG2具有大於Orencia®或LEA29Y-Ig蛋白之較大能力，以在活體外之MLR分析中抑制或壓抑T細胞增殖之初級同種異體刺激）。

茲對諸多其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行此MLR分析。表9提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表9提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對參照控制組（Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白）在該MLR分析中之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。名辭「SD （平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。示於表9之突變CTLA-4-Ig融合蛋白的平均IC50值低於Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白個別之平均IC50值。

在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其咸信在強度上優於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之強度的（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其咸信具有大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之MLR分析中

抑制或壓抑T細胞增殖之初級同種異體刺激）。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制T細胞（如，人類記憶T細胞）初級同種異體刺激之預期增強能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法或應用中具有相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高免疫抑制強度。

在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig （如，人類CTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高強度，以在活體外抑制或壓抑T細胞之初級同種異體刺激（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之MLR分析中抑制或壓抑T細胞增殖之初級同種異體刺激）。在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之方法或應用中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig融合蛋白之較大能力而壓抑或抑制T細胞（如，人類T細胞）之初級同種異體刺激，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及/或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

表 8. 例示性 NLR 分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50（nM）	平均 Log IC50（nM）	SD （平均 Log IC50） （nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	12.53	1.05	0.23
LEA29Y-Ig	0.92	-0.19	0.48
D3-IgG2	0.06	-1.26	NA
D3-12-IgG2	0.09	-1.11	0.34
D3-14-IgG2	0.08	-1.20	0.43

D3-17-IgG2	0.09	-1.15	0.43
D3-20-IgG2	0.14	-1.11	0.64
D3-27-IgG2	0.13	-1.29	0.86
D3-29-IgG2	0.11	-1.14	0.54
D3-34-IgG2	0.10	-1.09	0.39
D3-53-IgG2	0.02	-1.64	0.11
D3-54-IgG2	0.07	-1.13	NA
D3-56-IgG2	0.06	-1.23	NA
D3-69-IgG2	0.04	-1.41	NA
D3-71-IgG2	0.05	-1.32	NA
D3-75-IgG2	0.08	-1.11	NA
D3-76-IgG2	0.08	-1.11	NA

註記：表9中之名辭「NA」意謂「未取得」。

實例9

可如下而以可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白治療罹患類風濕性關節炎之成人病患。製備一種醫藥組合物，其包含可溶性之本發明突變CTLA-4-Ig融合以及醫藥可接受之賦形劑或載體（如，PBS）。例示性之可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含以一或多個雙硫鍵彼此連結之兩個相同單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含本發明之突變CTLA-4 ECD多肽，其包含選自SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列，在其C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。例示性之融合蛋白包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之多肽序列者。此等融合蛋白一般而言係以二聚體形式表現。該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為介於自約0.05 mg/ml至約200 mg/ml、自約1 mg/ml至約150 mg/ml、自約25 mg/ml至約120 mg/ml、自約1 mg/ml至約100 mg/ml、自約25 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約75 mg/ml、自約100 mg/ml至約150 mg/ml及其類似者。舉例而言，該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為約1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、15 mg/ml、25 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、

80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml或200 mg/ml。此種醫藥組合物之pH係約pH 4至約pH 10，包括，約pH 5至約pH 9、約pH 6.5至約pH 8.5，較佳者為約pH 6.0至pH 8.0、約6.5至pH 7.5或約pH 7.0至約pH 8.0。

該病患類風濕性關節炎之治療係藉著以靜脈或皮下注射而對該病患投與治療有效量之該突變CTLA-4-Ig（如，有效劑量）而進行。該注射位點可為，如，該病患之手臂、軀幹或腿。該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之有效劑量一般而言係，但不限於，如，自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg該成人病患體重，諸如，如，自約0.01-5.0 mg/kg、約0.01-3.0 mg/kg、約0.05-2.5 mg/kg、約0.1-2.0 mg/kg、約0.1-1.0 mg/kg、約0.01-0.05 mg/kg、約0.5-1.5 mg/kg、約1.0-4.0 mg/kg、約1.0-3.0 mg/kg、約1.0-2.0 mg/kg，其包括，但不限於，對該病患投與約0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/ml、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg或100 mg/kg該病患體重。或者，可使用述於上文「本發明之方法」章節之有效量或劑量或劑量範圍。該待投與之融合蛋白劑量係根據該融合蛋白之強度及/或該病患類風濕性關節炎之症狀或徵兆的嚴重性而判定。對於該病患所投與之總突變CTLA-4-Ig融合蛋白量可為，如，自約0.01 mg至約100 mg，一般而言係自約1 mg至100 mg、自約10 mg至100 mg、自約10 mg至約75 mg或自約10至約50 mg。對該病患所投與之醫藥組合物體積係根據該融合蛋白在該組合物中之濃度以及待投與之融合蛋白劑量而判定。就皮下注射而言，一般而言可以注射投與1至2毫升包含該融合蛋白之醫藥組合物。就靜脈注射而言，其可投與適當體積之包含該融合蛋白之醫藥組合物。

在起始劑量之注射後，可在，如，該起始投劑之1、2、3或4週後，經由皮下（如，s.c.注射）或靜脈內（如，i.v.注射）

而對該病患投與第二相同劑量之該融合蛋白。該投劑時程可為每兩週一劑、一劑/月、每兩個月一劑等，根據，如，該病患之病況而定。後續之投劑可隨需要而每四週或是以較高或較低之頻率進行投藥。投劑之頻率可取決於該病患之病況而各異，並可取決於該病患類風濕性關節炎症狀或徵兆之嚴重性。

在一例示性之態樣中，其係根據該病患之條件以及對該藥物之反應，隨需要而每週一次或每月一次，對罹患類風濕性關節炎之人類，以皮下注射，投藥足以提供約0.5 mg/kg體重之該融合蛋白二聚體劑量的包含本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（諸如，D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2等）以及醫藥可接受性賦形劑之醫藥組合物量。

在另一例示性之態樣中，其係根據該病患之條件以及對該藥物之反應，隨需要而每週一次或每月一次，對罹患類風濕性關節炎之人類，經由靜脈內而投藥足以提供約10 mg/kg體重之該融合蛋白二聚體劑量的包含本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（諸如，D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2等）以及醫藥可接受性賦形劑之醫藥組合物量。可使用標準之i.v.流程而進行此種投藥。舉例而言，可使該醫藥組合物結合另一液體而輸液進入該人類體內，諸如，無菌鹽水溶液、葡萄糖溶液或其他等滲溶液，經由標準之靜脈進入裝置而使用標準之連續靜脈滴液進行。

各個上述以s.c.或i.v.注射所進行之治療方法預期可減少或減輕該病患體內一或多種與類風濕性關節炎相關之徵兆、症狀或生物反應，諸如，如，發炎、關節壓痛、關節腫脹、疼痛、組織萎縮及僵硬。此種治療可降低該疾病在該病患體內之進一步進展，特別是在結締、肌肉及骨骼組織中。舉例而言，此種治療可降低該病患體內結締組織、萎縮肌肉組織、骨骼、關節、軟骨及/或脊柱及其類似者之損傷或惡化的進展。其他該疾病之臨床症狀，包括對於皮膚、中樞神經系統或器官所造成之損傷，亦可獲得減少或是減輕。此種治療亦可改善該病患之身體

機能。

實例10

可如下而以可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白治療正在進行用於預防器官移植排斥之維持治療的成人病患。製備一種醫藥組合物，其包含可溶性之本發明突變CTLA-4-Ig融合以及醫藥可接受之賦形劑或載體（如，PBS或其類似者）。例示性之可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含以一或多個雙硫鍵彼此連結之兩個相同單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含本發明之突變CTLA-4 ECD多肽，其包含選自SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列，在其C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。例示性之融合蛋白包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之多肽序列者。該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為介於自約0.05 mg/ml至約200 mg/ml、自約1 mg/ml至約150 mg/ml、自約25 mg/ml至約120 mg/ml、自約1 mg/ml至約100 mg/ml、自約25 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約75 mg/ml、自約100 mg/ml至約150 mg/ml及其類似者。舉例而言，該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為約1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、15 mg/ml、25 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml或200 mg/ml。此種醫藥組合物之pH係約pH 4至約pH 10，包括，約pH 5至約pH 9、約pH 6.5至約pH 8.5，較佳者為約pH 6.0至pH 8.0、約6.5至pH 7.5或約pH 7.0至約pH 8.0。

用於預防或壓抑器官移植排斥之維持治療係藉著以靜脈或皮下注射而對已接受器官移植（如，腎臟移植）之該病患投與治療有效量之該突變CTLA-4-Ig （如，有效劑量）而進行。該注射位點可為，如，該病患之手臂、軀幹或腿。該投藥之突變CTLA-4-Ig融合蛋白有效劑量一般而言係，但不限於，如，

自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg該成人病患體重，諸如，如，自約0.01-5.0 mg/kg、約0.01-3.0 mg/kg、約0.05-2.5 mg/kg、約0.1-2.0 mg/kg、約0.1-1.0 mg/kg、約0.01-0.05 mg/kg、約0.5-1.5 mg/kg、約1.0-4.0 mg/kg、約1.0-3.0 mg/kg、約1.0-2.0 mg/kg，其包括，但不限於，對該病患投與約0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/ml、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg或100 mg/kg該病患體重。或者，可使用述於上文「本發明之方法」章節之有效量或劑量或劑量範圍。該待投與之融合蛋白劑量係根據該融合蛋白之強度及/或該病患器官移植排斥之症狀或徵兆的嚴重性而判定。對於該病患所投與之總突變CTLA-4-Ig融合蛋白量可為，如，自約0.01 mg至約100 mg，一般而言係自約1 mg至100 mg、自約10 mg至100 mg、自約10 mg至約75 mg或自約10至約50 mg。對該病患所投與之醫藥組合物體積係根據該融合蛋白在該組合物中之濃度以及待投與之融合蛋白劑量而判定。該融合蛋白可在移植後之任何天數投與，如，移植後之第1、4、7、14、28、56、84天等。就皮下注射而言，一般而言可投與1至2毫升之該醫藥組合物。就靜脈注射而言，其可投與適當體積之包含該融合蛋白之醫藥組合物。

在起始劑量之注射後，可在，如，該起始投劑之1、2、3或4週後，經由皮下或靜脈內而對該病患投與第二相同劑量之該融合蛋白。該投劑時程可為每兩週一劑、一劑/月、每兩個月一劑等，根據，如，該病患之病況而定。後續之投劑可隨需要而每四週或是以較高或較低之頻率進行投藥，且如需要可以每月之基礎而繼續進行。投劑之頻率可取決於該病患之病況而各異，並可取決於該病患器官移植排斥症狀或徵兆之嚴重性。

此種治療預期可減少或減輕該病患體內一或多種與器官移植排斥相關之徵兆、症狀或生物反應，諸如，如，移植器官

之急性排斥、移植器官之慢性排斥、移植器官之功能降低、該病患體內血清肌酸酐含量之增加及/或T細胞進入該移植器官之較高浸潤情形。此種治療可降低該移植器官由該病患之免疫系統排斥之可能性。

實例11

突變CTLA-4-IgG2融合蛋白在大鼠體內之藥物動力評估

藥劑在對一活生物體進行外來投與之後之血清濃度會大量影響其治療功效，且其可由藥物動力學（PK）評估判定。在下列流程中，其在大鼠體內，相較於hCTLA-4-IgG2及Orencia®融合蛋白試驗物兩者，評估代表性突變CTLA-4-IgG2試驗物D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2及D3-75-IgG2之PK特性。該實驗設計、數據產生及釋意述於後文。

活體內研究設計

在至少5天之適應期後，使用重量相符之雄性Hans Wistar大鼠。根據其體重而計算個別動物之試驗物投劑體積，以使其皆接受1mg/kg之試驗物。因此，典型之150克（g）大鼠即接受150 μl之投劑體積，因每個試驗物皆係在PBS中以1mg/ml製備。以靜脈內（i.v.或IV）之團劑，或試劑藉由皮下（縮寫為"s.c."或"SC"）途徑，傳遞上述突變CTLA-4-IgG2試驗物、hCTLA-4IgG2或Orencia®融合蛋白之單一投藥。該試驗之大小足以進行每個時間點最少四次之300 μl血液取樣，同時限制自任何特定大鼠所取出之血液體積不超過其10%總血液體積。血液取樣之時程就i.v.及s.c.投藥而言分別為取樣前、取樣後5分鐘（min）、30 min、2小時（h）、4 h、8 h、1天（d）、2 d、3 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d及14 d，或是取樣後5 min、30 min、2 h、4 h、8 h、1 d、2 d、3 d、4 d、6 d、8 d、10 d,11 d、12 d、13 d、14 d 及15 d。自各個血液樣本中製備血清，並以ELISA

試驗以定量經投藥試驗物之存在。

PK ELISA法

使存在於該等血清樣本中之突變CTLA-4-IgG2、hCTLA-4IgG2或Orencia®融合蛋白與預先塗覆於微滴定盤上之人類CD80-小鼠IgG（如上所述）進行連結。藉由添加辣根過氧化酶（HRP）複合性山羊抗人類IgG（Jackson ImmunoResearch #109-035-098）而達成偵測。經由使用顯色性之HRP受質3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（TMB）添加過氧化氫（Kem-En-Tec #4390A）進行定量，添加0.2N硫酸（H_2SO_4）中止反應，再以分光光度計而在450 nm測量光學吸收。在添加至ELISA盤中前，將血清樣本預稀釋為1/20，以使該基質標準化至5%大鼠血清，並在5%大鼠血清中進一步稀釋，以產生總共八個稀釋物。對抗使用添加至5%大鼠血清中之相同試驗物的滴定而製備之標準曲線，定量各個經稀釋血清樣本之濃度。該標準曲線係介於自10至0.078 ng/ml，且其精確範圍係判定為自5%大鼠血清中背景值之兩倍至5 ng/ml。使用在5%大鼠血清中以該標準曲線精確範圍之高、中、低濃度所製備之相同試驗物的品管（QC），評估該標準曲線之品質。QC接受標準係使該觀察QC濃度為在該預期QC濃度之20%之內。藉由平均該等以該標準曲線精確範圍內之光學密度（ODs）而指定予稀釋物之濃度，產生個別未知血清樣本之濃度。使用至少4份個別血清樣本以計算各所列時間點之平均血清濃度。

PK參數

圖15A及15B顯示在大鼠體內，使用單一（A）靜脈（IV）團藥或（B）皮下（SC）注射形式，以1 mg/kg投與之Orencia®融合蛋白、hCTLA-4-IgG2及突變CTLA-4-IgG2融合蛋白的PK特性。誤差條代表平均值之標準差（SD）。虛線代表該ELISA之定量下限（在100%血清中~3 ng/ml之試驗物）。在試驗物於

時間0 h之投與後之各個所列時間點的平均血清濃度包含圖15中之半-log濃度-時間特性內容的數據點。

使用WinNonLin模式201 （i.v.-團藥輸入）或是模式200（血管外之輸入），分別針對該i.v. （IV）或s.c. （SC）途徑，使用平均血清濃度而產生PK參數。表10分別摘述s.c.及i.v.投藥途徑之重要PK參數。

表 10. 使用單一 I.V.或 S.C.團藥形式而以 1 mg/kg 對大鼠投藥之 Orencia® 融合蛋白、hCTLA-4-IgG2 及突變 CTLA-4-IgG2 融合蛋白之 PK 參數摘要

化合物	途徑	Cmax (ug/L)	T1/2 (h)	AUC (h*ng/L)	Cl (ml/h/kg)	Vz (ml/kg)
Orencia	SC	3.3	70.0	391	2.6	258.13
CTLA-4IgG2	SC	5.9	45.0	838	1.2	77.49
D3-29	SC	4.6	11.2	650	1.5	24.90
D3-54	SC	4.5	23.6	528	1.9	64.52
D3-56	SC	7.4	23.7	1049	1.0	32.67
D3-69	SC	6.0	28.1	967	1.0	41.97
D3-75	SC	9.0	56.4	1204	0.8	67.59
Orencia	IV	22.3	42.3	728	1.37	83.9
CTLA-4IgG2	IV	66.2	49.8	2483	0.40	29.0
D3-29	IV	43.0	33.0	912	1.10	52.2
D3-54	IV	20.6	39.4	1034	0.97	55.0
D3-56	IV	34.2	15.3	1822	0.55	12.1
D3-69	IV	81.9	83.0	2133	0.47	56.1
D3-75	IV	30.1	65.4	2326	0.43	40.5

Cmax係指試驗物之最大血清濃度。終期半生期值（T1/2）係在該濃度-時間特性測定之終期中，該試驗物在血清中之濃度減少一半所需之以小時計之時間。血清濃度-時間曲線下之面積（AUC）係使用梯形規則而自時間零點至無限定量。清除值（Cl）係使用方程式劑量/AUC計算，而終期之分布體積（Vz）則係使用方程式Cl/k計算。

各化合物之生物可利用性因子（F）示於表11，且係藉由計算皮下途徑之AUC/靜脈內途徑之AUC而判定。

表 11. Orencia®融合蛋白、hCTLA-4-IgG2、D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2 及 D3-75-IgG2 融合蛋白之生物可利用性比較

化合物	生物可利用性
Orencia	0.54
CTLA-4IgG2	0.34
D3-29	0.71
D3-54	0.51
D3-56	0.58
D3-69	0.45
D3-75	0.52

儘管具有不同之IgG架構，人類CTLA-4IgG2及Orencia®融合蛋白展示類似之PK特性，其說明，當功能域係恆定時，此等個別試驗物中之人類IgG2及突變人類IgG1 Fc部分具有相當之PK活性。藉由推論，突變CTLA-4-IgG2融合蛋白相較於Orencia®融合蛋白在PK特性上之任何變化因此應可歸因於功能域中之差異而非Fc部分。

就各個突變突變蛋白而言，其移除係緩慢者，如以該長半生期值及曲線下之大面積而建議。相較於Orencia®融合蛋白（其在以SC或IV途徑投與時分別具有70.0或42.3小時之半生期），其以SC投劑之半生期係介於自11.2至56.4 hr，且以IV投劑係自15.3至83.0小時(h)。突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之AUC值平均優於Orencia®融合蛋白。在SC投劑後，其平均值係879.5 +/- 281.6 h*kg*ng/L/mg （相較於SC Orencia®融合蛋白之391h*kg*ng/L/mg ），而IV投藥則產生1645.5 +/- 641.1h*kg*ng/L/mg之AUC值（相較於IV Orencia®融合蛋白之728h*kg*ng/L/mg)。

兩種投藥途徑之分布體積皆為相似，其中突變CTLA-4-IgG2融合蛋白係分布至血清之外但在血管外液體中，如以44.8 ml/kg之平均值所建議，其係高於30 ml/kg之血漿參照體積，且係在標準大鼠之300 ml/kg胞外液體參照限制之內

（Davies, B. et al., Pharm. Res. 10（7）:1093-95 （1993））。

大部分突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之生物可利用性亦為相似，其平均值為0.6+/- 0.1 （相較有利於Orencia®融合蛋白之0.53生物可利用性）。

最後，相較於Orencia®融合蛋白，突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之Cmax一般而言係較高。相較於Orencia®融合蛋白（其在以SC或IV途徑投與時分別具有3.3或22.3 ug/L之Cmax值），其以SC投劑之Cmax值係介於自4.5至9.3ug/L，且以IV投劑係自20.6至81.9 ug/L。

整體言之，該PK數據顯示，在經由SC或IV途徑而以1mg/kg對大鼠投與時，所有經評估之突變CTLA-4-IgG2融合蛋白一般而言具有相對Orencia®融合蛋白之非較差PK特性，且當功能域係恆定時，IgG1或IgG2 Fc部分係為相當。

實例12

此實例敘述創造穩定轉染細胞系以表現本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，使用可用於進行該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之慣常實驗室規模製備之細胞系進行，並自該細胞表現培養基中純化該突變CTLA-4-Ig融合蛋白。儘管此實例特定敘述一種用以創造穩定轉染之CHO-K1細胞系以表現D3-54-IgG2融合蛋白之方法，使用此種細胞以進行實驗室規模製備並自培養基中純化該蛋白，本文所述之方法可以任何本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白及/或上文所揭示之任何適當細胞系而使用。

<u>創造穩定轉染細胞系</u>

材料

<u>CHO-K1天然（未轉染）細胞</u>：將可適應化學限定培養基中之無血清懸浮生長的CHO-K1細胞（細胞ID: M4-PeM-0436-112-01）貯存在液態氮蒸汽相中（Dewar

MVE1536P）。解凍一小瓶之M4-PeM-0436-112-01，並在搖瓶中以CD OptiCHO™培養基（Invitrogen, #12681）進行培養。該等培養物可提供用以進行轉染之細胞以及用以進行生長及選殖之條件培養基。所有之培養物皆係在37 ℃、5% CO_2下生長。

質體：將編碼融合人類IgG2a Fc區域之D3-54突變CTLA-4 ECD的DNA插入CET1019AS UCOE載體（Millipore）中，並使用該所得之質體CET1019AS-D3-54-IgG2進行所有之轉染。

細胞培養基：在所有培養物中使用添加2% v/v 200 mM L-麩醯胺（Invitrogen #25031）之CD Opti-CHO （Invitrogen #12681）化學限定無動物組成份培養基。

條件培養基：條件培養基係藉著在CD Opti-CHO培養基中培養母CHO-K1細胞系而取得。在細胞計數≥ 5 x 10^5細胞/ml時，離心該細胞培養物，並對該條件培養基上清液進行無菌過濾。每天新鮮製備條件培養基以進行使用或是貯存在2-8℃下最多7天。

50%條件培養基：使條件培養基（上述）結合等體積之新鮮細胞培養基；在其使用之每天新鮮製備。

分析方法

細胞計數及存活性係以Cedex或Cedex HiRes細胞計數器（Innovatis）進行。

對於表現該突變CTLA-4-Ig融合蛋白（D3-54-IgG2）之純系的初始篩選係以ELISA進行。以hCD80-小鼠Ig融合蛋白隔夜塗覆ELISA盤。第二天，以二重分析之方式，使用50-及200-倍之稀釋物，將待分析之樣本轉移至該等ELISA盤中。在兩小時之共置後，加入抗-人類IgG-HRP抗體，並進行共置30分鐘。以TMB對該等試驗盤進行顯影，並在450nm下視讀。報導粗光學密度（OD）。

D3-54-IgG2融合蛋白之定量測定係使用Poros A/20管柱

（ABI # 1-5024-12）而以蛋白A HPLC法進行。使用兩種緩衝液：緩衝液A：50 mM磷酸，150 mM氯化鉀，pH 7.6 ± 0.1，以及緩衝液B：50 mM磷酸，150 mM氯化鉀，pH 2.5 ± 0.1。兩種緩衝液皆額外添加5%異丙醇。平衡及樣本注射後之清洗係以42%緩衝液A及58%緩衝液B （pH 6.5）進行。溶析係使用1分鐘內之12%緩衝液A及88%緩衝液B進行。

流程

使用於創造用以進行D3-54-IgG2融合蛋白GMP製備之穩定細胞系的天然黏附CHO-K1細胞適應進行化學限定CD OptiCHO™培養基中之懸浮生長。解凍一小瓶之此等天然CHO-K1細胞，並使其在含有CD OptiCHO™培養基之125 ml搖瓶中生長至5 x 10^5個活細胞/ml之密度。使2 x 10^6個活細胞再懸浮於400 µl之50%條件培養基中，並在小管中使其與20 µg之質體DNA （D3-54-IgG2於CET1019AS UCEO載體中）結合。使用Gene Xcell Pulser （BioRad），以320伏特（V）及15毫秒（ms）之方波脈衝長度進行電穿孔。進行二重實驗之轉染，並接著集合該等細胞。將該等集合之細胞移至含有5 ml之50%條件培養基的T-25燒瓶中，並進行培育兩天。

將經轉染之細胞直接分配至96孔試驗盤中進行選殖，或是以抗生素選擇進行培養，直到取得穩定之集合物為止，再接著分配至96孔試驗盤中。在電穿孔後兩天，以含有8 µg/ml嘌呤黴素以產生選擇壓力之條件培養基將該培養物稀釋至1250細胞/ml。以每孔200 µl （250細胞/孔）將該等細胞分配至96孔試驗盤中。培育該等試驗盤約10天以殺死未轉染及瞬時轉染之細胞。在10-12天後，目視檢驗每一試驗盤中之每一孔，以辨識具有單一純系之孔。其後再次檢驗此等孔，以確認其含有適於在24孔試驗盤中進行擴增之單一、健康純系。

在電穿孔後兩天，離心該培養物，再使其再懸浮於含有7 µg/ml嘌呤黴素以產生選擇壓力之50%條件培養基中。亦以相

同培養基中之未轉染細胞接種控制組燒瓶。根據進行中之最適化研究，在3天後將嘌呤黴素之濃度增加至8 μg/ml。在控制組燒瓶中之所有細胞死亡時，於選擇10-12天後產生穩定之集合物。以蛋白A HPLC確認該穩定集合物中之產物表現，而該培養物之存活率經確認為> 95%。以不含嘌呤黴素之條件培養基系列稀釋該等細胞直到3.8細胞/ml之終密度。以每孔200 μl（75細胞/盤或0.8細胞/孔）將該等細胞播種於96孔試驗盤中。

在一天後，目視檢驗每一試驗盤中之每一孔，以辨識具有單一細胞或純系之孔。第二天，選擇具有2-4個細胞之單一純系之孔。排除任何具有超過兩個純系之孔。由第二操作員確認該等選擇。其後再次檢驗該等孔，以確認其含有適於在24孔試驗盤中進行擴增之單一、健康純系。

將取自96孔試驗盤之細胞在含有每孔1 ml條件培養基（含8 μg/ml嘌呤黴素）之24孔試驗盤中進行擴增。將取自該等96孔試驗盤之具有單一純系之所選孔的全部內含物移至24孔試驗盤之個別孔中。自該24孔試驗盤之各個新孔中取出200 μl以清洗該96孔試驗盤之對應孔，接著再移回。為進行備用，將200 μl含有8 μg/ml嘌呤黴素之條件培養基加回該96孔試驗盤之各孔中。

1-3天後，自該等24孔試驗盤之各孔中取樣，並以ELISA試驗D3-54-IgG2之表現。根據該等粗ELISA OD值以及適當生長之表現，選擇純系進行進一步之擴增。

使根據ELISA及所觀察到之生長結果的首選35-40個純系在含有5 ml條件培養基（含8 μg/ml嘌呤黴素）之T-25燒瓶中進行擴增。將取自該等24孔試驗盤之各個所選孔的全部內含物移至個別之T-25燒瓶中。以該相同培養基清洗該等孔中之殘餘細胞，並加至對應之T-25燒瓶中。為進行備用，將1 ml含有8 μg/ml嘌呤黴素之條件培養基加回該24孔試驗盤之各孔中。

藉著選擇具有最高產率之純系而進一步減少純系數目。以1-2 x 10^5個活細胞/ml之密度使細胞再懸浮於新鮮培養基中，並

播種至T25燒瓶（5 ml培養物）或125 ml搖瓶（12 ml培養物）中。使該等培養物進行培育22-24小時，並接著進行終細胞密度及存活性測定，接著取樣而以蛋白A HPLC進行產物濃度測定。產率係藉著使該所生產蛋白之總量除以該燒瓶中活細胞之總數，再除以培養持續時間而計算。將該等單位轉化為每天每細胞之皮克（picograms）數或"pcd"。根據其pcd值而排序純系，但略去並未顯示顯著生長之純系。使該等首選純系在125 ml搖瓶中進行擴增，以進行冷凍保存以及生長及生產之進一步評估。

將待進行進一步評估之純系以1 x 10^5個活細胞/ml之密度播種於250 ml搖瓶中之50 ml新鮮培養基中。當細胞密度到達1 x 10^6個活細胞/ml時，使該培養物傳代至新搖瓶中，同樣係以1 x 10^5個活細胞/ml之密度加至50 ml新鮮培養基中。再次重複該傳代一次。在此第三傳代之過程中，每日對該培養物取樣以進行細胞計數、存活性及產物濃度測定（以蛋白A HPLC進行）。

根據生長及特定生產率而選擇表現D3-54-IgG2融合蛋白之首選純系進行次選殖。如上節針對穩定集合物所述者進行限制稀釋而進行次選殖，除外在任何時間皆不使用嘌呤黴素。純系之擴增、篩選及評估亦如上所述進行。

使所選之次純系在搖瓶中重複傳代約90天以評估生產穩定性。在各傳代時，使細胞以1 x 10^5個活細胞/ml之密度播種於125 ml搖瓶中之25 ml新鮮培養基中。每3-4天傳代該等培養物。在各次傳代之前，測量細胞之密度及存活性，接著取樣而以蛋白A HPLC進行產物濃度測定。

自以pcd值排序之時至安定性評估中之不同時點，將所選之純系及次純系以冷凍保存。冷凍培養基係以90%生長培養基及10% DMSO （Sigma）新鮮製備。使取自搖瓶培養物之細胞進行離心，再以介於2-10 x 10^6個細胞/ml之密度再懸浮於冷凍培養基中。將該細胞懸浮液以1 ml之小份分配至凍存管中。將該等凍存管至於異丙醇冷凍容器中，並在–80°C下隔夜貯存。

在第二天將該等經冷凍之小瓶移至液態氮蒸汽相貯槽中。

突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之製備

解凍含有1 ml體積表現D3-54-IgG2融合蛋白之CHO-K1細胞的凍存管，並使其在37°C及5% CO_2下，在含有CD OptiCHO™培養基之125 ml搖瓶中，生長至5 x 10^5個活細胞/ml之密度。結合數個燒瓶而以1-2 x 10^5個細胞/ml之密度接種波浪袋(wave bag)中之5或10 L體積CD OptiCHO™培養基(含4 mM麩醯胺)。使該波浪袋培養物維持在添加5% CO_2之37°C恆溫培育箱中，購自Sartorius Stedim Biotech之裝置的震盪平台設定為18-22 rpm及8度之角度。每日對該培養物取樣以測定細胞計數、存活性、營養素含量、代謝特性及突變CTLA-4-IgG2（亦即，D3-54-IgG2）之表現量（以蛋白A HPLC分析進行）。當存活率降至~50%時（一般而言係接種後9-11天）收集細胞。使用深層過濾及無菌過濾之組合進行過濾而澄清該細胞培養物質，並直接使用進行進一步之處理或是貯存在2-8 °C下。

突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之純化

使用AKTA Explorer HPLC系統（GE Healthcare），以蛋白-A親和層析純化突變CTLA-4-IgG2融合蛋白（D3-54-IgG2）。使突變CTLA-4-Ig融合蛋白（D3-54-IgG2）在PBS緩衝液（Invitrogen）中連結MabSelect Protein A FF管柱（GE Healthcare, #17-5079-01)(以~10mg/ml層析培養基加樣)，以該相同緩衝液清洗，以100 mM檸檬酸緩衝液（pH 4.0）溶析，再接著加入1/10體積之2M Tris鹼而進行中和。使用切向流過濾（TFF）系統，以滲濾（diafiltration）進一步處理該經蛋白A純化之樣本，使緩衝液交換為20mM Tris-Cl, pH 7.5。

在Q-Sepharose管柱上，以~10mg/ml之加樣密度加樣，使用陰離子交換層析而進一步純化該經緩衝液交換之蛋白樣本。使用20管柱體積（CV）的20 mM Tris-Cl, pH 7.5中自

0-500mM NaCl之線性NaCl梯度溶析連結之蛋白。收集主要峰值級份，並測量280 nm之吸收值而測定濃度。

以SDS-PAGE分析確認蛋白純度，並使用尺寸排除-HPLC法測定單體含量。將樣本以小份貯存在2-8°C下或是在-20°C下於使用前長期貯存。

在前述之發明已為明確及理解而以部分細節敘述之同時，熟習技藝者將可明瞭，由此揭示內容之閱讀，可在不偏離本發明真正範圍之情形下，進行各種形式及細節之變化。咸可明瞭，本文所述之材料、實例及具體實例僅係為說明目的且並不欲進行限制，且根據其之各種修飾或變化將可對熟習技藝者建議，並包括於本申請案之精神及範圍以及附呈申請專利範圍之範圍中。本文所提及之所有出版品、專利申請案、專利或其他文件皆就所有目的而以其全文併入作為參考，其範圍如同各個此等個別之出版品、專利、專利申請案或其他文件皆個別具體指明為就所有目的而以其全文併入作為參考並以其全文述於本文之中。在衝突之情形下，本申請案（包括定義）將具有支配力。

【圖式簡單說明】

圖1係質體表現載體pCDNA突變CTLA-4-Ig之圖示，其包含編碼突變CTLA-4-Ig融合蛋白之核苷酸序列。在圖1中，各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含在其C-端融合人類IgG2（hIgG2） Fc多肽之N-端的本發明突變CTLA-4 ECD多肽。

圖2A-2D分別係例示性hCD80-Ig、hCD86-Ig、LEA29Y-Ig及hCTLA-4-IgG2融合蛋白之圖示。其圖示各個融合蛋白之信號肽、胞外域（ECD）、連接子（如有任何存在）及Ig Fc域。其顯示存在於該信號肽、ECD、連接子（如有任何存在）及Ig Fc接合處之胺基酸殘基。各個融合蛋白之信號肽一般而言會在加工過程中受到切割，並因此該分泌（成熟）融合蛋白一般而

言並不含有該信號肽序列。圖2D提出人類CTLA-4-IgG2（“hCTLA-4-IgG2”）融合蛋白之圖示，其包含人類CTLA-4胞外域（“hCTLA-4 ECD”），其以其C-端共價融合人類IgG2多肽之N-端。此hCTLA-4-IgG2融合蛋白之預測多肽序列示於SEQ ID NO:161，並包含下列節段：hCTLA-4信號肽（胺基酸殘基1-37）、hCTLA-4 ECD多肽（胺基酸殘基38-161）及人類IgG2 Fc多肽（胺基酸殘基162-389）。在該hCTLA-4 ECD多肽之C-端及該人類IgG2 Fc之N-端間並未包括連接子（如，無胺基酸殘基）。該人類IgG2 Fc多肽包含人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域。在圖2D中，其顯示此等不同節段間接合處之胺基酸殘基。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該hCTLA-4 ECD多肽之首五個及末五個胺基酸殘基及該人類IgG2 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。

該信號肽一般而言會在加工過程中受到切割，並因此該hCTLA-4-IgG2之分泌融合蛋白（成熟融合蛋白）一般而言並不含有該信號肽序列。此hCTLA-4-IgG2融合蛋白之成熟或分泌形式的多肽序列示於SEQ ID NO:162。該hCTLA-4 ECD多肽之序列係SEQ ID NO:162之胺基酸殘基1-124，且該人類IgG2 Fc多肽之序列包含SEQ ID NO:162之胺基酸殘基125-352。在另一態樣中，此成熟hCTLA-4 Ig並不包括該C-端離胺酸（K）殘基，並因此包含SEQ ID NO:162之胺基酸殘基1-351。

該成熟hCTLA-4-IgG2融合蛋白（其具有總共352個胺基酸）包含示於SEQ ID NO:160之全長WT hCTLA-4蛋白多肽序列之胺基酸殘基38-389，並係以胺基酸殘基序列：甲硫胺酸-組胺酸-纈胺酸-丙胺酸起始。如需要，該成熟形式之胺基酸可以該Met-His-Val-Ala序列之Met起始編號，將Met指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-124之胺基酸殘基），如在SEQ ID NO:162中者。成熟hCTLA-4IgG2係一般而言用於前文所述實例分析中之融合蛋白形式，除非另有明示。編碼hCTLA-4-IgG2融合蛋白（其包含融合hIgG2 Fc多肽之hCTLA-4 ECD）之DNA

序列示於SEQ ID NO:163。

圖3表示下列蛋白之SDS/PAGE分析：各種質量之分子量標記物（千道耳吞（kDa））（第1道）；根據純系D3之例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D3-IgG2）（第2道）；根據純系D4之例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D4-IgG2）（第3道）；及Orencia®（Abatacept）融合蛋白（第4道）（Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ）。

圖4表示例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D3-IgG2）由SEC分析取得之溶析特性，其說明本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白在自瞬時轉染之COS細胞純化時為尺寸上勻質者。

圖5顯示針對下列融合蛋白與hCD86-Ig之結合的典型BiacoreTM分析：Orencia®融合蛋白、LEA29Y-Ig及D3-IgG2。該分析之解離相起始於以箭頭標記之時間。該Orencia®融合蛋白（其係由融合突變hIgG1 Fc域多肽之野生型人類CTLA-4 ECD多肽構成）可有效作為野生型人類CTLA-4-Ig控制組。本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（諸如，D3-IgG2，其具有大於Orencia®融合蛋白之較高CD86-Ig結合性）具有小於Orencia®融合蛋白之離開CD86-Ig的較慢解離速率。

圖6係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（D3-04-IgG2、D3-11-IgG2、D3-12-IgG2、D3-14-IgG2）之PBMC增殖抑制分析（使用抗-CD3抗體刺激）結果的圖示。此等分析顯示，相較於Orencia®及LEA29Y-Ig，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白顯著較為強效而可在活體外抑制T細胞增殖。

圖7係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之$CD4^+$ T細胞增殖抑制分析（使用抗-CD3刺激及hB7.2-依賴性共刺激）的圖示。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。

圖8係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之

PBMC增殖抑制分析（使用PPD抗原刺激）的圖示。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig作為控制組以進行比較。

圖9係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白D3-IgG2之單向混合淋巴細胞反應（MLR）增殖抑制分析的圖示。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。

圖10係顯示例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之結構的圖式。其圖示兩個相同之單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其各包含一個成熟突變CTLA-4 ECD，其在C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。各個人類IgG2 Fc多肽包括IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域。其亦顯示存在於該ECD與Ig Fc多肽接合處之例示性胺基酸殘基。根據該突變CTLA-4 ECD多肽序列及/或Ig多肽序列，位在此等組成份接合處之胺基酸殘基可各有不同。此種二聚體融合蛋白係由至少一個雙硫鍵之形成而產生，該雙硫鍵係在位於該兩個單體中類似位置之半胱胺酸殘基間形成。該等潛在涉及兩單體間雙硫鍵形成之半胱胺酸（C）殘基以星號標記。各個單體融合蛋白之信號肽一般而言係在細胞加工過程中受到切割，並因此該分泌（成熟）融合蛋白一般而言並不包括該信號肽序列。

圖11係涉及hCTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白之CD4+ T細胞增殖抑分析（使用抗-CD3刺激及hB7.2-依賴性共刺激）的圖示。

圖12A-12F表示野生型人類CTLA-4胞外域之多肽序列（在該圖中稱為"hCTLA4ECD"）、該LEA29Y多肽之多肽序列（在該圖中稱為"LEA29YECD"）、以及本發明突變CTLA-4 ECD多肽之多肽序列的排比。此等本發明突變CTLA-4 ECD多肽之純系名稱示於左側。與野生型人類CTLA-4 ECD多肽中者相同之胺基酸殘基以句點（.）指明。

圖13表示BLOSUM62矩陣。

圖14A-14D顯示兩胺基酸序列之例示性排比及由人工計

算所判定之排比評分。

圖15A-15B顯示在大鼠體內，使用單一（A）靜脈（IV）團藥或（B）皮下（SC）注射形式，以1 mg/kg投與之Orencia®融合蛋白、人類CTLA-4-IgG2及代表性本發明突變CTLA-4-IgG2融合蛋白的藥物動力學（PK）特性。

序列表

<110> Maxygen, Inc.
Karrer, Erik E.
Paidhungat, Madan M.
Bass, Steven H.
Neighbors, Margaret
Punnonen, Juha
Chapin, Steven J.
Viswanathan, Sridhar
Larsen, Brent R.

<120> 免疫抑制性多肽及核酸

<130> 0364.210TW

<150> US 12/251,960
<151> 2008-10-15

<150> PCT/US08/79981
<151> 2008-10-15

<150> US 60/984,631
<151> 2007-11-01

<150> US 61/051,215
<151> 2008-05-07

<160> 228

<170> FastSEQ for Windows 4.0版

<210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-1

<400> 1

Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
1				5				10						15	
Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Asn	Glu	Ile

```
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-2

<400> 2

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 3
<211> 124

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-3

<400> 3
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-4

<400> 4
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

```
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 5
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-5

<400> 5

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 6
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-6

<400> 6

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-7

<400> 7

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-8

<400> 8
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-9

<400> 9
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro

```
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 10
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-11

<400> 10

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-12

<400> 11

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 12
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-14

<400> 12

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
```

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 13
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-15

<400> 13
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 14
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-16

<400> 14
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 15
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-17

<400> 15

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 16
<211> 124
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-19

<400> 16
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 17
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-20

<400> 17
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

```
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-21

<400> 18

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 19
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-22

<400> 19

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 20
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-23

<400> 20

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 21
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-24

<400> 21
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 22
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-25

<400> 22
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60

```
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 23
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-26

<400> 23

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 24
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-27

<400> 24
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 25
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-28

<400> 25
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 26
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-29

<400> 26
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 27
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-30

<400> 27
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

```
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 28
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-31

<400> 28

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 29
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-32

<400> 29
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 30
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-33

<400> 30
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95

```
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 31
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-34

<400> 31

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 32
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-39

<400> 32

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
```

```
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 33
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-50

<400> 33

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 34

<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-52

<400> 34
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 35
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-53

<400> 35
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 36
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-54

<400> 36
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 37
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-55

<400> 37

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 38
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-56

<400> 38

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-57

<400> 39
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 40
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-58

<400> 40
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45

```
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 41
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-59

<400> 41

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 42
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-60

<400> 42
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 43
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-61

<400> 43
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 44
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-62

<400> 44
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 45
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-63

<400> 45
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val

```
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 46
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-64

<400> 46

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 47
<211> 124

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-65

<400> 47
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 48
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-66

<400> 48
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

```
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-68

<400> 49

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-69

<400> 50

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 51
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-70

<400> 51

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-71

<400> 52
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 53
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-72

<400> 53
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro

```
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 54
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-73

<400> 54

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 55
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-74

<400> 55

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-75

<400> 56

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
```

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 57
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-76

<400> 57
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1

<400> 58
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Thr Glu Ile
20 25 30

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 59
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1T

<400> 59

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 60
<211> 124
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D2

<400> 60
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1   5   10   15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Asn Glu Ile
            20   25   30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35   40   45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50   55   60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65   70   75   80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85   90   95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100   105   110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115   120

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3

<400> 61
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1   5   10   15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20   25   30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35   40   45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50   55   60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65   70   75   80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 62
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D4

<400> 62
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ser Pro Gly Lys Ala Asp Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Ser Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Glu Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Thr Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 63
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D5

<400> 63
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 64
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D6

<400> 64

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 65
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D20

<400> 65
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1   5   10   15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Thr Glu Ile
            20   25   30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35   40   45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50   55   60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65   70   75   80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85   90   95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100   105   110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115   120

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D21

<400> 66
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1   5   10   15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ala Pro His Asn Ala Asp Glu Ile
            20   25   30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Ser Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35   40   45
Ala Met Thr Tyr Met Glu Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50   55   60

Thr Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 67
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D23

<400> 67
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ala Pro His Asn Ala Ala Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 68
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D24

<400> 68

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 69
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D26

<400> 69

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Glu Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Val Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
```

115 120

<210> 70
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D27

<400> 70
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Glu Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Val Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 71
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D28

<400> 71
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

```
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 72
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D29

<400> 72

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Lys Ala Asp Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 73
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D31

<400> 73
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Asn Ala Asp Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Val Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Lys Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 74
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-12-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 74
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95

```
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 75
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-14-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 75
```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 76
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-17-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 76

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
```

```
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 77
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-20-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 77

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
```

```
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 78
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-27-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 78

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
```

```
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 79
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-29-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 79
```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 80
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-1 編碼序列

<400> 80
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 81
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-2 編碼序列

<400> 81
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccacc gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 82
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-3 編碼序列

<400> 82

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 83
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-4 編碼序列

<400> 83
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 84
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-5 編碼序列

<400> 84
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctgcg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 85
<211> 372

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-6 編碼序列

<400> 85
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga tgggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 86
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-7 編碼序列

<400> 86
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 87
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-8 編碼序列

<400> 87
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180

cttgacgatt ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 88
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-9 編碼序列

<400> 88
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 89
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-11 編碼序列

<400> 89
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 90
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-12 編碼序列

<400> 90
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 91
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-14 編碼序列

<400> 91
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 92
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體

<400> 92
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360

cctgattctg at 372

<210> 93
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-16 編碼序列

<400> 93
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 94
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-17 編碼序列

<400> 94
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 95
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-19 編碼序列

<400> 95
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 96
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-20 編碼序列

<400> 96
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 97
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-21 編碼序列

<400> 97
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 98

<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-22 編碼序列

<400> 98
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 99
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-23 編碼序列

<400> 99
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 100
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-24 編碼序列

<400> 100
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120

ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 101
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-25 編碼序列

<400> 101
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 102
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-26 編碼序列

<400> 102
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 103
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-27 編碼序列

<400> 103
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 104
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-28 編碼序列

<400> 104
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
ctcgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 105
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-29 編碼序列

<400> 105
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300

ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 106
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-30 編碼序列

<400> 106
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 107
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-31 編碼序列

<400> 107
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 108
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-32 編碼序列

<400> 108
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 109
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-33 編碼序列

<400> 109
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 110
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-34 編碼序列

<400> 110
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 111
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-39 編碼序列

<400> 111
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 112
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-50 編碼序列

<400> 112
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 113
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-52 編碼序列

<400> 113
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60

tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 114
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-53 編碼序列

<400> 114
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 115
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-54 編碼序列

<400> 115
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 116
<211> 372
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-55 編碼序列

<400> 116
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 117
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-56 編碼序列

<400> 117
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 118
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-57 編碼序列

<400> 118
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240

ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 119
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-58 編碼序列

<400> 119
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 120
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-59 編碼序列

<400> 120
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 121
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-60 編碼序列

<400> 121
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 122
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-61 編碼序列

<400> 122
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 123
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-62 編碼序列

<400> 123
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 124
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-63 編碼序列

<400> 124
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctgcg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 125
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-64 編碼序列

<400> 125
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga tggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 126
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-65 編碼序列

<400> 126

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 127
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-66 編碼序列

<400> 127
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 128
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-68 編碼序列

<400> 128
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 129
<211> 372

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-69 編碼序列

<400> 129
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 130
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-70 編碼序列

<400> 130
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 131
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-71 編碼序列

<400> 131
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180

cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 132
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-72 編碼序列

<400> 132
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 133
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-73 編碼序列

<400> 133
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 134
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-74 編碼序列

<400> 134
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 135
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-75 編碼序列

<400> 135
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 136
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-76 編碼序列

<400> 136
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360

cctgattctg at 372

<210> 137
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1 編碼序列

<400> 137
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccacc gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 138
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1T 編碼序列

<400> 138
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 139
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D2 編碼序列

<400> 139
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactacc tgggtatggg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 140
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3 編碼序列

<400> 140
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 141
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D4 編碼序列

<400> 141
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatata gctcacccgg gaaagccgac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
tctagtcaag tcacagaagt ctgcgctatg acatacatgg agggagatga actaaccttc 180
cttgacgacc ccacctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgtcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggtttcgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 142

<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D5 編碼序列

<400> 142
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg catcccccgg aaaagccact gaagttagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 143
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D6 編碼序列

<400> 143
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg catcccccgg aaaagccact gaaattagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 144
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D20 編碼序列

<400> 144
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcccccca caaagccact gaaattagag tcacagtgct ccgccaggct 120

gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 145
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D21 編碼序列

<400> 145
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatt ccgccccca caacgccgac gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
tcttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg aagaagatga actcaccttc 180
ctcgacgacc ccacctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgtcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc tgggtttcgg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 146
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D23 編碼序列

<400> 146
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatt ccgccccca caacgccgcc gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 147
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D24 編碼序列

<400> 147
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 148
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D26 編碼序列

<400> 148
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgcgaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 149
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D27 編碼序列

<400> 149
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgcgaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300

ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 150
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D28 編碼序列

<400> 150
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggatcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 151
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D29 編碼序列

<400> 151
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccgat gaaattagag tcacagtcct ccgcaaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 152
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D31 編碼序列

<400> 152
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caacgccgat gaaatcagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacaagt caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 153
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-12-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 153
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cggaagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgcggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 154
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-14-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 154
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgcggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 155
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-17-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 155
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 156
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-20-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 156
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 157
<211> 1170

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-27-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 157
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 158
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-29-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 158
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420

ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 159
<211> 124
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 野生型人類 CTLA-4 ECD

<400> 159

Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
1				5				10					15		
Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val
		20					25					30			
Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys
	35					40					45				
Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser
50					55					60					
Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
65				70					75					80	
Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
			85					90					95		
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
		100					105					110			
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp				
	115					120									

<210> 160
<211> 223
<212> PRT

<213> 人類

<220>
<223> 野生型人類全長 CTLA-4

<400> 160

```
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1               5                  10                  15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
            20                  25                  30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
        35                  40                  45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65                  70                  75                  80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
                85                  90                  95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
            100                 105                 110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
        115                 120                 125
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
    130                 135                 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145                 150                 155                 160
Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
                165                 170                 175
Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
            180                 185                 190
Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
        195                 200                 205
Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
    210                 215                 220
```

<210> 161
<211> 389
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 WT 人類 CTLA4-IgG2 融合蛋白

<400> 161

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
130 135 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Asp Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
165 170 175
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
180 185 190
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
195 200 205
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
210 215 220
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
225 230 235 240
Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
245 250 255
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
260 265 270
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
275 280 285
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
290 295 300
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
305 310 315 320
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
325 330 335
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

340 345 350
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
355 360 365
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
370 375 380
Leu Ser Pro Gly Lys
385

<210> 162
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類成熟 CTLA4-IgG2 融合蛋白

<400> 162
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
115 120 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180 185 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195 200 205

```
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 163
<211> 1167
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CTLA4-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 163

```
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaagccac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcacaa 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
cttggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
```

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1167

<210> 164
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Orencia (R) (Bristol-Myers Squibb Co.)

<400> 164
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
115 120 125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
130 135 140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165 170 175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

225 230 235 240
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350
Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 165
<211> 394
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 LEA29Y-Ig 融合蛋白

<400> 165
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60
Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly
130 135 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser
165 170 175
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
180 185 190
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
195 200 205
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
210 215 220
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
225 230 235 240
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
245 250 255
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
260 265 270
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
275 280 285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
290 295 300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
325 330 335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
340 345 350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
355 360 365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
370 375 380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 166
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 成熟 LEA29Y-Ig 融合蛋白

<400> 166

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
115 120 125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
130 135 140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165 170 175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225 230 235 240
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 167
<211> 1182
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LEA29Y-Ig 融合蛋白編碼序列

<400> 167
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc atcccagttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaatatac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcacaa 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcattgacc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatcaggagc ccaaatcttc tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa 540
ctcctgggtg gatcgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 600
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 660
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 720
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 780
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 840
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 900
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 960
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1020
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1080
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1140
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1182

<210> 168
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LEA29Y ECD

<400> 168

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 169
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LEA29Y ECD 編碼序列

<400> 169

```
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg catccccccgg aaaatatact gaagttagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatatatga tgggcaacga actcaccttc 180
ctcgacgact caatttgcac aggtacctcc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at                                                     372
```

<210> 170
<211> 476
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 WT 人類 CD80-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 170

```
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 Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350
```

```
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 171
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 成熟 WT 人類 CD80-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 171

```
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
Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 172
<211> 1428
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CD80-人類 IgG1 融合蛋白編碼序列

<400> 172
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa cgaagcaaga gcattttcct 720
gataacgggg tgaccccaaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 780
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 840
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 900
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 960
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1020
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1080
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1140
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1200
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1320
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1428

<210> 173
<211> 726
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CD80 信號肽及 WT 人類 CD80 ECD 之編碼序列

<400> 173
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240

atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa cgaagcaaga gcattttcct 720
gataac 726

<210> 174
<211> 208
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> WT 人類 CD80 ECD

<400> 174

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> 175
<211> 329
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 預測全長 WT 人類 CD86

<400> 175

```
Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
 1               5                  10                  15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
            20                  25                  30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
        35                  40                  45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
    50                  55                  60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65                  70                  75                  80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
                85                  90                  95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
            100                 105                 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
        115                 120                 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
    130                 135                 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145                 150                 155                 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
                165                 170                 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
            180                 185                 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
        195                 200                 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
    210                 215                 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225                 230                 235                 240
Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
                245                 250                 255
```

Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
260 265 270
Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
275 280 285
Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
290 295 300
Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
305 310 315 320
Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
325

<210> 176
<211> 987
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全長 WT 人類 CD86 編碼序列

<400> 176
atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840
aaatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtgttt ttaaaagttc gaagacatct 960
tcatgcgaca aaagtgatac atgtttt 987

<210> 177
<211> 477
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 WT 人類 CD86-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 177

```
Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
 1               5                  10                  15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
            20                  25                  30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
        35                  40                  45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
    50                  55                  60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65                  70                  75                  80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
                85                  90                  95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
            100                 105                 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
        115                 120                 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
    130                 135                 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145                 150                 155                 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
                165                 170                 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
            180                 185                 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
        195                 200                 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
    210                 215                 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225                 230                 235                 240
Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320
```

```
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 178
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 成熟 WT 人類 CD86-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 178

```
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1               5                  10                  15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
            20                  25                  30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
        35                  40                  45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
    50                  55                  60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65                  70                  75                  80
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
                85                  90                  95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
```

100 105 110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160
Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 179
<211> 1431
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CD86-人類 IgG1 融合蛋白編碼序列

<400> 179
atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag gggtgacccc aaagagctgc gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 780
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 840
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 900
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 960
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1020
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1080
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1140
ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1200
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1260
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1320
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1380
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1431

<210> 180
<211> 220
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> WT 人類 CD86 ECD

<400> 180

```
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1               5                  10                  15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
            20                  25                  30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
        35                  40                  45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
    50                  55                  60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65                  70                  75                  80
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
                85                  90                  95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
            100                 105                 110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
        115                 120                 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
    130                 135                 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145                 150                 155                 160
Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
                165                 170                 175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
            180                 185                 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro
    210                 215                 220
```

<210> 181
<211> 105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CTLA-4 信號肽編碼序列

<400> 181

```
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgt                  105
```

<210> 182
<211> 35
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> WT 人類 CTLA-4 信號肽

<400> 182
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys
35

<210> 183
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽 （具C-端離胺酸） 之編碼序列

<400> 183
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

<210> 184
<211> 228
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽 （具C-端離胺酸）

<400> 184
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> 185
<211> 231
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 人類 IgG1 Fc 多肽

<400> 185

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 1               5                  10                  15
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            20                  25                  30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        35                  40                  45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    50                  55                  60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65                  70                  75                  80
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                85                  90                  95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        115                 120                 125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
    130                 135                 140
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145                 150                 155                 160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                165                 170                 175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            180                 185                 190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        195                 200                 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    210                 215                 220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 186
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變 IgG1 Fc 多肽

<400> 186

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser 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> 187
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 187
ctattgctac ggccgctatg gccmtkcacg tcgctcaacc agccgtcgta ctcgcgtcc 59

<210> 188
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 188
gtgatggtga tggtgtgcgg ccgcatcaga 30

<210> 189
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 189
aagctgtcac cggtggatcg atcccgaacc ctgccctgat tctgatgagc gcaaatgttg 60
tgtcgagtgc ccaccgt 77

<210> 190
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 190
cagaattcat tatttacccg gagacaggga gaggctcttc tg 42

<210> 191
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 191
ggaataccgg ttttttgtaa agccatgcac gtcgctcaac cagccgtcgt actc 54

<210> 192
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 192
ggcactcaga tctacgtcat cgatcccgaa 30

<210> 193
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CTLA-4 ECD 編碼序列

<400> 193
atgcacgtgg cccagcctgc tgtggtactg gccagcagcc gaggcatcgc cagctttgtg 60
tgtgagtatg catctccagg caaagccact gaggtccggg tgacagtgct tcggcaggct 120
gacagccagg tgactgaagt ctgtgcggca acctacatga tggggaatga gttgaccttc 180
ctagatgatt ccatctgcac gggcacctcc agtggaaatc aagtgaacct cactatccaa 240
ggactgaggg ccatggacac gggactctac atctgcaagg tggagctcat gtacccaccg 300
ccatactacc tgggcatagg caacggaacc cagatttatg taattgatcc agaaccgtgc 360
ccagattctg ac 372

<210> 194
<211> 672
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全長人類 CTLA-4 編碼序列

<400> 194
atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcagctga acctggctac caggacctgg 60
ccctgcactc tcctgttttt tcttctcttc atccctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120
gcccagcctg ctgtggtact ggccagcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180
gcatctccag gcaaagccac tgaggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc tgacagccag 240
gtgactgaag tctgtgcggc aacctacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300
tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcactatcca aggactgagg 360
gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgtacccacc gccatactac 420
ctgggcatag gcaacggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480
gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggt tgtttttta tagctttctc 540

ctcacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa gccctcttac aacaggggtc 600
tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660
cccatcaatt ga 672

<210> 195
<211> 288
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 預測全長人類 CD80

<400> 195

```
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> 196
<211> 867
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全長人類 CD80 編碼序列

<400> 196

```
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
agaagggaaa gtgtacgccc tgtataa                                    867
```

<210> 197
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-54-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 197

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
```

```
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 198

<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-56-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 198

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
```

```
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 199
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-69-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 199

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
```

```
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 200
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-75-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 200

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
```

```
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 201
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-54-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 201
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180

gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccatctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 202
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-56-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 202
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 203
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-69-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 203
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 204
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-75-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 204
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60

ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 205
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-12-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 205

Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
1				5				10					15		
Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Glu	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Asn	Glu	Ile
			20					25				30			
Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys
		35					40					45			
Ala	Met	Thr	Tyr	Met	Lys	Gly	Asp	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Pro
	50					55					60				
Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Phe	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
65					70					75					80
Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
				85					90					95	
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
			100					105					110		
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Glu	Arg	Lys	Cys

```
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 206
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-14-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 206

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
```

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
115 120 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180 185 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195 200 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
210 215 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225 230 235 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
245 250 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260 265 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275 280 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290 295 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305 310 315 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325 330 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340 345 350

<210> 207
<211> 351

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-17-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 207

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
```

```
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 208
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-20-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 208

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
```

```
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 209
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-27-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 209

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
```

```
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 210
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-29-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 210

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
```

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 211
<211> 351

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-54-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 211

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
```

290 295 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305 310 315 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325 330 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340 345 350

<210> 212
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-56-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 212
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
115 120 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180 185 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195 200 205

```
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 213
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-69-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

```
<400> 213
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
```

```
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 214
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-75-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 214

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
```

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 215
<211> 111

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含全長 hCTLA-4 蛋白胺基酸殘基 1-37 之 WT hCTLA-4 信號肽序列的編碼序列

<400> 215
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc c 111

<210> 216
<211> 37
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 包含全長 hCTLA-4 蛋白胺基酸殘基 1-37 之 WT hCTLA-4 信號肽序列

<400> 216
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala
35

<210> 217
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽之編碼序列

<400> 217
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 480

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

<210> 218
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽 （不具C-端離胺酸）

<400> 218
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
225

<210> 219
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-71-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 219

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
```

```
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 220
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-71-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 220

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
```

```
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 221
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-76-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 221

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
```

```
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 222
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-76-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 222

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 223
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-71-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 223
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 224
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-76-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 224
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180

gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccatctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 225
<211> 485
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD86-小鼠 Ig 融合蛋白

<400> 225
Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
35 40 45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
50 55 60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65 70 75 80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
85 90 95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
100 105 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
115 120 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile

130 135 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145 150 155 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
165 170 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
180 185 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
195 200 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
210 215 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225 230 235 240
Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys
245 250 255
Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly
260 265 270
Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
275 280 285
Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
290 295 300
Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
305 310 315 320
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
325 330 335
Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
340 345 350
Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile
355 360 365
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val
370 375 380
Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser
385 390 395 400
Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp
405 410 415
Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr
420 425 430
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
435 440 445
Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val
450 455 460
His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser
465 470 475 480
Leu Gly Lys Ser Gly

<210> 226
<211> 484
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD80-小鼠 Ig 融合蛋白

<400> 226

```
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 Gly Val Thr Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro
                245                 250                 255
```

Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly
260 265 270
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
275 280 285
Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
290 295 300
Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
305 310 315 320
Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
325 330 335
Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
340 345 350
Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu
355 360 365
Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
370 375 380
Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu
385 390 395 400
Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp
405 410 415
Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val
420 425 430
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln
435 440 445
Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His
450 455 460
Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu
465 470 475 480
Gly Lys Ser Gly

<210> 227
<211> 1458
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD86-小鼠 Ig 融合蛋白編碼序列

<400> 227
atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180

gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag gggtgacccc cagagtgccc ataacacaga acccctgtcc tccactcaaa 780
gagtgtcccc catgcgcagc tccagacctc ttgggtggac catccgtctt catcttccct 840
ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tggtcacatg tgtggtggtg 900
gatgtgagcg aggatgaccc agacgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta 960
cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt 1020
gccctcccca tccagcacca ggactggatg agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac 1080
aacagagccc tcccatcccc catcgagaaa accatctcaa aacccagagg gccagtaaga 1140
gctccacagg tatatgtctt gcctccacca gcagaagaga tgactaagaa agagttcagt 1200
ctgacctgca tgatcacagg cttcttacct gccgaaattg ctgtggactg gaccagcaat 1260
gggcgtacag agcaaaacta caagaacacc gcaacagtcc tggactctga tggttcttac 1320
ttcatgtaca gcaagctcag agtacaaaag agcacttggg aaagaggaag tcttttcgcc 1380
tgctcagtgg tccacgaggg tctgcacaat caccttacga ctaagaccat ctcccggtct 1440
ctgggtaaat ccggataa 1458

<210> 228
<211> 1455
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD80-小鼠 Ig 融合蛋白編碼序列

<400> 228
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720

gataacgggg tgacccccag agtgcccata acacagaacc cctgtcctcc actcaaagag 780
tgtcccccat gcgcagctcc agacctcttg ggtggaccat ccgtcttcat cttcctcca 840
aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agccccatgg tcacatgtgt ggtggtggat 900
gtgagcgagg atgacccaga cgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 960
acagctcaga cacaaaccca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc 1020
ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 1080
agagccctcc catcccccat cgagaaaacc atctcaaaac ccagagggcc agtaagagct 1140
ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagca gaagagatga ctaagaaaga gttcagtctg 1200
acctgcatga tcacaggctt cttacctgcc gaaattgctg tggactggac cagcaatggg 1260
cgtacagagc aaaactacaa gaacaccgca acagtcctgg actctgatgg ttcttacttc 1320
atgtacagca agctcagagt acaaaagagc acttgggaaa gaggaagtct tttcgcctgc 1380
tcagtggtcc acgagggtct gcacaatcac cttacgacta agaccatctc ccggtctctg 1440
ggtaaatccg gataa 1455

200936607

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：P7141645

※ 申請日：P7.10.2P　　※IPC 分類：

C07K	16/28	2006.01
C07K	14/705	2006.01
A61K	39/395	2006.01
A61P	37/00	2006.01

一、發明名稱：（中文/英文）

免疫抑制性多肽及核酸

IMMUNOSUPPRESSIVE POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS

二、中文發明摘要：

本發明提供免疫抑制性多肽以及編碼此等多肽之核酸。在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4多肽以及編碼突變CTLA-4多肽之核酸。其亦提供組合物以及使用此等多肽及核酸之方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides immunosuppressive polypeptides and nucleic acids encoding such polypeptides. In one aspect, the invention provides mutant CTLA-4 polypeptides and nucleic acids encoding mutant CTLA-4 polypeptides. Compositions and methods for utilizing such polypeptides and nucleic acids are also provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種分離或重組之CTLA-4多肽，其包含與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有最多15個胺基酸殘基差異之多肽序列，其中該分離或重組之CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

2. 根據請求項1之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:36之多肽序列具有至少90%之序列相同性。

3. 根據請求項2之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:36之多肽序列具有至少95%之序列相同性。

4. 根據請求項3之分離或重組多肽，其包含SEQ ID NO:36之多肽序列。

5. 根據請求項1之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:50之多肽序列具有至少90%之序列相同性。

6. 根據請求項5之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:50之多肽序列具有至少95%之序列相同性。

7. 根據請求項6之分離或重組多肽，其包含SEQ ID NO:50之多肽序列。

8. 根據前述請求項中任一項之多肽，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

9. 根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

10. 根據前述請求項中任一項之多肽，其包含一個胺基酸取代，該取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

11. 根據前述請求項中任一項之多肽，其包含兩個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

12.根據前述請求項中任一項之多肽，其包含三個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

13.根據前述請求項中任一項之多肽，其包含四個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

14.根據請求項10至13中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代。

15.根據請求項14之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代係S70F。

16.根據請求項10至15中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代。

17.根據請求項16之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代係L104E。

18.根據請求項10至17中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代。

19.根據請求項18之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N/D/A。

20.根據請求項19之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N。

21.根據請求項10至20中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代。

22.根據請求項21之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代係S64P。

23.根據請求項10至22中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代。

24.根據請求項23之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代係A50M。

25.根據請求項10至24中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代。

26.根據請求項25之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K/V。

27.根據請求項26之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K。

28.根據請求項10-17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代。

29.根據請求項28之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代係I65S。

30.根據請求項10至17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代。

31.根據請求項30之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代係N56D。

32.根據請求項10至17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代。

33.根據請求項32之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代係G55E。

34.根據請求項10至17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代。

35.根據請求項30之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代係M85A。

36.根據請求項10-17中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代。

37.根據請求項36之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E/S。

38.根據請求項37之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E。

39.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD86或其胞外域之結合親和力，其係約等於或大於單體人類

CTLA-4胞外域對於CD86或CD86胞外域之結合親和力。

40.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD80或其胞外域之結合親和力，其係大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD80或CD80胞外域之結合親和力。

41.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制免疫反應之能力。

42.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

43.一種分離或重組之多肽多聚體，其包含至少兩個根據前述請求項中任一項之多肽。

44.一種分離或重組之融合蛋白，其包含（a）根據請求項1至42中任一項之多肽，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，且其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

45.一種分離或重組之二聚體融合蛋白，其包含兩個根據請求項44之單體融合蛋白。

46.一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列（編碼根據請求項1至42中任一項之之多肽）、根據請求項43之多聚體、根據請求項44之融合蛋白或是根據請求項45之二聚體融合蛋白。

47.一種載體，其包含根據請求項46之核酸。

48.一種分離或重組之宿主細胞，其包含：

（a）根據請求項1至42中任一項之多肽；

（b）根據請求項43之多聚體；

（c）根據請求項44之融合蛋白；

（d）根據請求項45之二聚體融合蛋白；

（e）根據請求項46之核酸；及/或

（f）根據請求項47之載體。

49.一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體以及一或多種之下列所述者：

（a） 根據請求項1-42中任一項之多肽；

（b） 根據請求項43之多聚體；

（c） 根據請求項44之融合蛋白；

（d） 根據請求項45之二聚體融合蛋白；

（e） 根據請求項46之核酸；

（f） 根據請求項47之載體；及/或

（g） 根據請求項48之宿主細胞。

50.一種抑制免疫反應之方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項1至42中任一項之多肽；

（b）根據請求項43之多聚體；

（c）根據請求項44之融合蛋白；

（d）根據請求項45之二聚體融合蛋白；

（e）根據請求項46之核酸；

（f）根據請求項47之載體；及/或

（g）根據請求項48之宿主細胞，

以抑制免疫反應，其中該免疫反應因而受到抑制。

51.根據請求項1至42中任一項之多肽、根據請求項43之多聚體、根據請求項44之融合蛋白、根據請求項45之二聚體融合蛋白、根據請求項46之核酸、根據請求項47之載體及/或根據請求項48之宿主細胞，其係用於抑制免疫反應。

52.一種根據請求項1至42中任一項之多肽、根據請求項43之多聚體、根據請求項44之融合蛋白、根據請求項45之二聚體融合蛋白、根據請求項46之核酸、根據請求項47之載體及/或根據請求項48之宿主細胞於製造用於抑制免疫反應之藥物的用途。

53.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域及/或具有壓抑或抑制免疫反應之能力。

54.根據請求項53之多肽，其中CD80係人類CD80且CD86

係人類CD86。

55.根據請求項53至54中任一項之多肽，其中該多肽具有壓抑或抑制免疫反應之能力。

56.根據請求項53至55中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化之能力。

57.根據請求項53至55中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞增殖之能力。

58.根據請求項53至57中任一項之多肽，其中該多肽具有大於CTLA-4之較大能力以壓抑或抑制免疫反應。

59.根據請求項53之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力，其係大於人類CTLA-4抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

60.根據請求項53之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力，其係大於人類CTLA-4胞外域抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

61.根據請求項53至57中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制免疫反應之能力，其係大於包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列的LEA29Y多肽抑制免疫反應之能力。

62.根據請求項53至61中任一項之多肽，其中該多肽包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少96%、97%、98%或99%之序列相同性。

63.根據請求項53至62中任一項之多肽，其中該多肽包含選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列。

64.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽可結合單體人類CD80或單體人類CD86或是其任一者之胞外域。

65.根據請求項64之多肽，其中該多肽具有對於單體人類CD86之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4對於單體人類CD86之結合親和力。

66.根據請求項64之多肽，其中該多肽具有對於單體人類CD80之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4對於單體人類CD80之結合親和力。

67.根據請求項65之多肽，其中該多肽具有對於單體人類CD80之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4對於單體人類CD80之結合親和力。

68.根據請求項64至67中任一項之多肽，其中該多肽具有大於單體人類CTLA-4的抑制免疫反應之較大能力、抑制T細胞活化之較大能力及/或抑制T細胞增殖之較大能力。

69.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽具有對於人類CD86胞外域或人類CD80胞外域之結合親和力，其係約等於或大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域或人類CD80胞外域之結合親和力，且其中該多肽視情況具有抑制免疫反應之能力。

70.根據請求項69之多肽，其中該多肽具有對於人類CD86胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域之結合親和力。

71.根據請求項70之多肽，其中該多肽具有對於人類CD80胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD80胞外域之結合親和力。

72.根據請求項69至71中任一項之多肽，其中該多肽具有大於人類CTLA-4胞外域的抑制免疫反應之較大能力、抑制T細胞活化之較大能力及/或抑制T細胞增殖之較大能力。

73.根據請求項53之多肽，其中該突變多肽包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

74.一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其

(a)與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過11個、不超過10個、不超過9個、不超過8個、不

超過7個或不超過6個胺基酸殘基之差異，以及

（b）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，

其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

75.根據請求項74之多肽，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

76.根據請求項74之多肽，其中該突變多肽包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

77.根據請求項74之多肽，其包含兩個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70、85或104之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

78.根據請求項74之多肽，其包含三個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70、85或104之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

79.根據請求項74之多肽，其包含四個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70、85或104之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

80.根據請求項74之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代。

81.根據請求項80之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代係S70F。

82.根據請求項74至81中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代。

83.根據請求項82之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代係L104E。

84.根據請求項74至83中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代。

85.根據請求項84之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N/D/A。

86.根據請求項85之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N。

87.根據請求項74至86中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代。

88.根據請求項87之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代係S64P。

89.根據請求項74至88中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代。

90.根據請求項89之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代係A50M。

91.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代。

92.根據請求項91之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K/V。

93.根據請求項92之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K。

94.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代。

95.根據請求項94之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代係I65S。

96.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代。

97.根據請求項96之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代係N56D。

98.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代。

99.根據請求項98之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代係G55E。

100. 根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代。

101. 根據請求項100之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代係M85A。

102. 根據請求項74至83中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代。

103. 根據請求項102之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E/S。

104. 根據請求項103之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E。

105. 根據請求項74至104中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD86或其胞外域之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD86或CD86胞外域之結合親和力。

106. 根據請求項74至105中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD80或其胞外域之結合親和力，其係大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD80或CD80胞外域之結合親和力。

107. 根據請求項74至106中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制免疫反應之能力。

108. 根據請求項74至107中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

109. 一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，包含（i）與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之至少95%序列相同性，以及（ii）位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，

其中該多肽具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

110. 根據請求項109之多肽，其中該多肽包含下列一或多

者：

位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基；

位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基；

位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基；

位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基；

位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基；

位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基；

位在對應位置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基；

位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基；

位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基；以及

位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。

111. 一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可壓抑或抑制免疫反應，其中該多肽包含多肽序列，其：

（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及

（b）包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中該胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號。

112. 根據請求項111之多肽，該多肽進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。

113. 一種分離或重組之多肽，其包含選自由SEQ ID NOS:1至79所組成之群的多肽序列，或是任何該等多肽序列之片段，其中該片段可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有壓抑或抑制免疫反應之能力。

114. 根據請求項113之多肽，其中該片段可結合人類CD80及人類CD86以及/或是其分別之胞外域。

115. 根據請求項53至114中任一項之多肽，其中該多肽係可溶性多肽。

116. 一種分離或重組之蛋白，其包含：

（a）根據請求項53至115中任一項之多肽，以及

（b）可協助該多肽分泌之肽。

117. 根據請求項116之蛋白，其中該肽係信號肽。

118. 根據請求項117之蛋白，其中該信號肽包含胺基酸序列，其與SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列具有至少95%之序列相同性。

119. 根據請求項118之蛋白，其中該信號肽包含SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列。

120. 一種分離或重組之蛋白，其包含根據請求項53至115中任一項之多肽，以及穿膜域。

121. 根據請求項120之蛋白，其中該穿膜域包含胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基162至182的胺基酸序列具有至少95%之相同性。

122. 根據請求項121之蛋白，其中該穿膜域包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基162至182。

123. 根據請求項120之蛋白，其尚包含胞質域。

124. 根據請求項122之蛋白，其中該胞質域包含胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基183至223的胺基酸序列具有至少95%之相同性。

125. 根據請求項124之蛋白，其中該穿膜域包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基183至223。

126. 根據請求項120至125中任一項之蛋白，其尚包含信號肽。

127. 根據請求項53至115中任一項之多肽或是根據請求項116至126中任一項之蛋白，其中該多肽之一或多個胺基酸殘基經糖基化。

128. 根據請求項53至115或127中任一項之多肽或是根據請求項116至127中任一項之蛋白，其中該多肽之一或多個胺基酸殘基經聚乙二醇化。

129. 一種分離或重組之多肽多聚體，其包含至少兩個根

據請求項53至115中任一項之多肽或是至少兩個根據請求項116至128中任一項之蛋白。

130. 根據請求項129之多聚體，其中所有之該至少兩個多肽皆係相同。

131. 根據請求項129之多聚體，其中該多聚體可壓抑或抑制免疫反應。

132. 根據請求項129之多聚體，其中該多聚體可抑制T細胞活化或T細胞增殖。

133. 根據請求項129之多聚體，其中該多聚體包含四個多肽。

134. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽。

135. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體係同型二聚體。

136. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體係異型二聚體。

137. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體可壓抑或抑制免疫反應。

138. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體可抑制T細胞活化或T細胞增殖。

139. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體具有對於人類CD86或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD86或其胞外域之結合性。

140. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體具有對於人類CD80或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD80或其胞外域之結合性。

141. 根據請求項139之二聚體，其中該二聚體具有對於人類CD80或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD80或其胞外域之結合性。

142. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體具有對於人類CD86或其胞外域之結合性，其係分別大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體對於人類CD86或其胞外域之結合性，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

143. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以小於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體自結合之人類CD86或其胞外域解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域解離。

144. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以小於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體自結合之人類CD86或其胞外域解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域解離，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

145. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體與人類CD86或其胞外域結合之速率而與人類CD86或其胞外域結合。

146. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體與人類CD86或其胞外域結合之速率而與人類CD86或其胞外域結合，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

147. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體相較於包含兩個人類CTLA-4胞外域或兩個LEA29Y多肽之二聚體具有抑制免疫反應之較大能力。

148. 根據請求項147之二聚體，其中該二聚體相較於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之較大能力。

149. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請

求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體具有小於包含兩個人類CTLA-4胞外域或兩個LEA29Y多肽之二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

150. 一種分離或合成之複合物，其包含：

（a）根據請求項1至115中任一項之多肽；以及

（b）連附於該多肽上之非多肽分子部分。

151. 根據請求項150之複合物，其中該複合物可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域。

152. 根據請求項151之複合物，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

153. 根據請求項150之複合物，其包含至少兩個非多肽分子部分。

154. 根據請求項153之複合物，其中該非多肽分子部分係糖分子。

155. 根據請求項154之複合物，其中該糖分子係連附於N-糖基化位點。

156. 根據請求項150之複合物，其中該非多肽分子部分係聚合物。

157. 根據請求項156之複合物，其中該聚合物係聚乙二醇分子部分。

158. 根據請求項157之複合物，其中該聚乙二醇分子部分係共價連附於該多肽之半胱胺酸殘基。

159. 根據請求項157之複合物，其包含共價連附於該多肽離胺酸殘基之聚乙二醇分子部分。

160. 根據請求項159之複合物，其包含共價連附於該多肽N-端胺基之聚乙二醇分子部分。

161. 一種分離或重組之融合蛋白，其包含（a）第多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80

及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

162. 根據請求項161之融合蛋白，其中該融合蛋白可調節或調控T細胞之活化或增殖或是細胞因子之生成。

163. 根據請求項161或162之融合蛋白，其中該第二多肽係直接融合該第多肽。

164. 根據請求項161或162之融合蛋白，其中該第二多肽係融合連接子胺基酸序列，該序列係融合該第多肽。

165. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽係融合該第多肽之C-端。

166. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽包含Ig重鏈恆定區之一或多個蛋白域。

167. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽包含Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。

168. 根據請求項161之融合蛋白，其中該Ig Fc多肽係野生型人類Ig Fc多肽或是突變Ig Fc多肽。

169. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽包含人類Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。

170. 根據請求項169之融合蛋白，其中人類Ig多肽係人類IgG多肽，該人類IgG2多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

171.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a）多肽，其包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

172.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含：（1）多肽，其包

含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，且其中在該多肽序列中位於位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可抑制免疫反應。

173.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含：（1）突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（i）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，及（ii）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置；以及（2）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。

174.一種分離或重組之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體，其包含兩個突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體，其中各個突變CTLA-4-Ig融合單體包含：（1）突變CTLA-4-ECD多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，及（b）在相對SEQ ID NO:159之胺基酸位置包含一或多個取代，選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群；以及（2）Ig Fc多肽，該Ig Fc多肽視情況係IgG2 Fc多肽，其中該突變CTLA-4-Ig二聚體可結合hCD80或hCD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。

175.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個根據請求項161至171及314至316中任一項之單體融合蛋白，其中該兩個單體融合蛋白係經由下列者連接：（i）至少一個在兩個半胱胺酸殘基間所形成之雙硫鍵，其中各個半胱胺酸殘基係存在於該兩個第多肽之一者中，及/或（ii）至少一個在兩個半胱胺

酸殘基間所形成之雙硫鍵，其中各個半胱胺酸殘基係存在於該兩個第二多肽之一者中。

176. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別大於包含兩個單體融合蛋白（其各包含融合Ig多肽之野生型人類CTLA-4胞外域）之融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性。

177. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別大於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其中該CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體包含兩個單體CTLA-4-IgG2融合蛋白，各個CTLA-4-IgG2融合蛋白包含SEQ ID NO:162之多肽序列。

178. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別至少等於或大於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

179. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別至少等於或大於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其中該LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體包含兩個單體LEA29Y-Ig融合蛋白，各包含SEQ ID NO:166之多肽序列。

180. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其係至少等於或大於包含兩個單體融合蛋白（其各包含融合Ig多肽之野生型人類CTLA-4胞外域）之融合

蛋白二聚體之能力。

181. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其係至少等於或大於包含兩個單體融合蛋白（其各具有SEQ ID NO:162之多肽序列）之CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力。

182. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其係至少等於或大於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

183. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於包含兩個人類CTLA-4胞外域之融合蛋白二聚體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離。

184. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離。

185. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

186. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚

體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離，其中該LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白，其各具有SEQ ID NO:166之序列。

187. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig。

188. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域（或hCD86-Ig）之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig。

189. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

190. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig。

191. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有小於包含兩個人類CTLA-4胞外域之融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

192. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有小於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

193. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，

其中該融合蛋白二聚體具有小於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D），其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

194. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有小於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

195. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼根據請求項53至115中任一項之多肽、根據請求項161至171及314至316中任一項之單體融合蛋白或根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體，或是其互補聚核苷酸序列。

196. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

197. 根據請求項196之核酸，其中該核酸編碼多肽，其具有分別大於人類CTLA-4單體或其胞外域之對於人類CD86或其胞外域之較大結合親和性。

198. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼融合蛋白，該融合蛋白包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:74至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

199. 一種分離或重組之核酸，其包含：(a) 聚核苷酸序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:80至158、201至204、223

及224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少95%之序列相同性；(b) (a)之互補聚核苷酸序列；或是（c）(a)或(b)之任何聚核苷酸序列之片段，其中該核酸編碼多肽，該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

200.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，其（a）與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，且（b）其中在該多肽序列中位於位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

201.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，及（b）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

202. 根據請求項201之核酸，其中該核酸包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群，且視情況進一步包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，選自由L104E/D、T30N/D/A及V32I所組成之群。

203. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，具有（i）與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之至少95%相同性，以及（ii）

位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80/或hCD86或是其ECD，及/或可抑制免疫反應，其中該胺基酸取代視情況包含S70F，或是其互補聚核苷酸序列。

204. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼重組多肽二聚體，其包含兩個多肽，其中各個此種多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的序列具有至少95%之相同性，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

205.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼融合蛋白，該融合蛋白包含（a）多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b）Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

206. 根據請求項205之核酸，其中該核酸編碼融合蛋白二聚體。

207. 根據請求項196之核酸，其中該核酸編碼多肽，其具有大於人類CTLA-4單體或其胞外域之較大能力以抑制免疫反應。

208. 根據請求項207之核酸，其中該核酸編碼多肽，其具有大於人類CTLA-4單體或其胞外域之較大能力以抑制T細胞活化或T細胞增殖。

209. 根據請求項196之核酸，其中該核酸編碼多肽，其係以小於人類CTLA-4單體或其胞外域自結合之人類CD86或其胞外域解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域解離。

210. 一種分離或重組之核酸，其包含：

（a）聚核苷酸序列，與RNA聚核苷酸序列具有至少95%之序列相同性，其中該RNA聚核苷酸序列包含DNA序列，選自由SEQ ID NOS:80至158、201至204、223及224所組成之群，其中該DNA

序列中所有之胸腺嘧啶核苷酸殘基經尿嘧啶核苷酸殘基置換；

（b）(a)之互補聚核苷酸序列；或是

（c）(a)或(b)之任何聚核苷酸序列之片段，

其中該核酸編碼多肽，其（i）可結合CD80及/或CD86及/或其任一或兩者之胞外域，以及/或是（ii） 具有抑制免疫反應之能力，該免疫反應視情況包含T細胞活化及/或T細胞增殖。

211. 根據請求項195至210中任一項之核酸，其尚包含編碼信號肽之核苷酸序列。

212.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b）包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

213.一種載體，其包含根據請求項143至160中任一項之核酸、編碼根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽的核酸、編碼根據請求項129至133中任一項之多肽多聚體的核酸、編碼根據請求項134至149中任一項之多肽二聚體的核酸、編碼根據請求項150至160中任一項之複合物的核酸、編碼根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白的核酸或編碼根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體的核酸。

214. 根據請求項213之載體，其中該載體係DNA載體。

215. 根據請求項213之載體，其中該載體係RNA載體。

216. 根據請求項213之載體，其中該核酸係以可操作之方

式連結啟動子。

217. 根據請求項213之載體，其中該載體係表現載體。

218. 根據請求項217之載體，其中該表現載體包含示於圖1C之質體表現載體。

219. 根據請求項213之載體，其中該載體係病毒載體、酵母菌載體、植物載體、細菌載體或昆蟲載體。

220. 根據請求項219之載體，其中該病毒載體係腺病毒載體。

221. 根據請求項213之載體，其中該載體係質體載體。

222. 根據請求項213至221中任一項之載體，其中該載體尚包含可選擇性標記。

223. 一種表現載體，其包含：(i) 第一聚核苷酸序列，其編碼第多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，其中該第多肽可結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，以及（ii）第二聚核苷酸序列，其編碼第二多肽，該多肽包含免疫球蛋白（Ig）多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

224. 一種分離或重組之宿主細胞，其包含：

（a） 根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b） 根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c） 根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d） 根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e） 根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；及/或

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體。

225. 一種分離或重組之宿主細胞，其經根據請求項143至160中任一項之核酸轉染或轉形。

226. 一種分離或重組之宿主細胞，其經編碼融合蛋白之核酸轉染，該核酸包含：

（i）第一核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，其中該第多肽具有結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有抑制免疫反應的能力；以及

（ii）第二核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含免疫球蛋白（Ig）多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽，

其中該宿主細胞可表現該融合蛋白。

227. 一種分離或重組之分離宿主細胞，其包含根據請求項213至223中任一項之載體。

228. 一種分離之宿主細胞，其經根據請求項213至223中任一項之載體轉染或轉形。

229. 根據請求項224至228中任一項之宿主細胞，其中該宿主細胞係真核細胞。

230. 根據請求項229之宿主細胞，其中該宿主細胞係中國倉鼠卵巢（CHO）細胞或COS細胞。

231. 一種無限增殖化細胞系，其包含：

（a） 根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b） 根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c） 根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d） 根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e） 根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i） 根據請求項224至230中任一項之細胞。

232. 一種組合物，其包含賦形劑或載體，以及下列之一或多者：

（a） 根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b） 根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c） 根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d） 根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e） 根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體；

（i） 根據請求項224至230中任一項之細胞；及/或

（j） 根據請求項231之細胞系。

233. 一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，以及下列之一或多者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；及/或

（j）根據請求項231之細胞系。

234. 一種抑制免疫反應之方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

以抑制免疫反應，其中該免疫反應因而受到抑制。

235. 根據請求項234之方法，其中該受到抑制之免疫反應係T細胞反應。

236. 根據請求項234之方法，其中該方法包含使B7-陽性細胞接觸該多肽，其中該多肽可結合表現於B7-陽性細胞上之B7-1，以及/或是結合表現於B7-陽性細胞上之B7-2。

237. 一種調控表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚

體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

以調控B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用，其中B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用因此受到調控。

238. 一種抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

其中CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用因此受到抑制。

239. 根據請求項238之方法，其中係抑制T細胞之活化或增殖。

240. 根據請求項238之方法，其中該B7-陽性細胞係抗原呈遞細胞。

241. 一種抑制對象體內CD28-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含對一對象投予有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

其中該對象體內之內源性CD28-陽性T細胞與內源性B7-陽性細胞之作用受到抑制。

242. 根據請求項241之方法，其中係抑制內源性CD28-陽性T細胞與表現B7-2（CD86）或B7-1（CD80）之內源性B7-陽性細胞之作用。

243. 根據請求項241之方法，其中係抑制表現B7-2（CD86）及/或B7-1（CD80）之B7-陽性細胞以及B7-2（CD86）及/或B7-1（CD80）與CD28-陽性T細胞之作用。

244. 根據請求項243之方法，其中係抑制B7-2（CD86）及B7-1（CD80）與CD28-陽性T細胞之作用。

245. 一種在對象體內抑制免疫反應之方法，其包含對需要該方法之對象投予治療有效量之下列一或多者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚

體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而在該對象體內抑制免疫反應。

246. 根據請求項245之方法，其中可溶性融合蛋白二聚體係以包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至約100毫克每公斤（mg/kg）該對象體重之治療有效量而對該對象進行投與。

247. 根據請求項246之方法，其中該可溶性融合蛋白二聚體之治療有效量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25或50 mg/kg該對象體重。

248. 根據請求項245之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在醫藥可接受之賦形劑或載體中對該對象進行投與。

249. 根據請求項245之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係經腸外、皮下或靜脈內而進行投與。

250. 根據請求項245之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係每個月一、二、三或四次而經皮下進行投與。

251. 根據請求項245至250中任一項之方法，其中可溶性融合蛋白二聚體係在醫藥可接受之賦形劑或載體中，以自約0.01 mg/ml至約200 mg/ml、約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約1至約200 mg/ml、約1至約100 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約10至約50 mg/ml、約25至約50 mg/ml或約50 mg/ml至約100 mg/ml之濃度對該對象進行投與。

252. 根據請求項245之方法，其中該多肽係可溶性多肽，

該融合蛋白係可溶性融合蛋白，該二聚體係可溶性二聚體，該多聚體係可溶性多聚體，且該融合蛋白二聚體係可溶性融合蛋白二聚體。

253. 一種在對象體內抑制免疫反應之方法，其包含對需要該方法之對象投予治療有效量之第一免疫抑制劑或化合物，該第一免疫抑制劑包含：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而在該對象體內抑制免疫反應。

254. 根據請求項253之方法，其進一步包含投與有效量之至少一種其他之免疫抑制劑或療劑。

255. 根據請求項254之方法，其中該至少一種其他之免疫抑制劑或療劑係選自由疾病修飾性抗風溼藥物（DMARD）、類固醇化合物、非類固醇化合物、水楊酸鈉或鎂、伊布洛芬（ibuprofen）、乙醯水楊酸、乙醯胺苯酚、抗體、可阻斷抗炎細胞因子生成之生物劑、依法利珠（efalizumab）、抗炎試劑或化合物及非類固醇抗炎藥物（NSAID）所組成之群。

256. 根據請求項254或255之方法，其中該至少一種其他之免疫抑制劑或療劑係在醫藥可接受之賦形劑或載體中對該對象進行投與。

257. 根據請求項253至256中任一項之方法，其中該多

肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係至少每天一次、至少每週一次、至少每雙週一次或至少每月一次進行投與。

258. 根據請求項253至257中任一項之方法，其中該至少一種其他之免疫抑制劑或療劑係（i）與該第一免疫抑制劑或化合物之投與同時；(ii)在該第一免疫抑制劑或化合物之投與後；或（iii）在該第一免疫抑制劑或化合物之投與前而進行投與。

259. 一種治療具有由內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞之作用所調控之免疫系統疾病或病症之對象的方法，該方法包含對需要此種治療之對象投予治療有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

其中在該內源性T細胞與表現該CD80及/或該CD86之內源性細胞間之該（等）作用受到抑制，因而治療該對象體內之免疫系統疾病或病症。

260. 根據請求項259之方法，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

261. 根據請求項259之方法，其中係抑制表現CD28之內源性T細胞與表現CD86之內源性細胞及/或表現CD80之內源性細胞間的作用。

262. 根據請求項261之方法，其中CD80係人類CD80，CD86係人類CD86，且CD28係人類CD28。

263. 根據請求項259至262中任一項之方法，其中該免疫系統疾病或病症係自體免疫疾病或病症。

264. 根據請求項263之方法，其中該免疫系統疾病或病症係選自由關節炎、類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、全身性紅斑狼瘡（SLE）、牛皮癬、乾癬性關節炎、糖尿病、幼年型糖尿病、第一型糖尿病、多發性硬化、克隆氏病（Crohn's disease）、全身性硬皮症、潰瘍性結腸炎、炎症性腸病（IBD）、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis）、愛迪生氏症（Addison's Disease）、葛瑞夫茲氏病（Grave's disease）、肌風濕病、風濕性疾病、僵直性脊椎炎、重症肌無力及ANCA-相關性脈管炎所組成之群。

265. 根據請求項259至264中任一項之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係係在醫藥可接受之賦形劑或載體中對該對象進行投與。

266. 根據請求項259中任一項之方法，其中可溶性融合蛋白二聚體係以包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約100 mg/kg該對象體重之治療有效量而進行投與。

267. 根據請求項266之方法，其中該可溶性融合蛋白二聚體之治療有效量包含至少約0.001、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75或100 mg/kg該對象體重。

268. 根據請求項266之方法，其中該可溶性融合蛋白二聚體之治療有效量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75或100 mg/kg該對象體重。

269. 根據請求項259至268中任一項之方法，其中該多

肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係至少每天一次、至少每週一次、至少每雙週一次或至少每月一次進行投與。

270.一種製備多肽之方法，其包含在培養基中培養 根 據請求項224至230中任一項之宿主細胞，以及回收由該細胞所表現之該多肽。

271.一種製備多肽之方法，其包含：

（a）在一種群之細胞中引入根據請求項195至212中任一項之核酸，其中該核酸以可操作之方式連結可有效生產由該核酸所編碼之多肽的調控序列；

（b）在培養基中培養該等細胞以生產該多肽；以及

（c）自該等細胞或培養基中分離該多肽。

272.一種經培養之細胞，其中已引入根據請求項213至223中任一項之載體。

273.一種經培養之細胞，其中已引入根據請求項161至171中任一項之表現載體。

274.一種製備融合蛋白之方法，該方法包含：

（1）在培養基中培養經一核酸轉形之宿主細胞，其中該核酸包含：(i)第一核苷酸序列，編碼第多肽，其與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，該多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是CD86或CD80中任一者之胞外域，以及（ii）第二核苷酸序列，其編碼Ig多肽，包含鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc，因而表現該核酸並產生融合蛋白；以及

（2）回收該融合蛋白。

275. 根據請求項274之方法，其中該核酸尚包含第三核苷酸序列，編碼分泌或信號肽，以可操作之方式連結該融合蛋白，且該融合蛋白係以包含相同第一及第二融合蛋白之雙硫鍵結融合蛋白二聚體形式而自該宿主細胞分泌，且其自該培養基中回收該雙硫鍵結融合蛋白二聚體。

276. 根據請求項275之方法，其中該雙硫鍵結融合蛋白二聚體係經由該第一融合蛋白之半胱胺酸殘基與該第二融合蛋白之半胱胺酸殘基間的共價雙硫鍵而形成。

277. 根據請求項274之方法，其中該融合蛋白係自該培養基、宿主細胞或宿主細胞周質而回收。

278.一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，其編碼（i)第多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該第多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及（ii）第二多肽，其包含IgG多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。

279. 根據請求項278之核酸分子，其中該第二多肽包含SEQ ID NO:184之多肽序列。

280.一種表現載體，其包含根據請求項278或279之核酸。

281. 根據請求項280之表現載體，其尚包含第三核苷酸序列，可協助該第多肽及該第二多肽之表現。

282. 根據請求項280之表現載體，其尚包含第四核苷酸序列，可協助該第二多肽之表現，其中該第三及第四核苷酸序列係相同或不同。

283.一種宿主細胞，其包含根據請求項280、281或282之表現載體。

284.一種製備融合蛋白二聚體之方法，該方法包含培養根據請求項283之宿主細胞。

285. 根據請求項284之方法，其中該融合蛋白二聚體係自該宿主細胞培養基中回收。

286. 根據請求項285之方法，其中該二聚體係自該宿主細胞回收。

287. 根據請求項285之方法，其中該二聚體係自該宿主細胞周質回收。

288. 一種抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細

胞、移植物或器官移植之排斥的方法，該方法包含對於需要該方法之接受者對象投予治療有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而抑制接受者對象對於該組織、細胞、移植物或器官移植之排斥。

289. 根據請求項288之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在組織、細胞、移植物或器官移植之前、同時或之後而對該接受者對象投與。

290. 根據請求項288之方法，其中該捐贈者及該接受者對象係相同生物種。

291. 根據請求項288之方法，其中該捐贈者及該接受者對象係不同生物種。

292. 根據請求項290之方法，其中該捐贈者及該接受者對象係係人類。

293. 根據請求項288之方法，其中該有效量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約200 mg/kg該對象體重。

294. 根據請求項293之方法，其中該有效量包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、

4、5、10、15、25、50、75、100、125、150或175毫克每公斤（mg/kg）該對象體重。

295. 根據請求項294之方法，其中該有效量包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.25、0.5、1、2、3、4或5毫克每公斤（mg/kg）該對象體重。

296. 根據請求項288之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在組織、細胞、移植物或器官移植之第二天且在移植後至少每週一次或至少每月一次，隨需要，直到12、24或36個月或以上而進行投與。

297. 根據請求項288之方法，其中該器官移植係腎臟移植、肝臟移植、肺移植或心臟移植。

298. 一種在對象體內治療組織、細胞、移植物或器官移植排斥之方法，該方法包含對於需要此種治療之對象投予治療有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i） 根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而減少或減輕該對象之組織、細胞、移植物或器官移植排斥。

299. 根據請求項298之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在組織、細胞、移植物或器官移植之前、同時或之後而對該對象投

與。

300. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於在哺乳動物體內抑制或壓抑免疫反應之藥物的用途。

301. 根據請求項300之用途，其中該免疫反應係T細胞反應。

302. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於治療免疫系統疾病或病症之藥物的用途。

303. 根據請求項302之用途，其中該免疫系統疾病或病症係由哺乳動物體內之T細胞與CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞作用中介。

304. 根據請求項303之用途，其中該免疫系統疾病或病症係自體免疫疾病或自體免疫病症。

305. 根據請求項302之用途，其中該免疫系統疾病或病症係選自由關節炎、類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、全身性紅斑狼瘡（SLE）、牛皮癬、乾癬性關節炎、糖尿病、幼年型糖尿病、第一型糖尿病、多發性硬化、克隆氏病（Crohn's disease）、全身性硬皮症、潰瘍性結腸炎、炎症性腸病（IBD）、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis）、愛迪

生氏症（Addison's Disease）、葛瑞夫茲氏病（Grave's disease）、肌風濕病、風濕性疾病、僵直性脊椎炎、重症肌無力及ANCA-相關性脈管炎所組成之群。

306. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於在哺乳動物體內治療組織或器官移植排斥之藥物的用途。

307. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於抑制CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞與CD28-陽性細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞作用之藥物的用途。

308. 根據請求項172之多肽，其中位於胺基酸位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同。

309. 一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:74至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，及/或可抑制免疫反應。

310.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b）包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應。

311.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i）與選自由SEQ ID NOS:36至46及55所組成之群的多肽序列之至少95%序列相同性，以及（ii）位在該所選多肽序列胺基酸位置55之麩胺酸殘基，其中該多肽（i）可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或（ii）可抑制免疫反應。

312.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:56所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽（i）可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或（ii）可抑制免疫反應。

313.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:74至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽（i）可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，（ii）可結合CD80-Ig融合蛋白及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或（iii）可抑制免疫反應。

311. 根據請求項161之分離或重組之融合蛋白，該融合蛋白包含（a）第多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:50

及SEQ ID NO:56所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

315. 根據請求項314之融合蛋白，其中該Ig Fc多肽係野生型人類Ig Fc多肽或是突變Ig Fc多肽。

316. 根據請求項314之融合蛋白，其中該Ig Fc多肽係人類IgG Fc多肽，該人類IgG2 Fc多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

317. 一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a）多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199及SEQ ID NO:200所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有（i）結合CD80及/或CD86以及/或是CD80及/或CD86之胞外域的能力，（ii）結合CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或（iii）具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

318. 根據請求項263之方法，其中該免疫系統疾病或病症係選自由愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、貝西氏症候群（Behcet's syndrome）、伯格氏症（Berger's Disease）、大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經

炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿病、

第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應所組成的群。

319. 根據請求項232或233之組合物，其包含有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；或

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體。

320. 根據請求項232、233或319之組合物，其包含可使該組合物之pH維持在介於約pH 3至約pH 10之緩衝劑、水、視情況之非離子性清潔劑、視情況之鹽及視情況之糖醇、單醣、雙醣或多醣。

321. 根據請求項319至320中任一項之組合物，其中該組合物係在生理pH下。

322. 根據請求項319至321中任一項之組合物，其中該組合物具有自約4至約7.5之pH值。

323. 根據請求項319至322中任一項之組合物，其中該組合物具有自約5.0至約7.5之pH值。

324. 根據請求項319至323中任一項之組合物，其中該組合物具有約6.4之pH值。

325. 根據請求項319至323中任一項之組合物，其中該組合物具有約pH 7.4或7.5之pH值。

326. 根據請求項319至325中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以自約1 mM至約100 mM或是1 mM至約50 mM之濃度存在。

327. 根據請求項319至326中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以約5 mM至約35 mM之濃度存在。

328. 根據請求項319至327中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以約10 mM至約25 mM之濃度存在。

329. 根據請求項319至328中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以約20 mM之濃度存在。

330. 根據請求項319至329中任一項之組合物，其中該緩衝劑係選自HEPES緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、琥珀酸緩衝劑、醋酸緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、順丁烯二酸緩衝劑、磷酸緩衝劑及Tris緩衝劑。

331. 根據請求項319至330中任一項之組合物，其中該緩衝劑係選自HEPES緩衝劑、檸檬酸鈉緩衝劑及琥珀酸鈉緩衝劑。

332. 根據請求項319至331中任一項之組合物，其中該pH係約6.0至約6.7，且該緩衝劑係琥珀酸鈉或檸檬酸鈉。

333. 根據請求項319至332中任一項之組合物，其中該pH係約7.0至約7.7，且該緩衝劑係HEPES。

334. 根據請求項319至333中任一項之組合物，其中該組合物包含糖醇或醣類，其中該醣類係單醣、雙醣或多醣。

335. 根據請求項319至334中任一項之組合物，其中雙醣係蔗糖或海藻糖。

336. 根據請求項319至335中任一項之組合物，其中該組合物包含以約1 mM至約50 mM濃度存在之鹽。

337. 根據請求項319至336中任一項之組合物，其中該組合物包含以約20 mM濃度存在之鹽。

338. 根據請求項319至337中任一項之組合物，其中該組合物包含非離子性清潔劑。

339. 根據請求項319至338中任一項之組合物，其中該組合物包含選自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群的非離子性清潔劑。

340. 根據請求項319至339中任一項之組合物，其中該多

肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約1 mg/ml（w/v）至約200 mg/ml（w/v）之濃度存在。

341. 根據請求項319至340中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約25 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）之濃度存在。

342. 根據請求項319至342中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約50 mg/ml至約300 mg/ml之濃度存在，視情形約在介於約50 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）之範圍。

343. 根據請求項319至342中任一項之組合物，其中該組合物中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約0.1 mg/kg至約15 mg/kg，且該組合物係對哺乳動物進行投與。

344. 根據請求項319至343中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約0.5 mg/kg至約10 mg/kg，且該組合物係經由腸外進行投與。

345. 根據請求項319至344中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約0.5 mg/kg至約5 mg/kg（且視情形為約0.5 mg/kg），且該組合物係經由皮下進行投與。

346. 根據請求項319至345中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約5 mg/kg至約15 mg/kg（且視情形為約10 mg/kg），且該組合物係經由靜脈內進行投與。

347. 根據請求項319至346中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。

348. 根據請求項319至346中任一項之組合物，其中該多

肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。

349. 根據請求項319至348中任一項之組合物，其中該組合物係無菌。

350. 根據請求項319至349中任一項之組合物，其中該組合物係與血液等滲透壓。

351. 根據請求項319至350中任一項之組合物，其中該組合物係液體組合物。

352. 根據請求項319至351中任一項之組合物，其中該組合物係為液體或乾燥形式，其中該乾燥形式係選自由凍乾形式、風乾形式及噴霧乾燥形式所組成之群。

353. 根據請求項319至352中任一項之組合物，其中該組合物係為凍乾形式。

354. 一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含選自由所組成之群SEQ ID NOS:36及50所組成之群的多肽序列，其濃度係介於約1至約200 mg/ml (w/v) 範圍；(b) 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 8.0間之緩衝能力，濃度為約5 mM至約50 mM；(c) 醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；(d) 糖，其濃度係以重量計約0.5%至約10%；(e) 鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；(f) 該pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍；及 (g) 視情形之清潔劑。

355. 根據請求項354之組合物，其中 (a) 該多肽包含SEQ ID NO:36之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；(b) 該緩衝劑係HEPES緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；(c) 該醫藥可接受之稀釋劑係水；(d) 該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；(e) 該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM：(f) 該pH係約7.4；及 (g) 其視情況存在清潔劑，其中該清潔劑係選自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml。

356. 根據請求項354之組合物，其中（a）該多肽包含SEQ ID NO:50之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；（b）該緩衝劑係檸檬酸鈉緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；（c）該醫藥可接受之稀釋劑係水；（d）該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；（e）該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM；（f）該pH係約6.5；及（g）其視情況自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群選擇清潔劑，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml。

357. 一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，其包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）HEPES緩衝劑。

358. 一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，該多肽包含胺基酸序列，其與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約7至約8之pH值。

359. 根據請求項358之醫藥組合物，其中該組合物具有約7.4之pH值。

360. 根據請求項358或359之醫藥組合物，其包含HEPES緩衝劑。

361. 一種醫藥組合物，其包含（a）多肽，其包含胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）檸檬酸鈉緩衝劑。

362.一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約6至約7之pH值。

363. 根據請求項362之醫藥組合物，其中該組合物具有約6.5之pH值。

364. 根據請求項362或363之醫藥組合物，其包含檸檬酸鈉緩衝劑。

365. 根據請求項302之方法，其中該免疫系統疾病或病症係選自由愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、貝西氏症候群（Behcet's syndrome）、伯格氏症（Berger's Disease）、大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's

Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿病、第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應所組成的群。

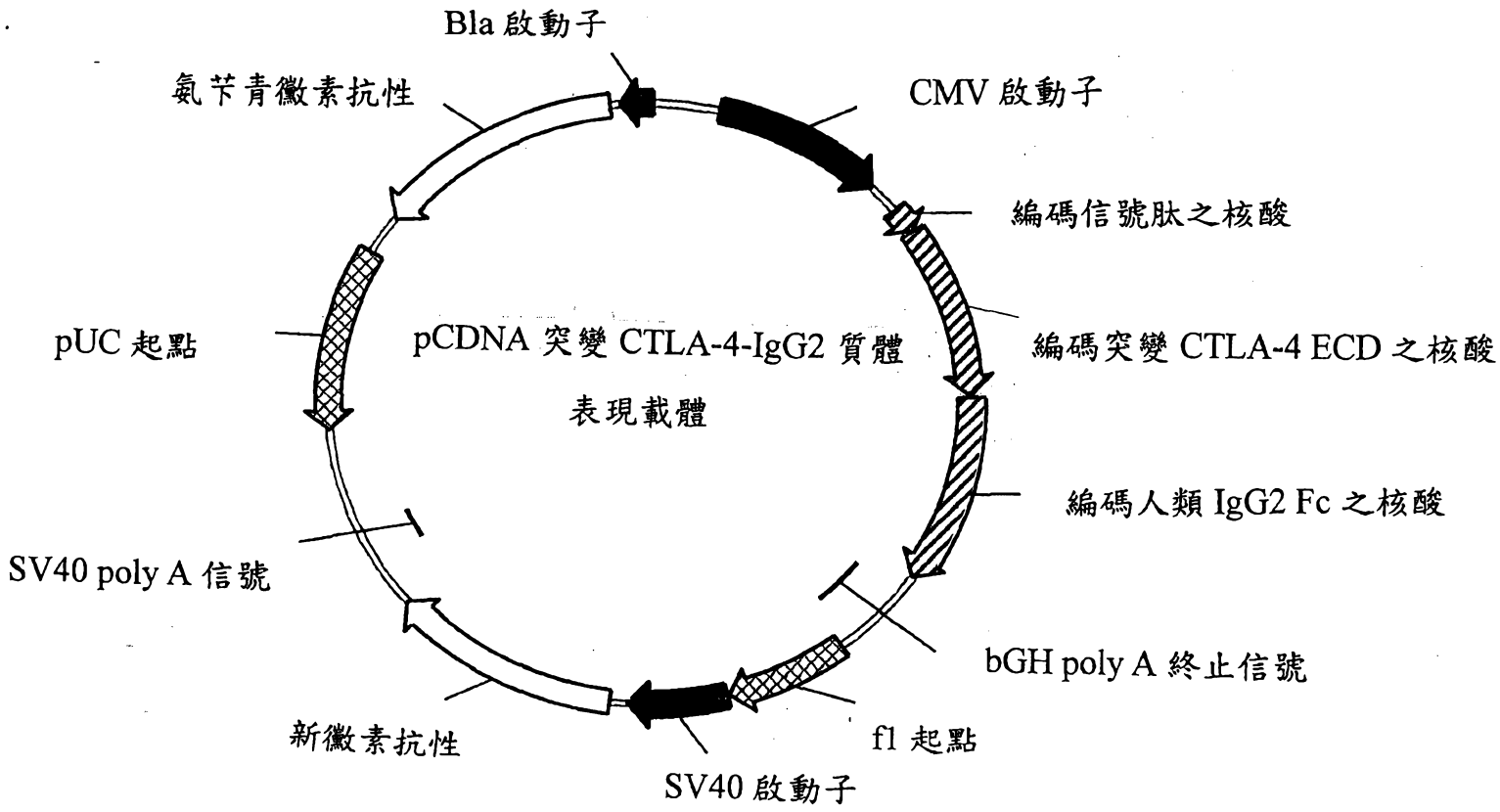


圖 1

200936607

圖 2A

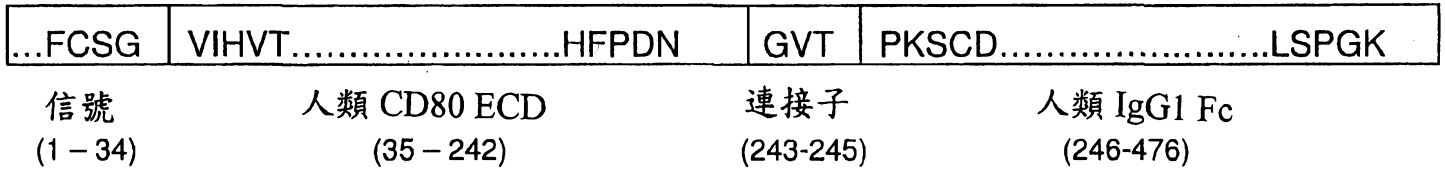
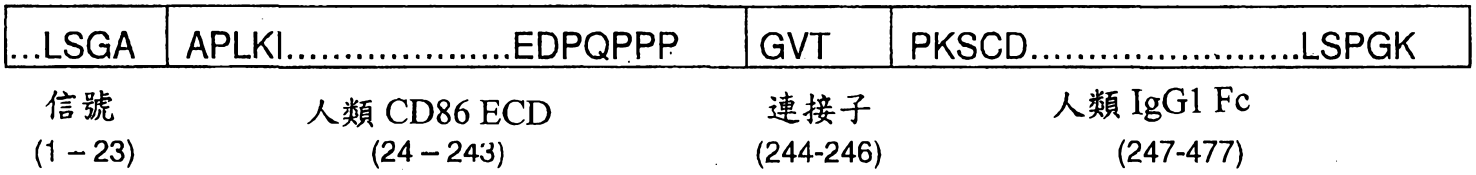


圖 2B



200936607

圖 2C

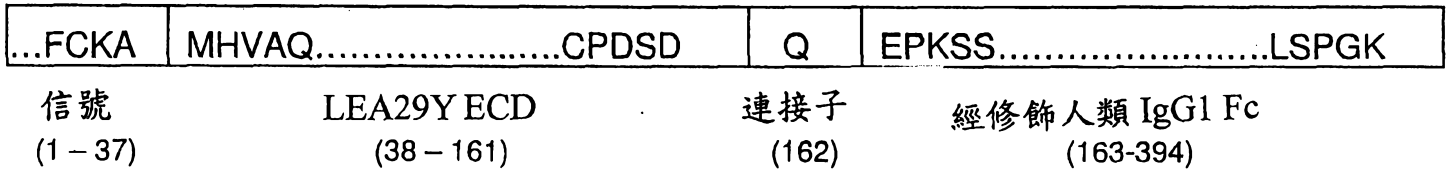
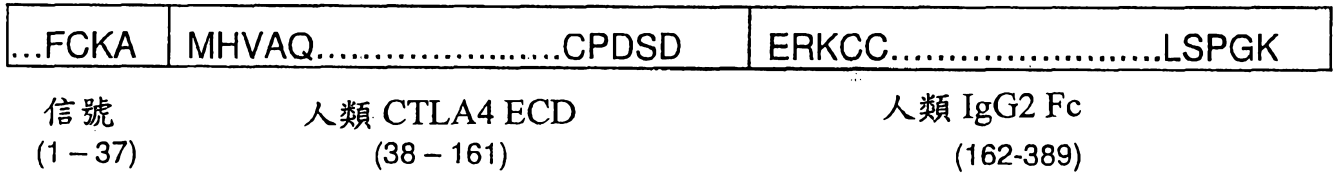


圖 2D



200936607

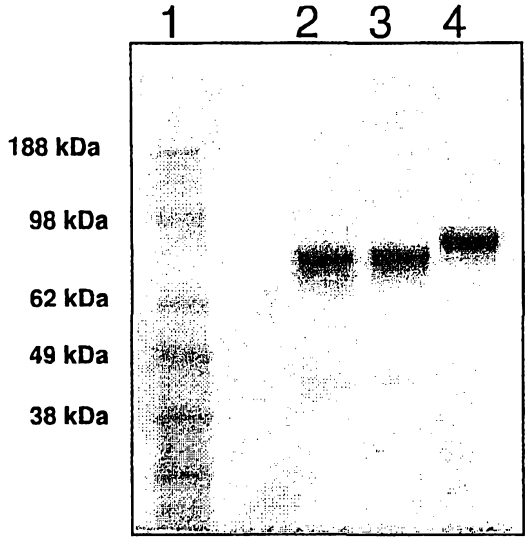


圖 3

200936607

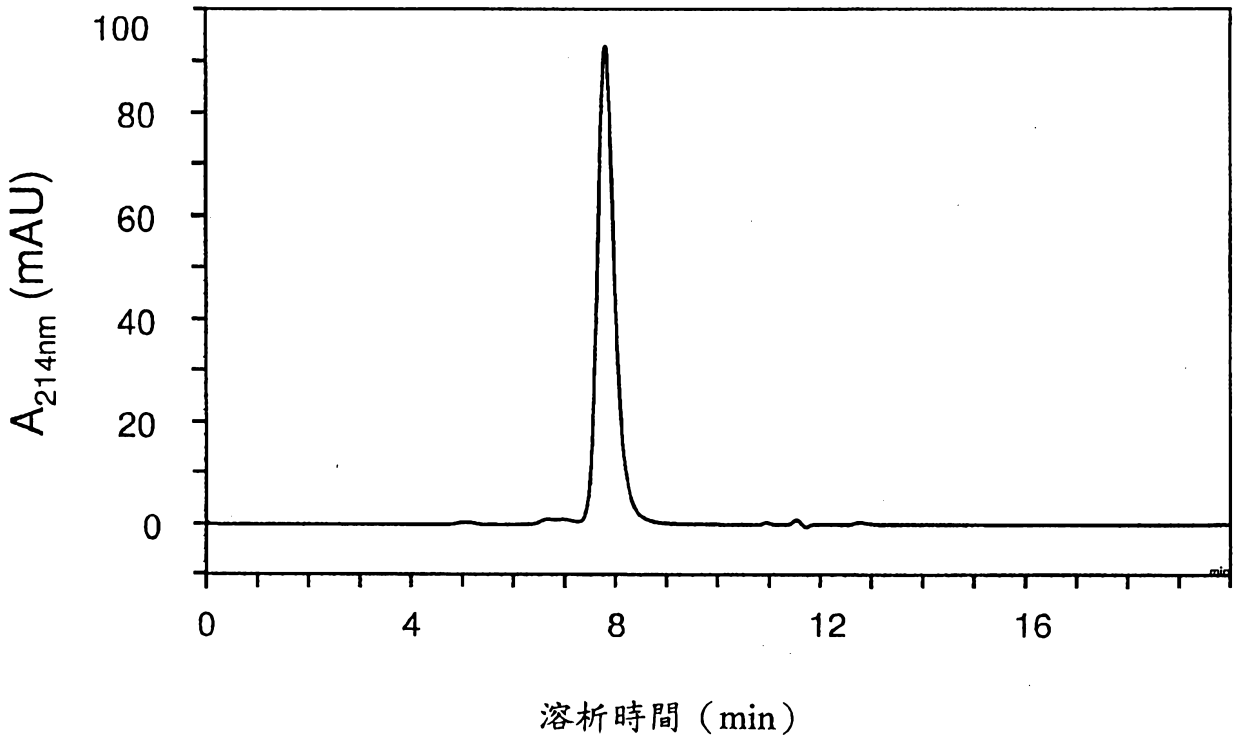


圖 4

200936607

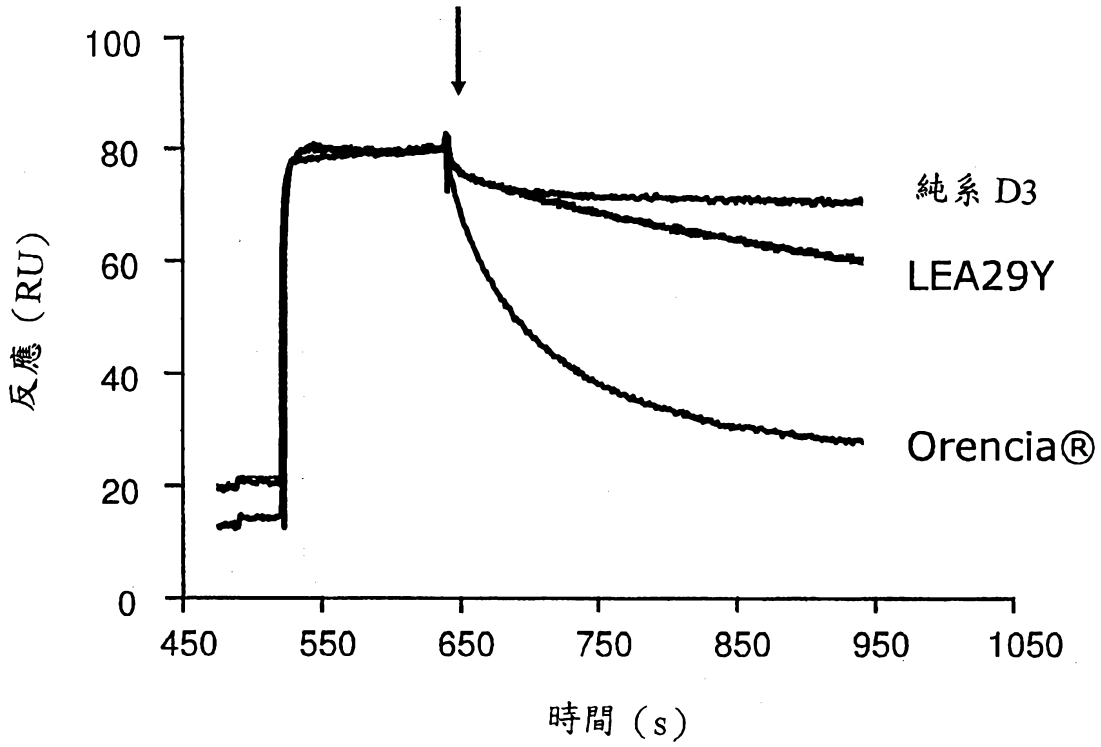


圖 5

200936607

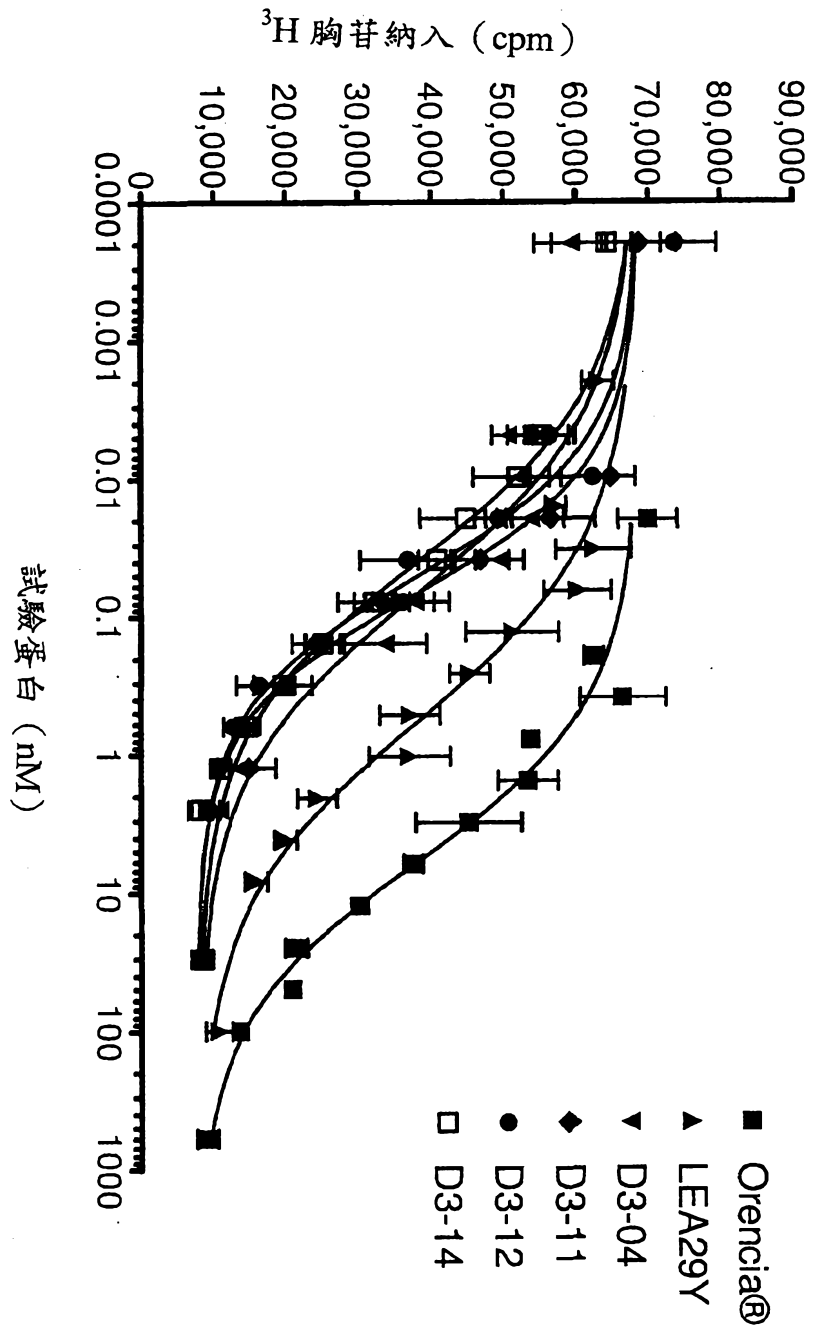

^{3}H 胸苷納入（cpm）
90,000
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
試驗蛋白（nM）
Orencia®
LEA29Y
D3-04
D3-11
D3-12
D3-14

圖 6

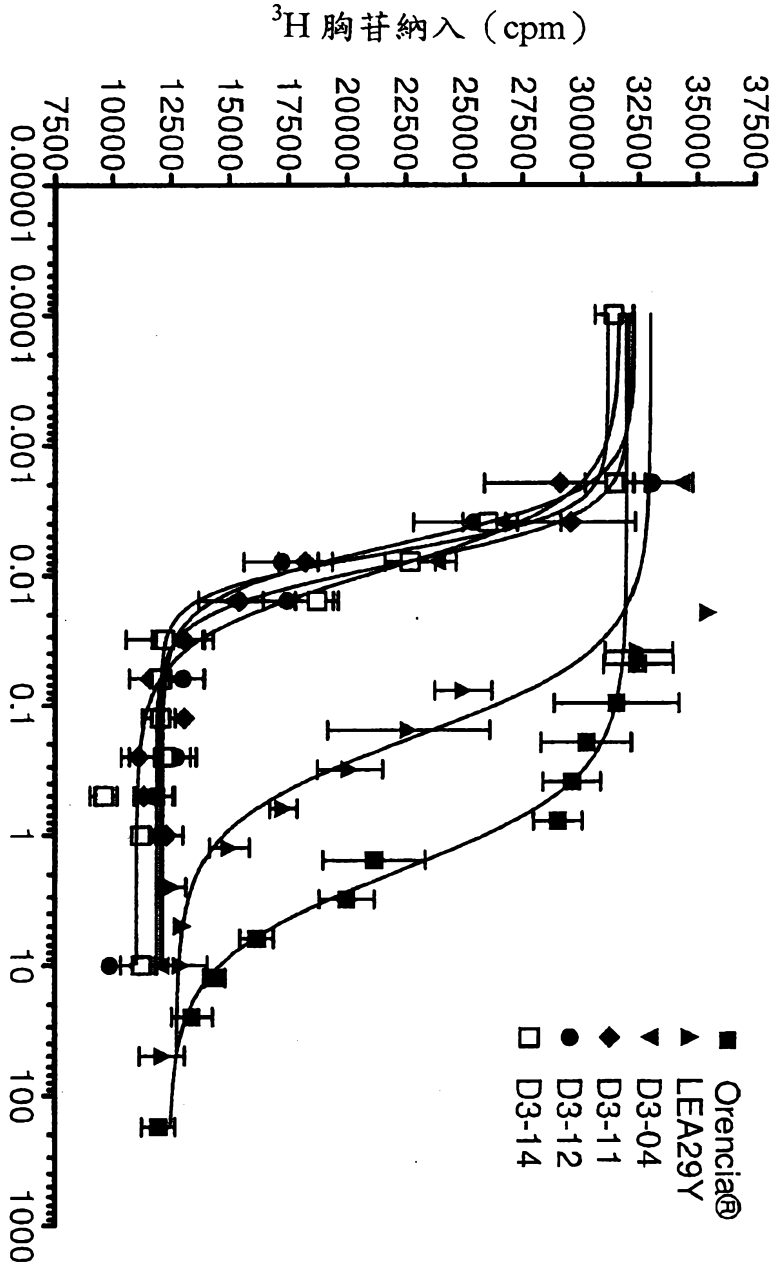

^{3}H 胸苷納入（cpm）
37500
35000
32500
30000
27500
25000
22500
20000
17500
15000
12500
10000
7500
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
試驗蛋白（nM）
Orencia®
LEA29Y
D3-04
D3-11
D3-12
D3-14

圖 7

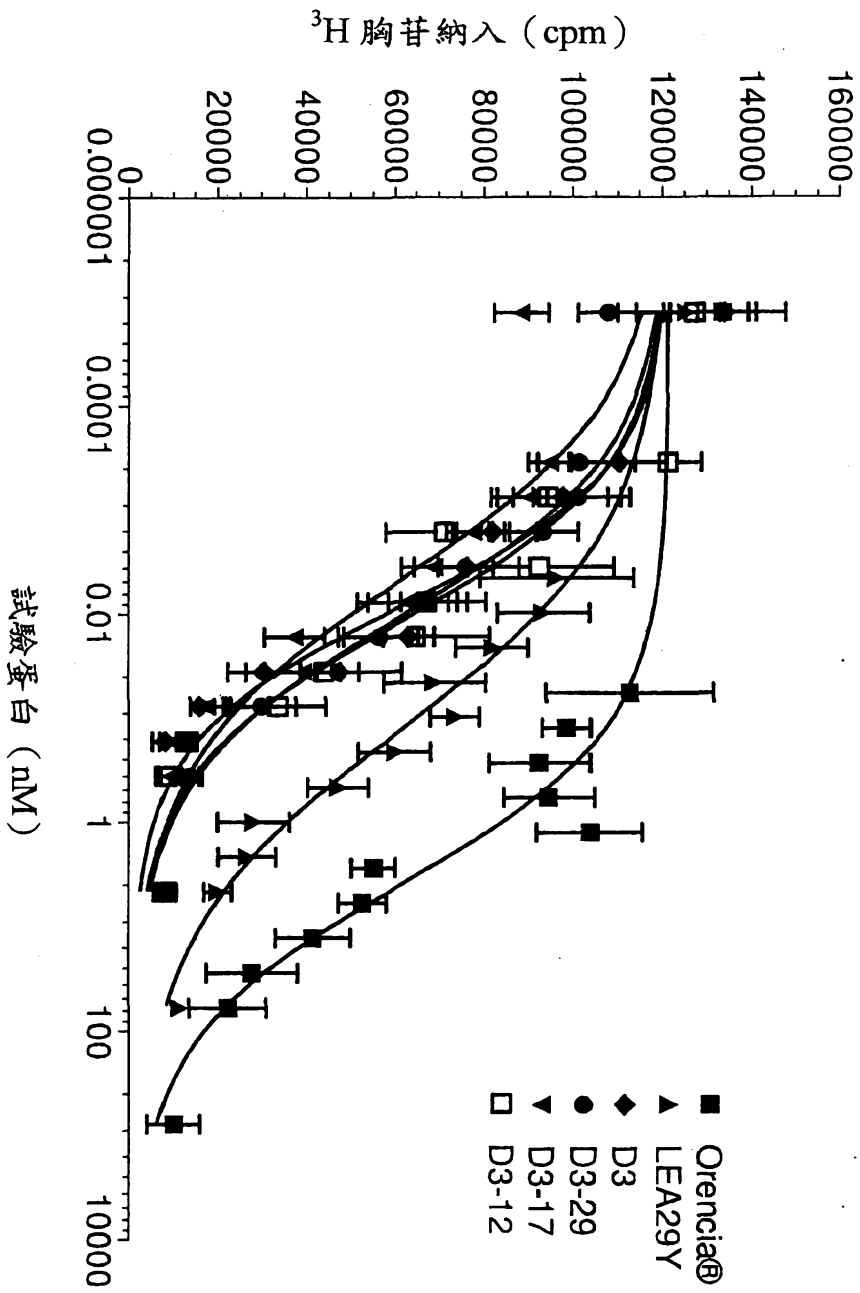

^{3}H 胸苷納入（cpm）
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
試驗蛋白（nM）
Orencia®
LEA29Y
D3
D3-29
D3-17
D3-12

圖 8

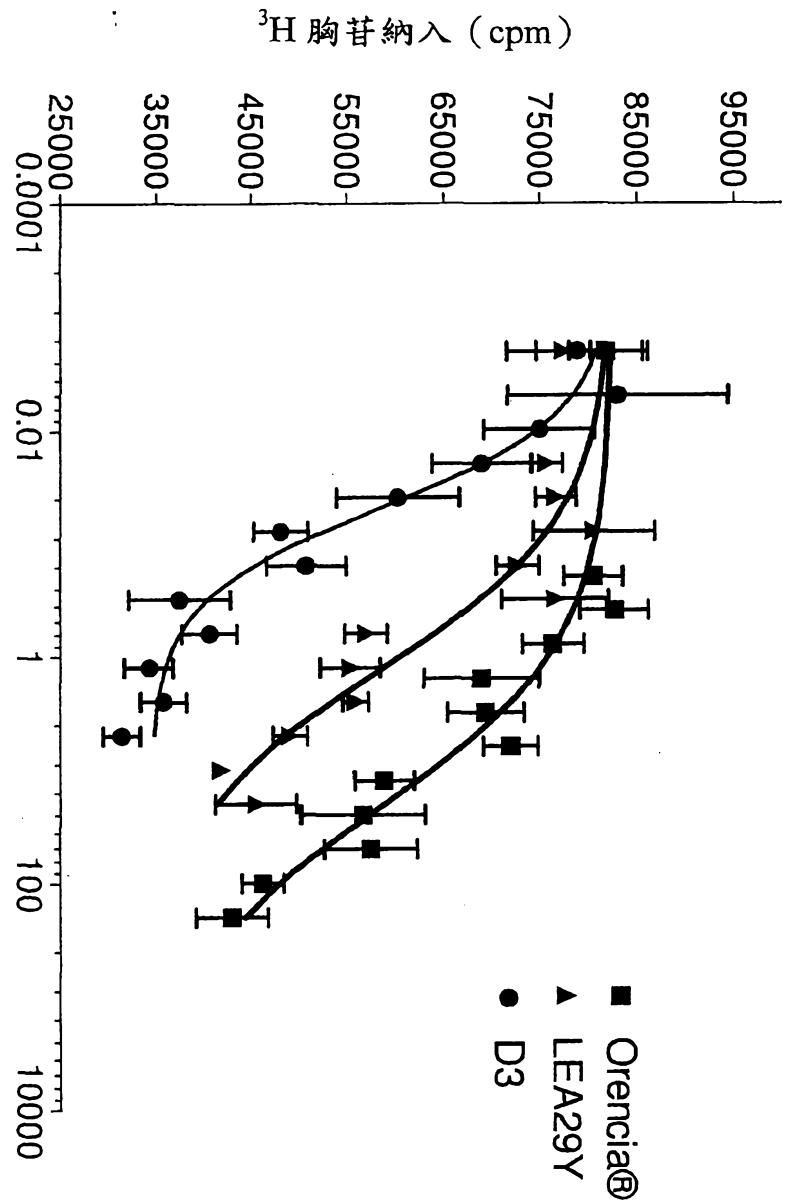

^{3}H 胸苷納入（cpm）
95000
85000
75000
65000
55000
45000
35000
25000
0.0001
0.01
1
100
10000
試驗蛋白（nM）
Orencia®
LEA29Y
D3

圖 9

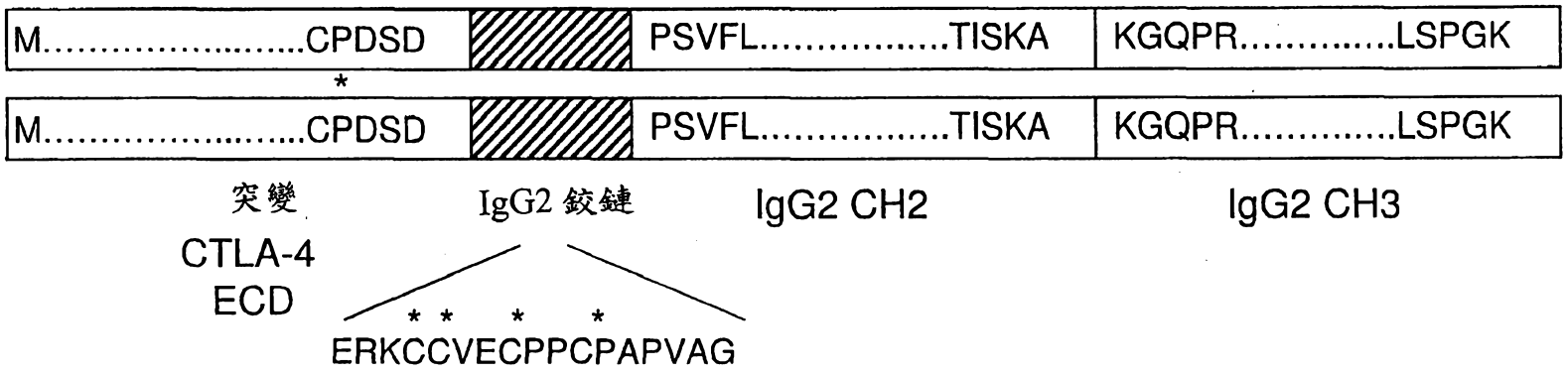


圖 10

200936607

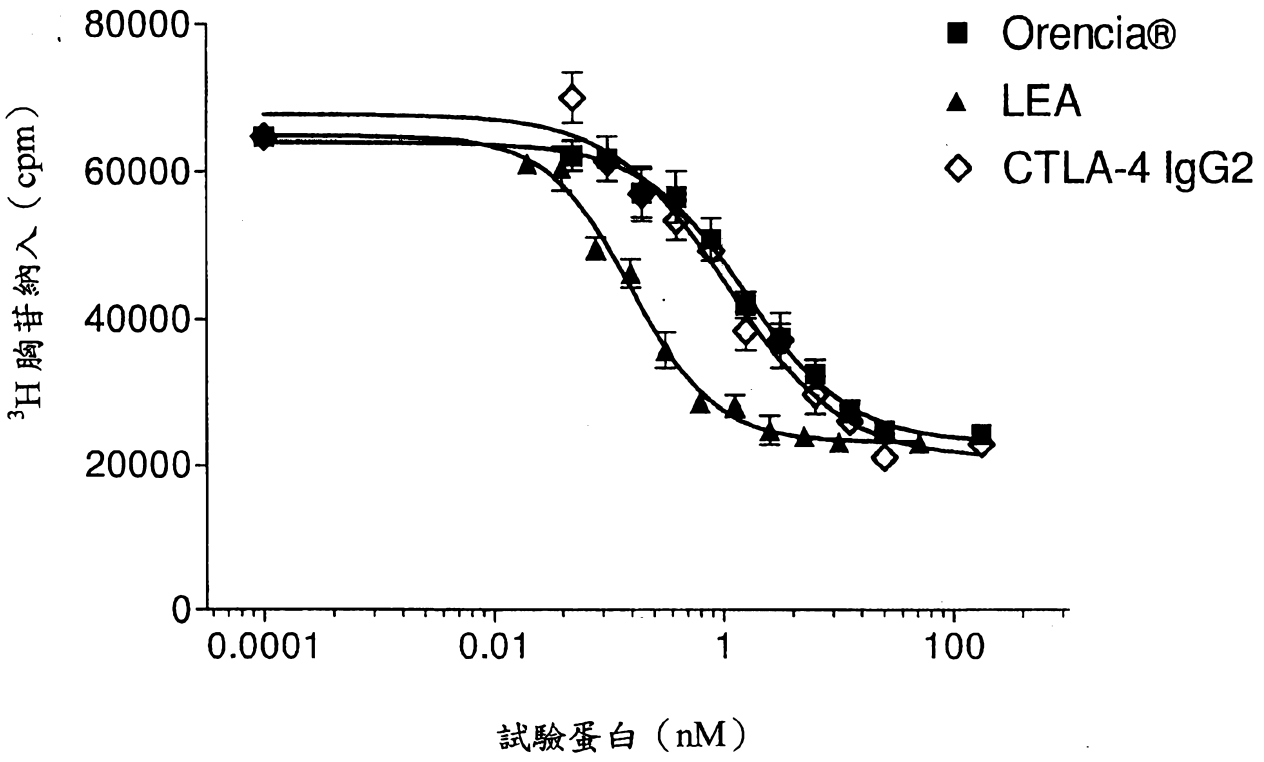


圖 11

200936607

```
                    *         20        *         40        *         60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI :  65
LEA29YECD : ............................Y.................................... :  65
D3-1      : ............................N.I.......G........M...K.D.......PS :  65
D3-2      : ........................E.......I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-3      : ........................E.....N..........G........M...K.D.......PS :  65
D3-4      : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-5      : ........................E.....N.I.......G............K.D.......PS :  65
D3-6      : ........................E.....N.I.......G........M.....D.......PS :  65
D3-7      : ........................E.....N.I.......G........M...K.........PS :  65
D3-8      : ........................E.....N.I.......G........M...K.D........S :  65
D3-9      : ........................E.....N.I.......G........M...K.D.......P. :  65
D3-11     : ........................E.....N.I.......G........M...K.D.......PS :  65
D3-12     : ........................E.....N.I.......G........M...K.D.......PS :  65
D3-14     : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-15     : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-16     : ........................E.....N.I.......G........M...K.D.......PS :  65
D3-17     : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-19     : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-20     : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-21     : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-22     : ........................E.....N.I.......G........M...K.........PS :  65
D3-23     : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-24     : ........................E.....N.I.......G........M...K.........PS :  65
D3-25     : ........................E.....N.I.......G........M...K.........PS :  65
D3-26     : ............................N.I................M...K.........PS :  65
D3-27     : ........................E.....N................M...K.........PS :  65
D3-28     : ........................E.....N.I................M...K.........P. :  65
D3-29     : ............................N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-30     : ........................E.....N.I................M...K.D.......P. :  65
D3-31     : ........................E.....N.I................M...KED.......PS :  65
```

圖 12A

200936607

```
                    *         20         *         40         *         60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI :  65
LEA29YECD : ..........................Y..................................... :  65
D3-32     : ......................E.....N.I......K.........M...K.D.......PS :  65
D3-33     : ......................E.....N.I......K.........M...KED.......PS :  65
D3-34     : ..........................N.................M...K.........PS :  65
D3-39     : ......................E.....N.................M...K.........P. :  65
D3-50     : ..........................N.................M...K.D.......P. :  65
D3-52     : ..........................N.I...............M...K.........P. :  65
D3-53     : ......................E.....N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-54     : ..........................N.................M...KE........P. :  65
D3-55     : ......................E.....N.................M...KE........P. :  65
D3-56     : ..........................N.................M...KE........PS :  65
D3-57     : ..........................N.I...............M...KED.......P. :  65
D3-58     : ..........................N.................M...KED.......PS :  65
D3-59     : ......................E.....N.I...............M...KE........P. :  65
D3-60     : ..........................N.I...............M...KE........PS :  65
D3-61     : ......................E.....N.I...............M...KE........PS :  65
D3-62     : ..........................N.I...............M...KED.......PS :  65
D3-63     : ..........................N.....................KE........P. :  65
D3-64     : ..........................N.................M....E........P. :  65
D3-65     : ..........................N.................M...K.........PS :  65
D3-66     : ..........................N.................M...K.D.......P. :  65
D3-68     : ......................E.....N.I...............M...K.D.......PS :  65
D3-69     : ......................E.....N.I...............M...K.D.......PS :  65
D3-70     : ......................E.....N.................M...K.........PS :  65
D3-71     : ..........................N.I...............M...K.D.......PS :  65
D3-72     : ......................E.....N.I...............M...K.........PS :  65
D3-73     : ......................E.....N.................M...K.........P. :  65
D3-74     : ..........................N.I...............M...K.........P. :  65
D3-75     : ......................E.....N.................M...KE........PS :  65
D3-76     : ..........................N.................M...KED.......P. :  65
```

圖 12B

200936607

```
                    *         20         *         40         *         60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI :  65
LEA29YECD : ..........................Y..................................... :  65
D1        : ......................E..H....I........N........M...K.D.......PF :  65
D1T       : ......................E..H..N.I........N........M...K.D.......PF :  65
D2        : ......................E..H..N.I........N........M...K.D.......PF :  65
D3        : ......................E.....N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D4        : ......................S.....D.I........S........M...E.D.......PT :  65
D5        : ..........................................................D.......P. :  65
D6        : ...............................I..................M.....D.......P. :  65
D20       : ......................E..H....I..................M....ED.......P. :  65
D21       : ......................SA.HN.D.I......K.S........M...EED.......PT :  65
D23       : ......................SA.HN.A.I......K.G........M...KED.......PS :  65
D24       : ......................E.....N.I......K.G........M...KED.......PS :  65
D26       : ......................EA.H..N........E.G........M...VED.......PS :  65
D27       : ......................E.....N........E.G........M...VED.......PS :  65
D28       : ......................EA.H..N..........G........M....ED.......PS :  65
D29       : ......................EA.H..D.I......K..........M....ED.......PS :  65
D31       : ......................EA.HN.D.I........G........M...VED......K.. :  65
```

圖 12C

200936607

```
                 *         80          *        100         *        120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD : ..........................................E..................... : 124
D3-1      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-2      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-3      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-4      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-5      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-6      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-7      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-8      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-9      : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-11     : ....F.....................................F..................... : 124
D3-12     : ....F.............A.......................................... : 124
D3-14     : ....F.............A.......................................... : 124
D3-15     : ....F.....................................F..................... : 124
D3-16     : ....F.......................................................... : 124
D3-17     : ....F.......................................................... : 124
D3-19     : ....F.............A.......................................... : 124
D3-20     : ....F.......................................................... : 124
D3-21     : ....F.....................................F..................... : 124
D3-22     : ....F.......................................................... : 124
D3-23     : ....F.............A.....................F..................... : 124
D3-24     : ....F.....................................F..................... : 124
D3-25     : ....F.............A.......................................... : 124
D3-26     : ....F.......................................................... : 124
D3-27     : ....F.......................................................... : 124
D3-28     : ....F.......................................................... : 124
D3-29     : ....F.......................................................... : 124
D3-30     : ....F.......................................................... : 124
D3-31     : ....F.............A.......................................... : 124
```

圖 12D

200936607

```
                  *         80          *         100         *         120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD : ....................................E..................... : 124
D3-32     : ....F.............A..................................... : 124
D3-33     : ....F.............A..................................... : 124
D3-34     : ....F.................................................... : 124
D3-39     : ....F.................................................... : 124
D3-50     : ....F.................................................... : 124
D3-52     : ....F.................................................... : 124
D3-53     : ....F.............A.................E..................... : 124
D3-54     : ....F.................................................... : 124
D3-55     : ....F.................................................... : 124
D3-56     : ....F.................................................... : 124
D3-57     : ....F.................................................... : 124
D3-58     : ....F.................................................... : 124
D3-59     : ....F.................................................... : 124
D3-60     : ....F.................................................... : 124
D3-61     : ....F.................................................... : 124
D3-62     : ....F.................................................... : 124
D3-63     : ....F.................................................... : 124
D3-64     : ....F.................................................... : 124
D3-65     : ....F.................................E..................... : 124
D3-66     : ....F.................................E..................... : 124
D3-68     : ....F.............A...................E..................... : 124
D3-69     : ....F.................................E..................... : 124
D3-70     : ....F.................................E..................... : 124
D3-71     : ....F.................................E..................... : 124
D3-72     : ....F.................................E..................... : 124
D3-73     : ....F.................................E..................... : 124
D3-74     : ....F.................................E..................... : 124
D3-75     : ....F.................................................... : 124
D3-76     : ....F.................................................... : 124
```

圖 12E

200936607

```
                *         80         *        100         *        120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD : ..........................................E..................... : 124
D1        : ....F..............A..................................... : 124
D1T       : ....F..............A..................................... : 124
D2        : ....F..............A.....................M.................. : 124
D3        : ....F..............A.....................F.................. : 124
D4        : ....F..............V.....................F.................. : 124
D5        : ....F..................................................... : 124
D6        : ....F..................................................... : 124
D20       : ....F..................................................... : 124
D21       : ....F..............V.....................F.................. : 124
D23       : ....F..............A.....................L.................. : 124
D24       : ....F..............A.....................L.................. : 124
D26       : ....F..............A.....................L.................. : 124
D27       : ....F..............A.....................L.................. : 124
D28       : ....F..............A.....................L.................. : 124
D29       : ....F..............A.....................L.................. : 124
D31       : ....F..................................................... : 124
```

圖 12F

200936607

BLOSUM62 替換矩陣

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	B	Z	X	*
A	**4**	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0	-2	-1	0	-4
R	-1	**5**	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3	-1	0	-1	-4
N	-2	0	**6**	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3	3	0	-1	-4
D	-2	-2	1	**6**	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3	4	1	-1	-4
C	0	-3	-3	-3	**9**	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1	-3	-3	-2	-4
Q	-1	1	0	0	-3	**5**	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2	0	3	-1	-4
E	-1	0	0	2	-4	2	**5**	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	1	4	-1	-4
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	**6**	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-1	-4
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	**8**	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3	0	0	-1	-4
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	**4**	2	-3	1	0	-3	-2	-1	-3	-1	3	-3	-3	-1	-4
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	**4**	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	-1	1	-4	-3	-1	-4
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	**5**	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	0	1	-1	-4
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	**5**	0	-2	-1	-1	-1	-1	1	-3	-1	-1	-4
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	**6**	-4	-2	-2	1	3	-1	-3	-3	-1	-4
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	**7**	-1	-1	-4	-3	-2	-2	-1	-2	-4
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	**4**	1	-3	-2	-2	0	0	0	-4
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	**5**	-2	-2	0	-1	-1	0	-4
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	**11**	2	-3	-4	-3	-2	-4
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	**7**	-1	-3	-2	-1	-4
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	**4**	-3	-2	-1	-4
B	-2	-1	3	4	-3	0	1	-1	0	-3	-4	0	-3	-3	-2	0	-1	-4	-3	-3	**4**	1	-1	-4
Z	-1	0	0	1	-3	3	4	-2	0	-3	-3	1	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	1	**4**	-1	-4
X	0	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-2	0	0	-2	-1	-1	-1	-1	**-1**	-4
*	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	**1**

圖 13

200936607

A.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 40-54）

```
 Q   A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
 A   G   S   Q   V   T   E   V   C   A   M   T   Y   M   K
-1   0   0   0  -2   0  -1  -2  -1   0  -1   0  -2  -1  -1
```

= -12

B.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 41-55）

```
Q  A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
   A   G   S   Q   V   T   E   V   C   A   M   T   Y   M   K
   4  -1   4   5   4   5   5   4   9   4  -1   5   7   5
```

= 59

C.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 41-55，其中胺基酸 49-50 刪除）

```
Q  A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
   A   G   S   Q   V   T   E   V   C   T   Y   M   K
   4  -1   4   5   4   5   5   4   9   0  -2  -1  -2
```

= 34

D.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 41-55，其中胺基酸 49-50 刪除）

```
Q  A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
   A   G   S   Q   V   T   E   V   C   -   -   T   Y   M   K
   4  -1   4   5   4   5   5   4   9 -12  -1   5   7   5
```

= 43

圖 14

200936607

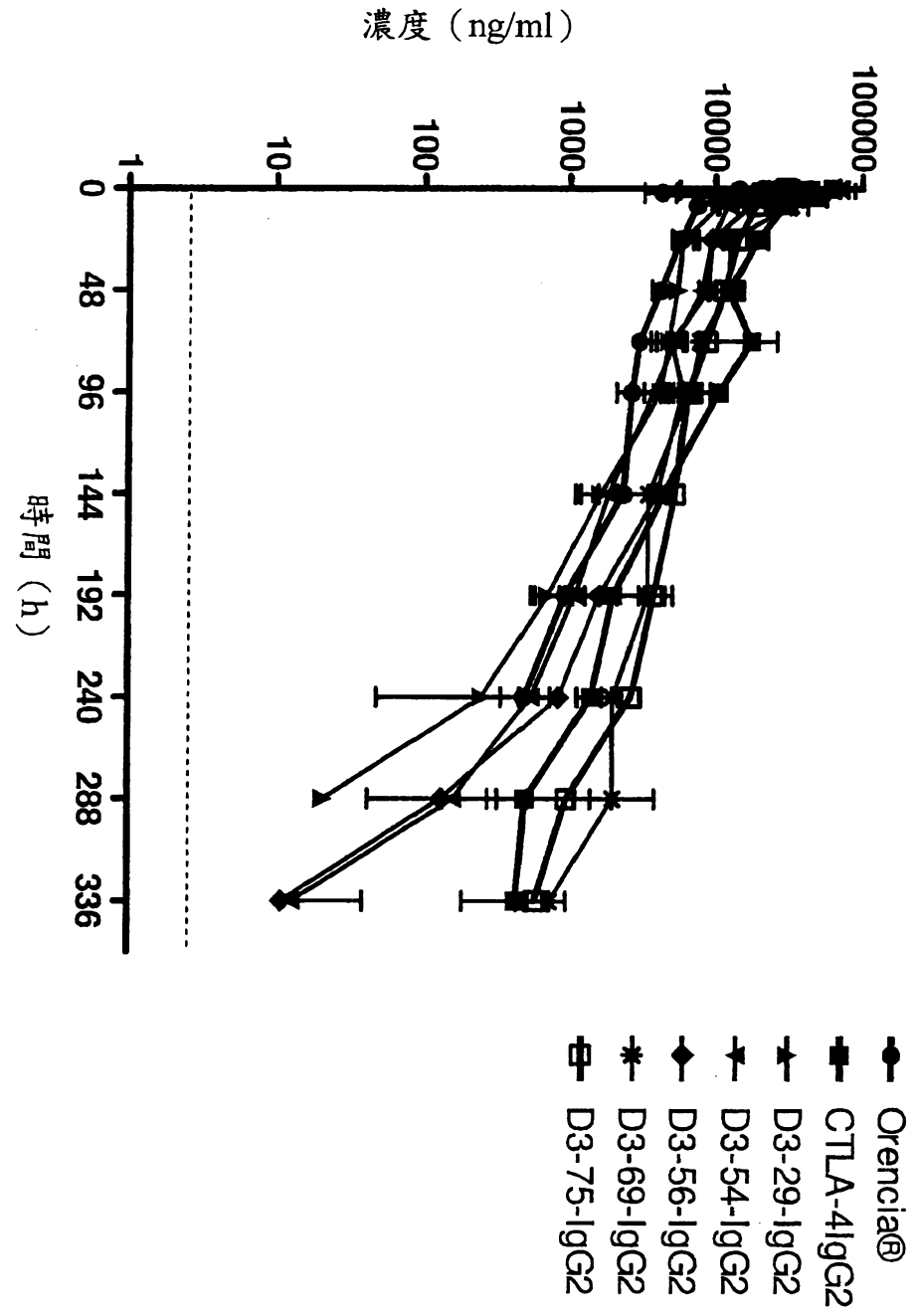

濃度（ng/ml）
100000
10000
1000
100
10
1
0
48
96
144
192
240
288
336
時間（h）
Orencia®
CTLA-4IgG2
D3-29-IgG2
D3-54-IgG2
D3-56-IgG2
D3-69-IgG2
D3-75-IgG2

圖 15A

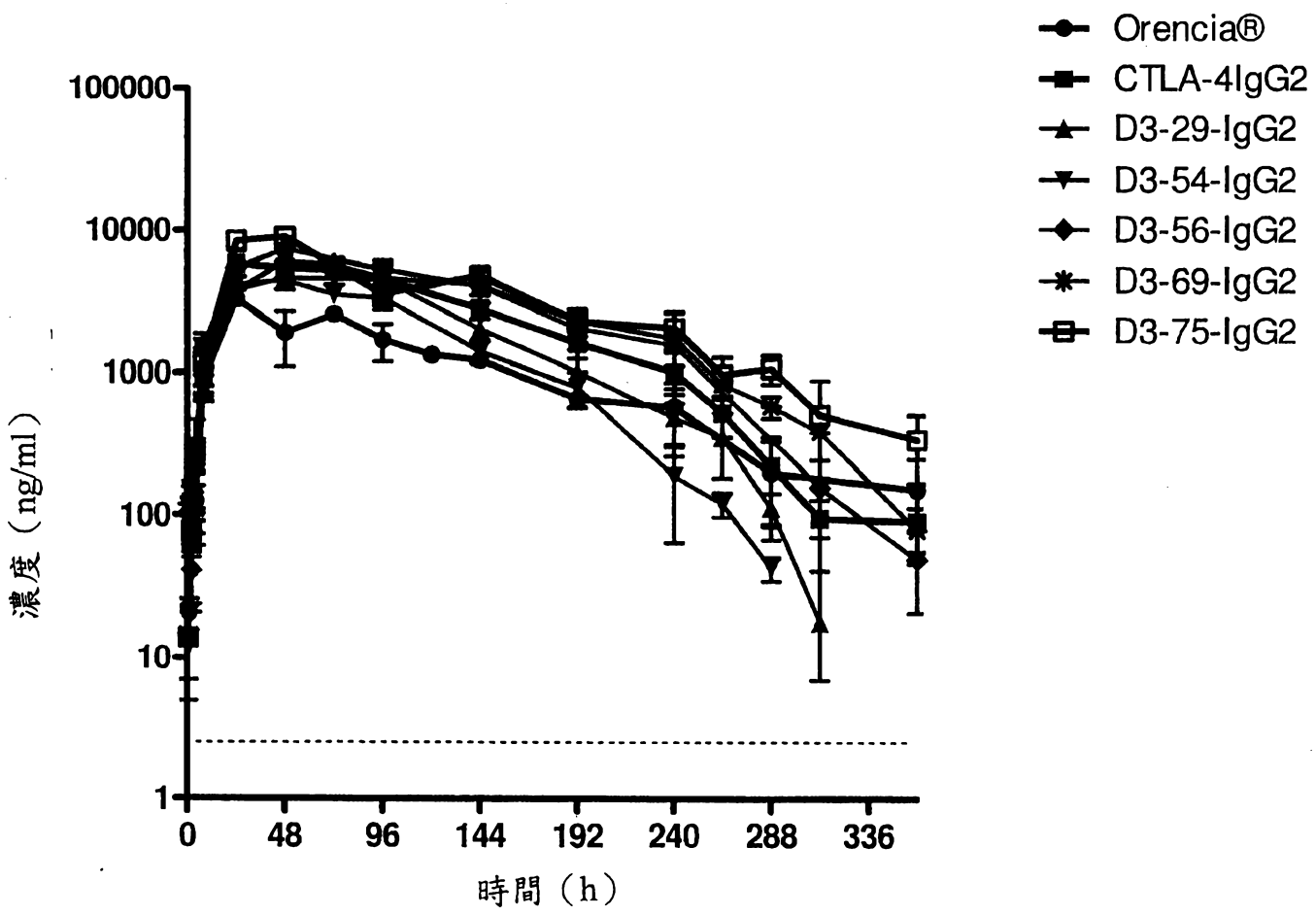


圖 15B

200936607

四、指定代表圖：

（一）本案指定代表圖為：第（ 6 ）圖。

（二）本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）

200936607

98年5月20日 補正

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：97141645

※ 申請日： 97.10.29 ※IPC 分類：

C07K	16/28	2006.01
C07K	14/705	2006.01
A61K	39/395	2006.01
A61P	37/00	2006.01

一、發明名稱：（中文/英文）

免疫抑制性多肽及核酸

IMMUNOSUPPRESSIVE POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS

二、中文發明摘要：

本發明提供免疫抑制性多肽以及編碼此等多肽之核酸。在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4多肽以及編碼突變CTLA-4多肽之核酸。其亦提供組合物以及使用此等多肽及核酸之方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides immunosuppressive polypeptides and nucleic acids encoding such polypeptides. In one aspect, the invention provides mutant CTLA-4 polypeptides and nucleic acids encoding mutant CTLA-4 polypeptides. Compositions and methods for utilizing such polypeptides and nucleic acids are also provided.

六、發明說明：

相關申請案之交叉參照

本申請案陳請美國專利申請案序號12/251,960號（2008年10月15日申請）、國際專利申請案PCT/US08/79981號（2008年10月15日申請）、美國臨時專利申請案序號60/984,631號（2007年11月1日申請）、以及美國臨時專利申請案序號61/051,215號（2008年5月7日申請）之優先權以及權益，各個此等申請案之揭示內容為所有目的而以其全文併入本文作為參考。

智慧財產權註記

遵照37 C.F.R. 1.71（e），申請人註記，此揭示內容之部份含有受到智慧財產權保護之材料。有關任何人對於存在於專利及商標局（Patent and Trademark Office）之專利檔案或記錄中之該專利文件或專利揭示內容之傳真複製，該智慧財產權之擁有者並無任何反對，但在其他方面則保留所有之智慧財產權權利。

【發明所屬之技術領域】

本發明概略係關於一種可結合CD80及/或CD86之新穎多肽，編碼此等多肽之核酸，以及製備及使用此等多肽及核酸之方法。

【先前技術】

T細胞在免疫反應之起始及調控中扮演重要角色。為產生T細胞之完全活化，其需要至少兩種迥異之信號傳導事件。第一信號係藉著表現於T細胞表面之T細胞受體（TCR）與呈遞於表現在抗原呈遞細胞（APCs）上之主要組織相容性複合體（MHC）分子中之特定抗原（Ag）間之作用而產生。第二（共刺激）信號係由表現在APCs上之共刺激性配位體與其表現在T細胞上之對應受體間之作用而產生。其中一種優勢共刺激途徑

涉及表現在APCs上之CD80 （B7-1或B7.1）及CD86 （B7-2或B7.2）配位體與主要表現在T細胞上之CD28及CTLA-4 （亦稱為CD152）間之作用。CTLA-4 （胞毒性T淋巴細胞抗原4）及CD28係作為CD80及CD86配位體之受體。

正向信號傳導係經由CD28受體中介。CD80及/或CD86配位體與CD28之結合可藉著促進免疫突觸之形成而降低T細胞活化之閾值（Viola A. et al., Science 283:680-682 （1999））。此外，CD28之共刺激可活化或增進對於T細胞之增殖及存活具有重要性之因子的形成，諸如，間白素-2（IL-2）、NF-Kb及Bcl-XL（Norton S. D. et at., J. Immunol. 149:1556-1561 （1992）; Vella A. T. et al., J. Immunol. 158: 4714-4720 （1997））。在活體內，CD28-缺陷小鼠為嚴重免疫不全，並顯示不良之抗原專一性T細胞反應（Green, J. M. et al., Immunity 1:501-508 （1994））。當T細胞在無共刺激性信號存在下活化時，其可造成T細胞乏力或耐受。

負向信號傳導係經由CTLA-4受體中介。CD80及CD86配位體各以高結合性結合CTLA-4，並可平衡衍生自CD28信號傳導之免疫增生性反應。CTLA-4信號傳導之潛在機制包括競爭結合共刺激性分子CD80/CD86 （Masteller, E. M. et al., J. Immunol. 164:5319 （2000））、藉著觸誘對於免疫突發之磷酸酶而抑制TCR信號傳導（Lee K. M. et al., Science 282:2263 （1998））、以及破壞免疫突觸（Pentcheva-Hoang T. et al., Immunity 21:401 （2004）; Chikuma S. et al., J. Exp. Med 197:129 （2003）; Schneider H. et al., Science 313: 1972 （2006））。在活體內，CTLA-4缺陷小鼠顯示深度之自體免疫表型，其特徵為大量之組織浸潤以及器官破壞（Waterhouse P. et al., Science 270:985 （1995））。

設計用以拮抗CD80/CD86共刺激途徑之療劑，諸如，可溶性人類CTLA-4-Ig，具有治療自體免疫疾病及病症之可能。本發明提供具有調控或抑制經由CD80/CD86共刺激途徑之信號

傳導之改良能力的優異分子，並提供使用此等分子以對T細胞反應進行選擇及差式操縱之方法。此等分子在如下文詳細討論之各種應用中具有有益之用途。

【發明內容】

在第一態樣中，本發明提供一種分離或重組之CTLA-4多肽，其包含與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有最多15個胺基酸殘基差異之多肽序列，其中該分離或重組之CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

根據本發明第一態樣之多肽可與SEQ ID NO:36之多肽序列具有至少90%之序列相同性，或是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。根據本發明第一態樣之多肽可包含SEQ ID NO:36之多肽序列。

根據本發明第一態樣之多肽可與SEQ ID NO:50之多肽序列具有至少90%之序列相同性，或是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。根據本發明第一態樣之多肽可包含SEQ ID NO:50之多肽序列。

根據本發明第一態樣之多肽可具有結合人類CD80或人類CD86或是其任一者之胞外域的能力。

根據本發明第一態樣之多肽可包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

根據本發明第一態樣之多肽可包含一個胺基酸取代，該取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

根據本發明第一態樣之多肽可包含二、三或四個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代，諸如取代S70F。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代，諸如取代L104E。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代，諸如取代T30N/D/A或取代T30N。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代，諸如取代S64P。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代，諸如取代A50M。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代，諸如取代M54K/V或取代M54K。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代，諸如取代I65S。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代，諸如取代N56D。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代，諸如取代G55E。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代，諸如取代M85A。

根據本發明第一態樣之多肽可包含位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代，諸如取代A24E/S或取代A24E。

根據本發明第一態樣之多肽可具有對於CD86或其胞外域之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD86或CD86胞外域之結合親和力。

根據本發明第一態樣之多肽可具有對於CD80或其胞外域之結合親和力，其係大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD80或

CD80胞外域之結合親和力。

根據本發明第一態樣之多肽可具有抑制免疫反應的能力。

根據本發明第一態樣之多肽可具有抑制T細胞活化或T細胞增殖的能力。

在第二態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽多聚體，其包含至少兩個本發明第一態樣之多肽。

在第三態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白，其包含（a）根據本發明第一態樣之多肽，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，且其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

在第四態樣中，本發明提供一種分離或重組之二聚體融合蛋白，其包含兩個根據本發明第三態樣之單體融合蛋白。

在第五態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、以及本發明第四態樣之二聚體融合蛋白。

在第六態樣中，本發明提供一種載體，其包含本發明第五態樣之核酸。

在第七態樣中，本發明提供一種分離或重組之宿主細胞，其包含本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸及/或本發明第六態樣之載體。

在第八態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑、醫藥可接受之載體或醫藥可接受之稀釋劑，以及下列之一或多種：本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞。

在第九態樣中，本發明提供一種抑制免疫反應之方法，該

方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者以抑制免疫反應：本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞，其中免疫反應因此受到抑制。

在第十態樣中，本發明提供一種本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞以用於抑制免疫反應。

在第十一態樣中，本發明提供一種使用本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白、本發明第四態樣之二聚體融合蛋白、本發明第五態樣之核酸、本發明第六態樣之載體及/或本發明第七態樣之宿主細胞於製造用於抑制免疫反應之藥物之用途。

在第十二態樣中，本發明提供一種複合物，其包含本發明第一態樣之多肽、本發明第二態樣之多聚體、本發明第三態樣之融合蛋白或本發明第四態樣之二聚體融合蛋白，以及共價連附於此種多肽、多聚體、融合蛋白或二聚體融合蛋白之非多肽分子部分，其中該複合物具有抑制免疫反應的能力。

本發明之其他態樣述於下文。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域（ECD），及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽具有對於人類CD86胞外域或人類

CD80胞外域之結合親和力，其分別係約等於或大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域或人類CD80胞外域之結合親和力，且其中該多肽視情況具有抑制免疫反應的能力。部分此等多肽具有對於人類CD86胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域之結合親和力。部分此等多肽具有對於人類CD80胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD80胞外域之結合親和力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其(a) 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及(b) 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含 (i) 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及(ii) 位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可壓抑或抑制免疫反應，其中該多肽包含多肽序列，其 (a) 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及 (b) 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一

個胺基酸取代包含S70F，其中該胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其(a) 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過11、10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基位置，其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%

之相同性，以及（b） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS: 74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，各個單體融合蛋白包含：（1）多肽，其包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，且其中在該多肽序列中位於位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，其中各個單體融合蛋白包含：（1） 突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（i）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，及（ii） 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置；以及（2） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。部分此等融合蛋白二聚體在對應於相對SEQ ID NO:159之胺基酸位置包含一或多個

取代，選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群；以及（2） Ig Fc多肽，該Ig Fc多肽視情況係IgG2 Fc多肽，其中該突變CTLA-4-Ig二聚體可結合hCD80或hCD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:56所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽（i） 可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或（ii） 可抑制免疫反應。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽（i） 可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，（ii） 可結合CD80-Ig融合蛋白及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或（iii） 可抑制免疫反應。

其亦提供一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199及SEQ ID NO:200所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有（i） 結合CD80及/或CD86以及/或是CD80及/或CD86之胞外域的能力，（ii） 結合CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或（iii） 具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222所組成之

群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含：（a） 聚核苷酸序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性；（b） （a）之互補聚核苷酸序列；或是（c） （a）或（b）之任何聚核苷酸序列之片段，其中該核酸編碼多肽，該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，(a) 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，且（b） 其中在該多肽序列中位於位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，及（b） 包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其任一者之胞外域的能

力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，具有（i）與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii）位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80/或hCD86或是其ECD，及/或可抑制免疫反應，其中該胺基酸取代視情況包含S70F，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼重組多肽二聚體，其包含兩個多肽，其中各個此種多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，以及（b）Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ

ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種表現載體，其包含：(i) 第聚核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該第多肽可結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，以及 (ii) 第二聚核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含一免疫球蛋白(Ig)多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之宿主細胞，其經編碼一融合蛋白之核酸轉染，該核酸包含：(i) 第一核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該第多肽具有結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有抑制免疫反應的能力；以及 (ii) 第二核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含一免疫球蛋白 (Ig) 多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽，其中該宿主細胞可表現該融合蛋白。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制免疫反應之方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞以抑制免疫反應，其中免疫反應因此受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種調控表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使

B7-陽性細胞接觸有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞以調控B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用，其中B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用因此受到調控。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，其中CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用因此受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制對象體內CD28-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含對一對象投予有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，其中該對象體內之內源性CD28-陽性T細胞與內源性B7-陽性細胞之作用受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種治療具有由內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞之作用所調控之免疫系統疾病或病症之對象的方法，該方法包含對需要此種治療之對象投予治療有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，其中在該內源性T細胞與表現該CD80及/或該CD86之內源性細胞間之該（等）作用受到抑制，因而治療該對象體內之免疫系統疾病或病症。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織或器官移植之排斥的方法，該方法包含對於需要之接受者對象投予治療有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞，因而抑制接受者對象對於該組織或器官移植之排斥。

在另一態樣中，本發明提供一種製備融合蛋白之方法，該方法包含：(1) 在培養基中培養經一核酸轉形之宿主細胞，其中該核酸包含：(i) 第一核苷酸序列，編碼第多肽，其與SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列具有至少95%、96%、

97%、98%、99%或100%之相同性，該多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是CD86或CD80中任一者之胞外域，以及(ii) 第二核苷酸序列，編碼Ig多肽，其包含鉸鏈區、CH2域及CH3域，因而表現該核酸並產生融合蛋白；以及(2) 回收該融合蛋白。

其亦提供一種生產多肽之方法，其包含在一種群之細胞中引入本發明之核酸，其中該核酸以可操作之方式連結可有效生產由該核酸所編碼之多肽的調控序列；在培養基中培養該等細胞以生產該多肽；以及自該等細胞或培養基中分離該多肽。

其亦提供組合物，其包含本發明之分子(如，突變CTLA-4分子)以及賦形劑、載體或稀釋劑。其亦包括醫藥組合物，其包含本發明之分子以及醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑。

本發明之其他態樣述於下文。

【實施方式】

定義

亦須明瞭，本文所用之辭彙僅係為敘述特定之聚體實例且不係意欲進行限制。除非另外定義，本文中所用之所有技術及科學辭彙具有一般熟習本發明所屬技藝者所通常明瞭之相同意義。

名辭「核酸」及「聚核苷酸」在本文中係交互使用以指稱單或雙股形式之核酸殘基(如，去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合物。除非明確限定，該等名辭涵括含有天然核苷酸之已知類似物之核酸，其與參照核酸具有類似之結合特性，並可以類似天然核苷酸之方式進行代謝。除非另有明示，特定之核酸序列亦暗含其保守性修飾變體(如，簡併密碼子取代物)及互補核苷酸序列，以及該明確指明之序列。特定言之，簡併密碼子取代物可藉由產生其中一或多個所選(或全部)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列而達成(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)；Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605 2608 (1985)；及Cassol et al.

（1992）；Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91 98 （1994））。名辭核酸或聚核苷酸係與cDNA或是由基因編碼之mRNA交互使用。

名辭「基因」廣泛係指與生物功能相關之任何核酸節段（如，DNA）。基因可包括其表現所需之編碼序列及/或調控序列。基因亦可包括未經表現之DNA核酸節段，其，例如，形成其他蛋白之辨識序列（如，啟動子、增強子或其他調控區域）。基因可自各種不同之來源取得，包括，自目標來源選殖，或是由已知或預測之序列資訊而合成，且其可包括一或多個經設計以具有所欲參數之序列。

名辭「多肽」、「肽」或「蛋白」係交互使用以指稱胺基酸殘基之聚合物。該等名辭可應用於其中一或多個胺基酸殘基係對應天然胺基酸之人工化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天然胺基酸聚合物及非天然胺基酸聚合物。在本文中，該等名辭涵括任何長度之胺基酸鏈，包括全長蛋白（亦即，抗原），其中該等胺基酸殘基係由共價肽鍵連結。

特定胺基酸聚合物或核酸聚合物之編號係「對應」或「相對」所選胺基酸聚合物或核酸聚合物之編號，當任何特定聚合物組成份（如，胺基酸、核苷酸，亦通稱為「殘基」）之位置係藉由參照所選胺基酸或核酸聚合物之相同或相當位置而指明，而非由該組成份在該特定聚合物中之實際編號位置指明。因此，舉例而言，特定胺基酸位置在特定多肽序列中之編號係對應於作為參照序列之所選多肽中的該相同或相當胺基酸位置。

名辭「相當位置」（例如，「相當胺基酸位置」或「相當核酸位置」或「相當殘基位置」）在本文中係定義為在使用本文所述之排比算法進行排比時（較佳係最適排比），與參照多肽（或試驗聚核苷酸）序列之對應位置對準之試驗多肽（或試驗聚核苷酸）序列位置（諸如胺基酸位置或核酸位置或殘基位置）。試驗多肽之相當胺基酸位置並不需要具有與該試驗多肽

之對應位置具有相同之數字位置編號。同樣，試驗聚核苷酸之相當核酸位置並不需要具有與該試驗聚核苷酸之對應位置具有相同之數字位置編號。

「突變」多肽包含與母體或參照多肽（諸如，如，野生型（WT）多肽序列）之多肽序列具有一或多個胺基酸殘基差異之多肽序列。在一態樣中，突變多肽包含與母體或參照多肽之多肽序列具有該母體或參照多肽序列殘基總數之自約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、30%、40%、50%或以上差異之多肽序列。在另一態樣中，突變多肽包含與母體或參照多肽之多肽序列具有至少約50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性之多肽序列。在另一態樣中，突變多肽包含與母體或參照多肽之多肽序列具有自1至100個或以上之胺基酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之胺基酸殘基）差異之多肽序列。突變多肽可包含與母體或參照多肽之多肽序列具有由一或多個胺基酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之胺基酸殘基）之，如，缺失、添加或取代，或是此（等）缺失、添加及/或取代之任何組合所造成差異之多肽序列。該參照或母體多肽本身可為突變多肽。

「突變」核酸包含與母體或參照核酸（諸如，如，WT核酸）之核苷酸序列具有一或多個核酸殘基差異之核苷酸序列。在一態樣中，突變核酸包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有該母體或參照核苷酸序列殘基總數之自約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、30%、40%、50%或以上差異之核苷酸序列。在另一態樣中，突變核酸包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有至少約50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性之核苷酸序列。在另一態樣中，突變核酸包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有自1至100個或以上之核苷酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之核苷酸殘基）差異之核苷酸序列。突變核酸可包含與母體或參照核酸之核苷酸序列具有由一或多個核苷酸殘基（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或以上之核苷酸殘基）之，如，缺失、添加或取代，或是此（等）缺失、添加及/或取代之任何組合所造成差異之核苷酸序列。該參照或母體核酸本身可為突變核酸。

「天然」在應用於物件時意味該物件係在自然中發現而不同於由人類人工製造。「非天然」在應用於物件時意味該物件並非天然存在（亦即，該物件不可在自然中發現）。舉例而言，非天然之多肽係指由人製備之多肽，諸如，舉例而言，藉由活體外合成或是人工製備。

目標序列之「亞序列」或「片段」係該完整序列之任何部分，其最多直到但不包括該完整目標序列。

核酸、蛋白或其他組成份係經「分離」，當其部分或完全與其正常相連之組成份分離（其他蛋白、核酸、細胞、合成試劑等）。在莫耳基礎上，經分離之種類較組合物中之其他種類更為大量。舉例而言，該經分離之種類可包含所有存在巨分子種類之至少約50%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%（在莫耳基礎上）。較佳者，該目標種類係經純化至本質上均質性（亦即，已習知之偵測方法無法在組合物中偵測到污染種類）。純度及均質性可使用技藝中所熟知之諸多技術判定，諸如，蛋白或核酸樣本之瓊脂糖或聚丙烯醯胺凝膠電泳，接著再染色進行顯像。如需要，可使用高解析技術，諸如，高效液相層析（HPLC）或類似方式而純化該材料。

名辭「純化」在應用於核酸或多肽時一般而言代表以技藝中所熟知之分析技術判定為本質上不含其他組成份之核酸或多肽（如，經純化之多肽或聚核苷酸在電泳膠、層析溶析液及/或進行密度梯度離心之媒質中形成不連續之條帶）。舉例而言，在凝膠電泳中產生本質上一道條帶之核酸或多肽為經「純化」。經純化之核酸或多肽係至少約50%純度，通常係至少約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或以上純度（在莫耳基礎上之重量百分比）。

在相關之概念上，本發明提供使組合物富含一或多種本發明分子之方法，諸如本發明之一或多種多肽或聚核苷酸。當在應用純化或富集技術之後，該分子之濃度具有實質上之增加時，組合物即富含該分子。實質上純性之多肽或聚核苷酸一般而言將會包含以特定組合物中所有巨分子種類重量計（在莫耳基礎上）之至少約55%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98、99%、99.5%或以上。

核酸或多肽係為「重組」，當其係人工或經工程處理，或是衍生自人工或經工程處理之蛋白或核酸。

名辭「重組」在用於參照細胞時，一般而言係指該細胞可複製異源核酸或是表現由異源核酸編碼之多肽。重組細胞可包含不可在天然（非重組）形式之該細胞中發現之基因。重組細胞亦包括諸等包含可在天然（非重組）形式之該細胞中發現之基因，但該等基因係經修飾或是以人工方式重新引入該細胞中者。該名辭亦涵括該等包含對於該細胞為內源性之核酸，但該等核酸已在未將該核酸自該細胞移出之情形下經修飾者；此等修飾包括該等由基因置換、定位突變、以及熟習技藝者已知之相關技術所取得者。重組DNA技術包括用於在活體外生產重組DNA，並將該重組DNA傳遞至其可經表現或擴增之細胞中，因而生產重組多肽之技術。

「重組表現基因盒」或簡稱為「表現基因盒」係一種核酸建構物，其可由重組或合成產生，具有可在與該等序列相容之宿主中造成結構基因表現之核酸元件。表現基因盒至少包括啟動子及視情況之轉錄終止信號。一般而言，重組表現基因盒包括待轉錄之核酸（如，編碼所欲蛋白之核酸）以及啟動子。其他進行表現所需或有助之因子亦可如本文所述使用。舉例而言，表現基因盒亦可包括編碼可指引經表現蛋白由宿主細胞分泌之信號序列的核苷酸序列。轉錄終止信號、增強子、以及其他可影響基因表現之核酸序列亦可包括於表現基因盒中。

「外源核酸」、「外源DNA節段」、「外源序列」或「異源核酸」在本文中係源自於對特定宿主細胞而言為外來之來源者，或者，如係來自相同來源，係自其原始形式而經修飾者。因此，宿主細胞中之異源基因包括該等對於該特定宿主細胞為內源性但已經修飾者。在本文所述應用中之異源序列修飾一般而言係經由使用定向分子進化法而產生。因此，該名辭係指一DNA節段，其對於該細胞係外來或外源，或是對於該細胞為同源，但其在該宿主細胞核酸中之位置係原始無法發現該元件者。外源核酸或外源DNA經表現以產生外源多肽。

「載體」可為任何可在宿主細胞中傳遞或維持核酸之試劑，例如，但不限於，質體（如，DNA質體）、裸核酸、病毒載體、病毒、具有一或多種多肽或其他分子之核酸複合物、以及固定於固態顆粒上之核酸。載體在下文詳細敘述。載體可作為在宿主細胞中傳遞或維持外源基因及/或蛋白之試劑。載體可轉導、轉染或轉形細胞，因而造成該細胞複製或表現對於該細胞而言非屬天然之核酸及/或蛋白，或是以該細胞而言非屬天然之方式複製或表現核酸及/或蛋白。載體可包括用以協助達成核酸進入細胞之材料，諸如，病毒顆粒、脂質體、蛋白殼或其類似者。可使用任何可將核酸傳遞至細胞中之方法；除非另有明示，名辭載體並非意指任何用以將核酸傳遞至細胞中之特定方法，或是意指任何特定細胞類型係轉導之對象。本發明

並不限於用以傳遞或維持本發明任何核酸之任何特定載體，該核酸包括，編碼可結合D80及/或CD86或其片段（如，CD80 ECD或CD86 ECD）之本發明突變CTLA-4多肽或其片段（如，突變CTLA-4 ECD）之核酸。

名辭「表現載體」一般而言係指核酸建構物或序列，其可由重組或合成產生，具有一系列之特定核酸元件，其可容許特定核酸在宿主細胞中之轉錄。表現載體一般而言包括以可操作之方式連結啟動子之待轉錄核酸。名辭「表現」包括任何涉及多肽生產之步驟，其包括，但不限於，轉錄、後轉錄修飾、轉譯、後轉譯修飾及/或分泌。

「信號肽」係一種肽（或胺基酸）序列，其一般而言係位於目標多肽前面，且其與該多肽共同轉譯，並指引或協助該多肽進入分泌系統。信號肽一般而言係與該目標多肽之胺端共價連結或融合，並可協助該目標多肽自宿主細胞分泌。信號肽一般而言在轉譯之後由該目標多肽切除。

名辭「編碼」係指核苷酸編碼一或多個胺基酸之能力。該名辭並不需要起始或中止密碼子。胺基酸序列可由聚核苷酸序列及其互補體所提供之六種不同讀框中之任一者而編碼。

名辭「控制序列」在本文中係定義為包括對於表現本發明之多肽而言係需要或是有利之所有組成份。各個控制序列可為對於編碼該多肽之核苷酸序列而言係天然或外來者。此等控制序列包括，但不限於，引導序列、聚腺苷序列、原肽、信號肽序列、以及轉錄終止子。在最小限度，控制序列包括啟動子，以及轉錄及轉譯中止信號。控制序列可與連接子共同提供，以引入可協助該等控制序列與編碼多肽之核苷酸序列編碼區域接合之特定限制位點。

名辭「編碼序列」係指可直接指定其蛋白產物胺基酸序列之核苷酸序列。編碼序列之邊界一般而言係由開放讀框（ORF）決定，其可起始於ATG起始密碼子。

核酸係「以可操作之方式連結」另一核酸序列，當其係被

置入與另一核酸序列之功能性關係中。舉例而言，啟動子或增強子係以可操作之方式連結編碼序列，如其可指引該編碼序列之轉錄。以可操作之方式連結意謂該等經連結之DNA序列一般而言係毗連者，且在必須結合兩個蛋白編碼區域時，其係毗連且符合讀框者。然而，由於增強子一般而言係在距離啟動子數千個鹼基時作用，且內含子序列可具有不同長度，部分之聚核苷酸元件可係以可操作之方式連結但並非毗連。

「宿主細胞」係任何易於經核酸轉形之細胞。

「聚核苷酸序列之實質上全長」或「多肽序列之實質上全長」分別係指聚核苷酸序列或多肽序列長度之至少約50%、60%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或以上。

「抗原」係指一種物質，其可與由特定免疫原所激發免疫反應之該（等）產物反應。參見，如，Julius Cruse et al., Atlas of Immunology 60（1999）; Richard Coico et al., Immunology: A Short Course 27-30（5th ed. 2003）。免疫反應可包含體液反應及/或細胞中介性免疫反應（如，胞毒性T淋巴細胞（CTLs））。免疫反應之產物可包括抗體及/或CTLs。抗原一般而言係巨分子（如，多肽、核酸、碳水化合物複合物、磷脂、多醣），其對於該宿主而言係外來者；稱為抗原決定區之抗原部分可反應（如，結合）免疫反應之該（等）產物，諸如，抗體或是位於T淋巴細胞上之專一性T細胞受體。抗原可（但非必須）誘發免疫反應以及與該免疫反應之該（等）產物反應。「抗原性」係指為具抗原性之狀態或特性—亦即，具有抗原之特性。抗原之專一性可在抗原對其抗體或是相反之關係中顯示；抗原一般而言可以高度專一之方式與其對應抗體反應，且並不會以相同程度之關一性與由該免疫原所誘發之其他抗體反應。「抗原量」係以可偵測之方式與由特定免疫原所激發免疫反應之該（等）產物反應之抗原量。

「免疫原」係指一種物質，其可誘發免疫反應而非免疫耐受。參見，如，Julius Cruse et al., 上述文獻於60-61；Richard Coico, 上述文獻於27-30。免疫原亦可反應（如，結合）該經誘發免疫反應之該（等）產物，該（等）產物係已經專一誘發而對抗該等抗原者。因此，所有之免疫原皆係抗原。「免疫原性」係指為具免疫原性之狀態或特性—亦即，具有免疫原之特性。「免疫原量」係可在對象體內有效誘發可偵測性免疫反應之免疫原量。免疫原可在對象體內激發強免疫反應，諸如對於至少一種病原之至少部分或完整之保護性免疫力。

「免疫調控劑」或「免疫調控性」分子，諸如，免疫調控性多肽或核酸，可調控免疫反應。「調控」免疫反應係意欲改變該免疫反應。舉例而言，在對象體內「調控」免疫反應一般而言意謂在該對象體內激發、誘發、抑制、降低、壓抑、增加、增強或以其他方式改變免疫反應。免疫反應之此種修飾可以熟習技藝者已知之方法評估，包括述於下文者。「免疫抑制劑」係一種分子，諸如多肽或核酸，其可抑制免疫反應。

在本文中，「抗體」（縮寫為「Ab」）係指一種免疫球蛋白（縮寫為「Ig」），不論係天然或是全部或部分合成製備。該名辭包括其保有抗原專一性結合能力之所有衍生物。該名辭亦涵括具有與免疫球蛋白結合域同源或大量同源之結合域的任何蛋白。此等蛋白可衍生自天然來源，或是部分或全部合成製備。抗體可為單株或多株。抗體可為任何免疫球蛋白類型之成員，包括五種人之類型中之任一者：IgA （其包括亞型IgA1及IgA2）、IgD、IgE、IgG （其包括亞型IgG1、IgG2、IgG3及IgG4）及IgM。抗體包含配對之重及輕多肽鏈，且各個此種鏈係由個別之免疫球蛋白域構成。各鏈包括恆定（C）區及可變（V）區。典型之抗體結構單元包含四聚體。各個四聚體係由兩組相同配對之多肽鏈構成，各組配對具有一條「輕」鏈（約25 kDa）及一條「重」鏈（約50-70 kDa）。根據抗體類型，重鏈以五種主要類型（γ、μ、δ、α及ε）存在，且含有約450-600

個胺基酸殘基。輕鏈共有兩種主要類型（λ及κ），且其含有約230個胺基酸殘基。舉例而言，IgG抗體係一種四聚蛋白，其包含兩條重鏈及兩條輕鏈。各條IgG重鏈含有以N-端至C-端順序連結之四個免疫球蛋白域：V_H-C_H1-C_H2-C_H3 （有時亦縮寫為VH-CH1-CH2-CH3）。此等縮寫分別係指重鏈可變域、重鏈恆定域1、重鏈恆定域2及重鏈恆定域3。重鏈亦可以抗體類型指稱，諸如，如，Cγ1，其代表IgG抗體之加瑪（γ）重鏈之第一恆定域。各條IgG輕鏈包含以N-至C-端順序連結之兩個免疫球蛋白域：V_H-C_L，其中V_H及C_L分別係指輕鏈可變域及輕鏈恆定域。

抗體之可變區（其一般而言在各條多肽鏈之N-端包含約100至110個或以上之胺基酸）包括抗原結合決定區，且因此主要負責抗原辨識及專一性。抗體間之最大程度胺基酸序列變異係存在於該可變區。大部分之序列變異存在於位在可變區中之互補決定區（CDRs）。總計共有六個CDRs，三個CDRs在各條重鏈中，而三個CDRs在各條輕鏈中，其共同形成抗原結合位點。重鏈CDRs稱為V_H CDR1、V_H CDR2及V_H CDR3，而輕鏈稱為V_L CDR1、V_L CDR2及V_L CDR3。位於CDRs外之區域稱為框架（FR）區。不同抗體之框架區可具有胺基酸殘基之差異，但其胺基酸變異性程度並不及於不同抗體可變區間所存在者。在諸多情形下，框架區為由CDRs所提出之胺基酸變異性提供了穩定或恆定的架構。

名辭「抗體片段」係指小於全長之任何抗體衍生物。抗體片段之實例包括，但不限於，含有V_H-C_H1及V_H-C_L之抗原結合片段（Fab）、含有V_H及V_L之可變片段（Fv）、含有共同連結於一條鏈中之V_H及V_L的單鏈可變片段（scFv）、以及其他V區片段，諸如，Fab'、F（ab）$_2$、F（ab'）$_2$、dsFv雙特異性單鏈抗體(diabody)、Fc及Fd多肽片段。參見Scott, T.A. and Mercer, E.I., Concise Encyclopedia: Biochemistry and Molecular Biology （de Gruyter, 3d ed. 1997），以及Watson, J.D. et al., Recombinant

DNA （2d ed. 1992） （後文稱為“Watson”）。

抗體片段可以技藝中已知之任何方法製備。舉例而言，抗體片段可藉著切斷完整抗體而進行酶性或化學製備，或者其可由編碼該部分抗體序列之基因而進行重組製備。舉例而言，抗體之片段可藉著以肽酶進行消化切割而製備。舉例而言，胃蛋白酶可在鉸鏈區中於雙硫鍵以下之位置消化切割抗體以產生F（ab'）$_2$，其係一種Fab片段之二聚體，該Fab片段本身係由雙硫鍵結合V_H-C_H1之輕鏈。F（ab'）$_2$可在溫和條件下還原以破壞鉸鏈區之雙硫鍵，因而將該（Fab'）$_2$二聚體轉化成為Fab'單體。Fab'單體本質上係具有部分鉸鏈區之Fab片段。就關於抗體及抗體片段之更詳細敘述，參見，Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. （1993）。盡管各種抗體片段係藉由完整抗體之消化切割而定義。熟習技藝者將可明瞭，此等Fab'片段可藉由化學或使用重組DNA方法而重新合成。因此，該名辭亦包括藉由修飾全抗體而製備或是使用重組DNA方法而重新合成之抗體片段。

或者，該抗體片段可為全部或部分合成製備者。該抗體片段可視情況為單鏈抗體片段。或者，該片段可包含彼此連結之多鏈，例如，藉由雙硫鍵連結。該片段亦可視情況為多分子複合物。功能性之抗體片段一般而言將會包含至少約50個胺基酸，且更一般而言將會包含至少約200個胺基酸。

免疫球蛋白或抗體分子之Fc區域或蛋白域（亦稱為Ig Fc多肽或Fc多肽）大半對應於免疫球蛋白重鏈之恆定區，且係負責各種功能，包括抗體之效應子功能。舉例而言，IgG分子之Ig Fc區域包含免疫球蛋白域CH2及CH3以及導向進入CH2之N-端鉸鏈區。鉸鏈區係位於Fc及CH1間之重鏈部分，其含有重鏈間雙硫鍵，並給予抗體分子撓性。Fc區域之恆定域可與免疫系統之細胞作用。Fc受體係可結合抗體Fc區域之蛋白。其中一種IgG抗體類型之重要Fc受體家族包括Fc加瑪受體（FcγR）。抗體對於細胞上Fc受體之結合可中介諸多抗體功能。不同之

IgG亞型對於Fc加瑪受體具有不同之親和力。一般而言，IgG1及IgG3可以高於IgG2及IgG4之親和力結合該等受體。Fc受體表現於各種不同之細胞上，其包括，如，B細胞、單核細胞、樹狀細胞、嗜中性細胞及某些淋巴細胞。Ig Fc與其受體之結合可將此等效應子細胞帶至該經結合抗原之位點，最後造成信號傳導及免疫反應，包括B細胞活化、發炎反應、胞毒反應及吞噬反應。

Ig Fc融合物係一種分子，其包含以可操作之方式連結免疫球蛋白或抗體之Fc區域的一或多個多肽（或是一或多個小分子）。參見，如，Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol. 14:52-60。因此，Ig Fc融合蛋白係一種分子，其包含以可操作之方式連結Ig Fc區域的一或多種多肽。Ig Fc融合蛋白可包含，例如，抗體之Fc區域（其可協助效應子之功能及藥物動力學），以及受體蛋白或配位體蛋白或其他蛋白或其片段之結合區或結合域。該結合區或結合域可中介目標受體或配位體之辨識（相當於抗體之抗體可變區對於抗原之辨識）。Ig Fc區域可間接或直接連結一或多個多肽或小分子（融合配對物）。可使用各種技藝中已知且如下文詳述之連接子，使Ig Fc連接融合配對物以產生Ig Fc融合物。Ig Fc融合蛋白一般而言包含直接或間接共價連結至少一個多肽之Ig Fc區域，該多肽一般而言可結合目標配位體或受體。

單株或多株抗體可以技藝中已知之任何技術製備（參見，如，Kohler & Milstein, Nature 256:495 497 （1975）；Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 （1983）；Cole et al., pp. 77 96於Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy （1985））。可修改製備單鏈抗體之技術（美國專利第4,946,778號）以產生對於本發明多肽之抗體。此外，可使用轉基因小鼠或其他生物體，包括哺乳動物，以表現人類化之抗體。可使用噬菌體展示技術以辨識可專一結合所選抗原之抗體及雜聚性Fab片段（參見，如，McCafferty et al., Nature 348:552 554 （1990）；Marks et al.,

Biotechnology 10:779 783 （1992））。

名辭「抗原表位」係指可專一結合抗體部分之抗原決定區。抗原表位通常係由分子之化學活性表面群集所構成，諸如，胺基酸或糖側鏈，且通常具有特定之三維結構特性，以及特定之電荷特性。構形性及非構形性抗原表位之差異在於前者之結合會在變性溶劑之存在下喪失而後者不會。

兩分子（如，配位體及受體）間之「專一性結合親和力」意謂一分子對於另一分子之偏好結合。分子之結合一般而言係被視為具專一性，如其平衡結合常數（如，K_A）係約$1 \times 10^2\ M^{-1}$至約$1 \times 10^{13}\ M^{-1}$或以上，其包括約10^4至$10^{13}\ M^{-1}$、約10^6至$10^{12}\ M^{-1}$、約$10^8\ M^{-1}$至$10^{11}\ M^{-1}$或約10^8至$10^{10}\ M^{-1}$。抗原及抗體間結合作用之K_A值一般而言係介於自約$10^5\ M^{-1}$至約$10^{12}\ M^{-1}$，通常係約$10^7\ M^{-1}$至約$10^{11}\ M^{-1}$，且常係約$10^8\ M^{-1}$至約$10^{10}\ M^{-1}$。K_A（M^{-1}）係藉由計算k_a/k_d而判定，其中k_a係結合速率常數且k_d係解離速率常數。k_a及k_d之單位分別係$M^{-1}\ s^{-1}$及s^{-1}。平衡解離常數K_D係K_A之倒數。$K_D = k_d/k_a$。就反應A + B <=> AB而言（代表單一配位體對單一目標蛋白（如，受體）之結合），K_D等於（[A]·[B]）/[AB]。以測量結合親和力及/或分子結合性之既已熟知技術的非限制性實例包括，如，Biacore™技術（GE Healthcare），如本文他處所討論，等溫滴定微量熱法（isothermal titration microcalorimetry）（MicroCal LLC, Northampton, MA USA）、ELISA及螢光激活細胞分選（FACS）法。舉例而言，可使用FACS或其他分選法以選擇可專一結合相關結合配對成員（諸如，受體，如，可溶性受體）之分子群（諸如，例如，細胞表面展示性配位體）。配位體-受體複合物可由，如，螢光偵測及分選（如，藉著使該複合物與可辨識該複合物之螢光抗體反應）。集合可結合相關結合配對成員（如，受體）之目標分子，再在較低濃度受體之存在下進行再次分選。藉著在漸低濃度受體之存在下進行多輪之分選（例示性之濃度範圍係由10^{-6} M降至10^{-13} M，亦即，由1微莫耳濃度（μM）降至1納莫

耳濃度（nM）或是以下（如，10^{-11} M或10^{-12} M），根據該配位體-受體作用之性質而定），可分離出對於該受體具有專一結合親和力之目標分子群。

在指稱蛋白時，語句「專一（或選擇性）結合」抗體或是「專一（或選擇性）免疫反應」係指一種結合反應，其係該蛋白存在於異質性蛋白群及其他生物製劑中之判定指標。因此，在指定之免疫分析條件下，該等經指明之抗體可以背景值之至少兩倍結合特定蛋白，且不會以顯著之量實質上結合該樣本中之其他蛋白。抗體在此等條件下之專一性結合可能需要因其對於特定蛋白之專一性而選擇之抗體。可使用各種免疫分析形式以選擇可與特定蛋白專一免疫反應之抗體。舉例而言，其慣常使用固相ELISA免疫分析而選擇可與蛋白專一免疫反應之抗體（參見，如，Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual（1988），有關可用以判定專一免疫反應性之免疫分析形式及條件之敘述）。通常而言，專一性或選擇性之反應將係背景信號或雜訊之至少兩倍，且更一般而言係超過背景值之10至100倍。

名辭「細胞因子」包括，如，但不限於，間白素、干擾素（IFN）、趨化因子、造血生長因子、腫瘤壞死因子（TNF）、以及轉形生長因子。一般而言，此等細胞因子係小分子量之蛋白，其可調控免疫系統細胞之成熟、活化、增殖及分化。

名辭「篩選」一般而言係敘述一種流程，其可辨識本發明之最佳分子，諸如，如，包括，本發明之多肽，以及包含其之相關融合蛋白，以及編碼所有此等分子之核酸。可在選擇及篩選中使用各分子之數種特性，例如，各分子在試驗系統或是在試管中、活體外或活體內之應用中誘發或改變所欲免疫反應之能力。「選擇」係一種形式之篩選，其中可藉由選擇標記之表現同時達成辨識及物理分離，其在部分基因情形下，可在其他細胞死亡時容許表現該標記之細胞存活（或是相反情形）。篩選標記包括，例如，螢光素酶、β-半乳糖苷酶、以及綠色螢光

蛋白、反應受質及其類似者。另一種選擇方式涉及根據可偵測事件之物理分選，諸如，配位體與受體之結合、受質與酶之反應或任何其他能夠直接（如，藉由使用呈色性受質或配位體）或間接（如，藉著與呈色性次級抗體反應）產生可偵測信號之物理反應。以物理分選進行之選擇可以各種不同之方法達成，其包括，但不限於，如，全細胞或微滴形式之FACS。

由於在活體外研究初級免疫反應之限制，體內試驗係部份有用之篩選方法。在部分此等試驗中，其首先將本發明之聚核苷酸或多肽引入試驗對象體內（如，哺乳動物，諸如，動物），再接著藉由分析該經免疫動物體內之免疫反應類型（如，經免疫動物血清中之抗體生產，T細胞之增殖），或是藉由研究該經免疫動物體內經誘發免疫反應之品質或強度（如，經誘發之抗體效價水準），研究經誘發之免疫反應。

名辭「對象」在本文中包括，但不限於，生物或動物，包括哺乳動物及非哺乳動物。哺乳動物包括，如，但不限於，人類、非人類靈長類（如，狒狒、紅毛猩猩、猴、大猩猩）、小鼠、狗、豬、牛、山羊、貓、兔、大鼠、天竺鼠、倉鼠、馬、綿羊或其他非人類哺乳動物。非哺乳動物包括，如，但不限於，非哺乳動物無脊椎動物及非哺乳動物脊椎動物，諸如，鳥（如，雞或鴨）或是魚。

名辭「醫藥組合物」係指適用於在對象（包括動物或人類）體內之醫藥用途的組合物。醫藥組合物一般而言包含有效量之活性劑以及載體、賦形劑或稀釋劑。該載體、賦形劑或稀釋劑一般而言分別係醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑。

名辭「有效量」係指足以產生所欲結果之物質劑量或量。該所欲結果可包含在該劑量或量之接受者體內的客觀或主觀改善情形。舉例而言，該所欲結果可包含已投予特定抗原或免疫原（或其組合物）之劑量或量之對象體內免疫反應的可測量、可偵測或可試驗性誘發、促進、增強或調控。足以產生此種結果之免疫原的劑量或量可稱為「免疫原性」劑量或量。

「預防性處理」係一種處理，其係施用於未顯示疾病、病理或病症之徵兆或症狀，或是僅顯示其早期徵兆或症狀之對象，其中該處理係為預防或降低發展該疾病、病理或病症之風險而投予。預防性處理係作用為一種對抗疾病、病理或病症之防止性處理，或是可抑制或降低疾病、病理或病症進一步發展或增強之處理。「預防活性」係一試劑之活性，該試劑在施用於未顯示疾病、病理或病症之徵兆或症狀，或是僅顯示其早期徵兆或症狀之對象時，可預防或降低發展該疾病、病理或病症之風險。「具預防用途」之試劑（如，核酸或多肽）係指可用於預防疾病、病理或病症發展，或是可用於抑制或降低疾病、病理或病症進一步發展或增強之試劑。

「治療性處理」係一種處理，其係施用於顯示病理、疾病或病症之徵兆或症狀之對象，其中該處理係為減少或消除該等徵兆或症狀而投予。「治療活性」係一試劑之活性，該試劑在施用於具有病理、疾病或病症之徵兆或症狀之對象時，可減少或消除該等徵兆或症狀。「具治療用途」之試劑（如，核酸或多肽）意謂該試劑可用於減少、治療或消除疾病、病理或病症之徵兆或症狀。

一般而言，用於本文中之術語以及下述諸多用於細胞培養、分子遺傳學、分子生物學、核酸化學、以及蛋白化學中之實驗室流程皆係一般熟習技藝者所熟知且經常使用者。標準之技術，諸如述於Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual （2nd Ed.）, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 （後文稱為“Sambrook”）以及Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.予John Wiley & Sons, Inc.之合資企業（1994，增刊至1999）（後文稱為“Ausubel”）者，可用於重組核酸方法、核酸合成、細胞培養方法、以及轉基因之納入，如，電穿孔、注射、基因槍、經由皮膚印記、以及脂質轉染(lipofection)。

一般而言，寡核苷酸合成及純化步驟係根據說明書而進行。該等技術及流程一般而言係根據技藝中之習知方法以及本文件中所提供之各種概述性參考文獻而進行。其中之流程咸信為一般熟習技藝者所熟知，且係為讀者之方便而提供。

各種其他名辭係在本文中定義或以其他方式定性。

本發明之分子及方法

本發明提供用以治療免疫系統之疾病、病症及病況之分子及方法，其包括，如，其中需要調控免疫系統（如，T細胞相關性免疫反應）者。本發明之分子（如，本發明之多肽、本發明之複合物、本發明之可溶性融合蛋白、編碼此等多肽或融合蛋白之核酸）可用於治療其中需要免疫抑制之免疫系統疾病、病症及病況，其包括，如，但不限於，自體免疫疾病、病症及病況、免疫增生性疾病、移植物相關病症之治療，以及涉及由捐贈者至接受者之組織、細胞、器官或移植物之移植的治療方法，其中需要抑制接受者體內對抗捐贈者組織、細胞、器官或移植物之免疫反應。

在一態樣中，本發明提供新穎之突變CTLA-4分子，其相較於CTLA-4分子（諸如，可結合CD80及/或CD86之野生型人類CTLA-4多肽（「hCTLA-4」）或其片段，諸如人類CTLA-4之胞外域（「hCTLA-4 ECD」））具有改良特性。如下文所詳述，其使用各種誘變及篩選策略以製備及辨識可結合CD80及/或CD86之新穎突變CTLA-4分子。特定言之，其使用此等策略以製備及辨識相較於人類CTLA-4（「hCTLA-4」）具有對於CD80（B7-1）及/或CD86（B7-2）之改良結合性，及/或相較於hCTLA-4 ECD具有對於CD80及/或CD86之改良結合親和性的CTLA-4突變分子。結合表現於抗原呈遞細胞上之內源性CD80及/或CD86配位體的本發明突變CTLA-4分子可有效抑制或阻斷此等配位體與表現於T細胞表面之內源性CD28受體的作用。因此，由T細胞表面受體CD28與B7分子（亦即，CD80及

CD86）之作用所提供之對T細胞活化具重要性的共刺激信號受到抑制或阻斷。此等T細胞並未受到最適活化，並具有較低之增殖能力。

在其中CD80或CD86配位體與CD28受體間之信號傳導受到阻斷之情形下，T細胞並未受到最適刺激而成為具活性，並因此並未受到最適誘發而進行增殖。類似者，在其中CD80或CD86配位體與CD28受體間之信號傳導受到抑制之情形下，T細胞之活化及增殖亦受到抑制。在一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，其可作用為CTLA-4信號傳導之拮抗劑。在另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，其可作用為CD28信號傳導之拮抗劑，因而抑制或阻斷T細胞相關性免疫反應；此等分子可作用為免疫抑制劑。在又一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，其可結合CD80及CD86兩者，但其對CD86具有高於對CD80之較高結合性，並因而可對CD86相關性共刺激作用產生大於對CD80相關性共刺激作用之較大程度抑制。所有此等本發明之突變CTLA-4分子預期可用於治療其中需要免疫抑制或是免疫抑制可能具有效益之疾病、病症或病況。

一種人類CTLA-4-Ig融合蛋白以及一種特定之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（兩者皆係由Bristol-Myers Squibb Co.（Princeton, NJ）研發）已經顯示可有效治療某些免疫相關性疾病或病況。Orencia®融合蛋白（亦稱為阿巴西普（Abatacept）（“ABA”））（Bristol-Myers Squibb Co.（Princeton, NJ））係一種可溶性重組二聚體融合蛋白，其係由兩個相同之單體免疫球蛋白（Ig）融合蛋白構成，經由一個雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間形成。ORENCIA係Bristol-Myers Squibb Company之註冊商標。Orencia®二聚體之各個單體Ig融合蛋白係由以其C-端融合特定突變IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:186） N-端之人類CTLA-4胞外域（SEQ ID NO:159）構成。各個此種單體融合蛋白之完整多肽序列示於SEQ ID NO:164。Orencia®二聚體係在哺乳動物表

現系統中生產，且具有92 kDa之表觀分子量。咸信Orencia®二聚體之該兩個單體Ig融合蛋白係由單一雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在位於各個hCTLA-4-突變IgG1單體位置120之半胱胺酸殘基間形成，且在該兩個突變IgG1 Fc多肽間並未形成任何雙硫鍵。

Orencia®二聚體係一種選擇性共刺激調控劑，其可藉由結合CD80及CD86並因此阻斷其與CD28之作用而抑制T細胞活化。Orencia®二聚體目前已核准用於治療罹患中度至嚴重類風濕性關節炎（RA）之人類成人。其他有關Orencia®二聚體以及其臨床適應症及有效性之資訊在orencia.com及bms.com提供於全球資訊網。

如上所註，Orencia®二聚體之各個融合蛋白單體含有人類CTLA-4胞外域。人類CTLA-4係一種膜蛋白，其瞬時表現於T細胞上。WT全長hCTLA-4之全長蛋白序列示於SEQ ID NO:160，且編碼WT全長hCTLA-4之核酸序列示於SEQ ID NO:194。人類CTLA-4包括信號肽（SP）、胞外域（ECD）、穿膜域（TD）、以及胞質域（CD），以該順序共價連結（如，SP之C-端共價連結ECD之N-端，ECD之C-端共價連結TD之N-端，而TD之C-端共價連結CD之N-端）。WT hCTLA-4 ECD多肽一般而言包含全長hCTLA-4蛋白序列（SEQ ID NO:160）之殘基38-161，且一般而言長度為124個胺基酸殘基。此一hCTLA-4 ECD多肽序列示於SEQ ID NO:159。該全長hCTLA-4蛋白之信號肽（SP）（其一般而言包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-35或1-37）會在加工過程中受到切割。參見，如，Harper et al., J. Immunol. 147（3）:1037-1044 （1991）。包含hCTLA-4蛋白胺基酸殘基1-35或1-37之人類CTLA-4信號肽序列分別示於SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216。不論該信號肽序列係示於SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216者，當該信號肽受到切割時，該成熟hCTLA-4蛋白一般而言係以位在示於SEQ ID NO:160之全長hCTLA-4蛋白序列胺基酸位置38的甲硫胺酸殘

基起始。因此，即使該hCTLA-4信號肽序列係SEQ ID NO:182者（其包含hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基1-35），該所得之成熟分泌性hCTLA-4蛋白仍係以位在全長hCTLA-4蛋白位置38的甲硫胺酸起始。分別位於全長hCTLA-4蛋白位置36及37的離胺酸（K）及丙胺酸（A）並不存在於成熟hCTLA-4蛋白中，且其咸信在加工過程中自該成熟hCTLA-4蛋白切割。成熟hCTLA-4蛋白序列之胺基酸殘基因此一般而言係將位在全長hCTLA-4蛋白位置38的甲硫胺酸殘基編號為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號；因此，組胺酸殘基佔據成熟hCTLA-4蛋白之胺基酸位置2等。Orencia®二聚體之各個單體包括示於SEQ ID NO:159之hCTLA-4 ECD多肽序列。在全長WT hCTLA-4蛋白中，該信號肽包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-37，該胞外域（ECD）包含胺基酸殘基38-161，該穿膜域（TD）包含胺基酸殘基162-182，且該胞質域（CD）包含胺基酸殘基183-223。hCTLA-4蛋白之成熟域（MD）一般而言包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基36-223，或者在部分情形下，包含胺基酸殘基37-223或38-223。

SEQ ID NO:194之核酸包含編碼信號肽序列之核酸序列（核苷酸殘基1-111）、編碼hCTLA-4 ECD之核酸序列（核苷酸殘基112-483）、編碼hCTLA-4穿膜及胞質域之核酸序列（核苷酸殘基484-669）；最後3個C-端核苷酸係TGA中止密碼子。

貝拉西普（Belatacept）（亦稱為“LEA29Y-Ig”、“LEA-Ig”或“A29YL104E-Ig”）（Bristol-Myers Squibb Co.（Princeton, NJ））係一種可溶性重組二聚體蛋白，其係由兩個相同之Ig融合蛋白構成，經由一個雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在各個單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間形成。各個單體融合蛋白係由以其C-端融合特定突變IgG1多肽N-端之突變CTLA-4胞外域多肽構成。該突變CTLA-4 ECD之多肽序列與WT人類CTLA-4 ECD具有兩個突變之差異，特定言之係位置29處以酪胺酸取代丙胺酸（縮寫為取代A29Y）以及位置104

處以麩醯胺取代白胺酸（縮寫為取代L104E），其中該人類CTLA-4 ECD中之胺基酸殘基係以位於N-端之甲硫胺酸表示胺基酸位置1而編號。各個貝拉西普之單體包括示於SEQ ID NO:186之突變IgG1 Fc多肽序列；此突變IgG1 Fc多肽與包括於Orencia®融合蛋白中之突變IgG1 Fc多肽相同。貝拉西普單體融合蛋白因此與各個Orencia®單體融合蛋白具有兩個胺基酸之差異。貝拉西普中各個單體融合蛋白之多肽序列示於SEQ ID NO:166。名稱「LEA29Y-Ig」因此反映，貝拉西普二聚體之各個單體融合蛋白係由突變CTLA-4 ECD構成，其與人類CTLA-4 ECD多肽序列具有L104E及A29Y兩個突變之差異。相較於Orencia®二聚體，貝拉西普已經顯示可以約4倍較高之結合性結合CD86，並以約2倍較高之結合性結合CD80（Larson et al., Amer. J. Transplant. 5:443-453, 444 （2005）。相較於Orencia®二聚體，貝拉西普已經顯示可以最多約10倍較高之強度在活體外抑制T細胞活化，並具有相較於Orencia®蛋白之改良體內免疫抑制強度，如以其抑制T細胞相關性抗體反應之較高能力以及其在涉及非人類靈長類之臨床試驗中對於腎同種移植存活之改良延長所顯示。相同文獻。其他有關貝拉西普以及其臨床適應症及有效性之資訊在bms.com提供於全球資訊網。

在一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD86之結合性大於Orencia®二聚體（二聚體hCTLA-4-Ig）對CD86之結合性。本發明亦提供突變之CTLA-4分子，包括新穎之可溶性重組二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD80之結合性約等於或大於Orencia®二聚體對CD80之結合性。在又另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括新穎之可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其相較於Orencia®（阿巴西普）具有抑制一或多種免疫反應（如，T細胞相關性免疫反應）之較大能力。相較於Orencia®二聚體而具有一或多種改良特性之本發明突變CTLA-4分子預期較為強效，且因此可在治療其中需

要免疫抑制之疾病、病症或病況中較Orencia®二聚體更為有效、更為有用、更為有利，包括Orencia®二聚體已核准治療及/或已經顯示可提供臨床效益之該等疾病、病症或病況，諸如，免疫疾病，包括，如，類風濕性關節炎及牛皮癬。

在又另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD86之結合性大於貝拉西普（LEA29Y-Ig）對CD86之結合性。本發明亦提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其對CD86之結合性大於貝拉西普對CD86之結合性。在另一態樣中，本發明提供突變之CTLA-4分子，包括本文所述之新穎可溶性重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其相較於貝拉西普具有抑制一或多種免疫反應（如，T細胞相關性免疫反應）之較大能力。相較於貝拉西普而具有一或多種改良特性之本發明突變CTLA-4分子預期較貝拉西普強效，且因此可在治療其中需要免疫抑制之疾病、病症或病況中較貝拉西普更為有效、更為有用、更為有利，包括貝拉西普融合蛋白已經顯示可提供臨床效益之該等疾病、病症或病況，諸如，非人類靈長類之腎同種移植存活。

可使用該等用於涉及類似對象之Orencia®臨床試驗中的方法，判定本發明分子（諸如，本發明之突變CTLA-4分子（如，下文詳述之本發明突變CTLA-4 ECD多肽或可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白））在以特定方式（如，腸外、靜脈內或皮下投藥）投與特定劑量該分子之具有免疫疾病或病症（如，類風濕性關節炎、多發性硬化、牛皮癬等）的對象體內之安全性、耐受性、藥物動力學、免疫原性、以及臨床功效。參見，如，全球資訊網址bms.com及orencia.com。舉例而言，可使用類似該等用於涉及RA病患之Orencia®臨床試驗中的方法，評估本發明突變CTLA-4分子（如，可溶性突變CTLA-4-Ig）在具有類風濕性關節炎（RA）之對象體內減少關節損傷之進展、減輕RA之徵兆及症狀（包括減輕疼痛）的有效程度。

可使用相當該等用於涉及類似對象之貝拉西普臨床試驗中的方法，判定本發明分子（如，下文詳述之突變CTLA-4 ECD多肽或可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白）在其中需要免疫抑制（如，進行來自捐增者之組織、細胞、器官或移植物之移植的對象）且其經特定方式（如，腸外、靜脈內或皮下投藥）投與特定劑量該分子的對象體內之安全性、耐受性、藥物動力學、免疫原性、以及臨床功效。參見，如，全球資訊網址bms.com。舉例而言，可使用類似該等用於涉及進行腎臟移植病患之貝拉西普臨床試驗中的方法，評估本發明突變CTLA-4分子（如，可溶性突變CTLA-4-Ig）在進行腎臟移植之受捐病患體內減少腎臟移植排斥的有效程度。

本發明分子及方法以及本發明之其他態樣在下文以額外之詳情進行討論。

本發明之多肽

本發明提供新穎之多肽，集合稱為「本發明多肽」。名辭「本發明多肽」係意欲包括本文所揭示多肽序列之變體及/或衍生物。本發明之多肽包括重組非天然或突變CTLA-4多肽，其可結合CD80及/或CD86及/或可抑制或壓抑免疫反應。本發明之多肽包括包含本發明突變CTLA-4多肽之重組融合蛋白，並包括此等融合蛋白之單體及二聚體形式。本發明之多肽包括包含一或多個本發明突變CTLA-4多肽之多聚體。本發明亦包括包含一或多個本發明突變CTLA-4多肽之複合物。部分之本發明多肽係可溶性多肽。舉例而言，如下文更為詳細敘述者，本發明包括可溶性之融合蛋白，其包含與可增進突變CTLA-4 ECD多肽之溶解度的不同多肽（諸如，如，免疫球蛋白多肽，諸如，如，Ig Fc多肽）連結之突變CTLA-4 ECD多肽。

如下文詳細討論者，在本發明之一態樣中，其使用各種誘變及篩選策略以製備及辨識可結合CD80及/或CD86之新穎多肽。特定言之，其使用此等策略以製備及辨識具有改良能力結

合CD80及/或CD86之新穎多肽，包括對於CD80及/或CD86具有改良結合親和性或結合性之新穎突變CTLA-4多肽。結合表現於抗原呈遞細胞上之CD80及/或CD86配位體的本發明多肽可干擾或阻斷此等配位體與表現於T細胞表面之CD28受體的作用。因此，由T細胞表面受體CD28與B7分子（亦即，CD80及CD86）之作用所提供之T細胞共刺激信號受到抑制或阻斷。此等多肽咸信可用於其中免疫系統（如，T細胞反應）之調控具有效益的疾病、病症及病況之預防性及治療性處理。

突變CTLA-4多肽

在一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列（如，SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID

NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72及SEQ ID NO:73）具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86或是CD80及/或CD86之多肽片段（或是其任一或兩者之ECD），及/或可調節或調控免疫反應。部分此等多肽，諸如示於SEQ ID NOS:1-73之各者，係敘述為分泌或成熟突變CTLA-4 ECD多肽。該示於SEQ ID NOS:1-73之各者中的突變CTLA-4 ECD多肽並不包括信號肽；其已在加工過程中受到切割，因而產生該成熟或分泌多肽。CD80之多肽片段可包含，如，CD80多肽之胞外域多肽，諸如，如，人類CD80 ECD多肽（“hCD80 ECD”）。CD86之多肽片段可包含，如，CD86多肽之胞外域多肽，諸如，如，人類CD86 ECD多肽（“hCD86 ECD”）。部分此等多肽可結合哺乳動物CD80及/或CD86或是其多肽片段，諸如，如，哺乳動物CD80或CD86 ECD。部分此等多肽可結合WT人類CD80（“hCD80”）及/或WT人類CD86（“hCD86”）或是其多肽片段，諸如，如，hCD80 ECD或hCD86 ECD。在部分此等方法中，至少一種免疫反應受到壓抑或抑制。

部分此等多肽具有對於hCD80或其片段(如，hCD80 ECD)之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4 ECD多肽對於hCD80或其片段之結合親和力或結合性。預測之全長hCD80多肽序列示於SEQ ID NO:195，其包括信號肽、ECD、穿膜域、以及胞質域，以該順序共價連結。該信號肽包含SEQ ID NO:195之胺基酸殘基1-34，該ECD包含胺基酸殘基35-242，該穿膜域包含胺基酸殘基243-263，且該胞質域包含胺基酸殘基264-288。hCD80 ECD之多肽序列示於SEQ ID NO:174。示於SEQ ID NO:173之核酸序列編碼WT人類CD80信

號肽（位在N-端）以及人類CD80 ECD。

部分此等多肽具有對於hCD86或其片段（如，hCD86 ECD）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4 ECD多肽對於hCD86或其片段（如，ECD）之結合親和力或結合性。預測之全長hCD86多肽序列示於SEQ ID NO:175，其包括信號肽、ECD、穿膜域、以及胞質域，以該順序共價連結，而編碼該預測全長hCD86多肽序列之例示性核酸示於SEQ ID NO:176。hCD86 ECD之多肽序列示於SEQ ID NO:180。部分此等多肽具有對於hCD86之結合親和力或結合性，其係至少約等於或大於LEA29Y ECD多肽（具有示於SEQ ID NO:168之序列）對於hCD86之結合親和力或結合性。對hCD86或hCD86 ECD之親和力或結合性分別至少等於或大於hCTLA-4 ECD或LEA29Y ECD （亦稱為“A29YL104E”或“L104EA29Y” ECD）對hCD86或hCD86 ECD之親和力或結合性的例示性本發明多肽包括，如，但不限於，包含與SEQ ID NOS:4、10-12、15、17、24、26、28、35及61中任一者之序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列者。參見，如，實例4中之表5。表5中所提出之數據反映出代表性CTLA-4-Ig與單體CD86 ECD間之單體性作用。如未另有明示，名辭LEA29Y （或是A29YL104E或L104EA29Y）係指LEA29Y ECD （或是A29YL104E或L104EA29Y ECD）。

部分此等多肽包含多肽序列，具有與人類CTLA-4胞外域之胺基酸長度約為相等之胺基酸長度。此等多肽可敘述為突變CTLA-4 ECD多肽。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其長度係約110個胺基酸至約138個胺基酸殘基、約112至約136個胺基酸殘基、約114至約134個胺基酸殘基、約116至約132個胺基酸殘基、118至約130個胺基酸殘基、約119至約129個胺基酸殘基、約120至約128個胺基酸殘基、121至約127個胺基酸殘基、約122至約126個胺基酸殘基、約123至約125個胺基酸殘基。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含一序列，

其長度係124個胺基酸殘基。例示性之多肽包括，如，但不限於，包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列的多肽，其中此種多肽可結合CD80及/或CD86 （或是其任一或兩者之ECD）。

部分此等上述之多肽（包括，如，該等分離或重組多肽，其各包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，且其可結合CD80及/或CD86 及/或其ECD）具有調節或調控免疫反應之能力。各種免疫反應中之一或多者可由此等本發明之多肽調節或調控，包括，但不限於，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2等之生成）、各種活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體等）、發炎分子之合成或生成、發炎、關節腫脹、關節壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。在部分情形下，相較於hCTLA-4或hCTLA-4 ECD，此種多肽具有壓抑或抑制至少一種此等免疫反應之較大能力。

舉例而言，部分此等多肽可在活體外分析中抑制T細胞活化或T細胞增殖。下文所示之實例4-9，舉例而言，說明包含代表性突變CTLA-4 ECD多肽序列之本發明代表性融合蛋白（諸如該等述於本文中者）在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等多肽可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投與治療或預防有效量之至少一種此等多肽。部分此等多肽預期可用於各種應用之中，包括，如，但不限於，用於治療其中需要免疫調控之疾病、病症及病況的預防或治療方法，如下文詳細討論者。此等多肽預期可用於在對象體內抑制或壓抑免疫反應之預防及/或治療方

法（如，在其中需要免疫抑制或免疫壓抑之哺乳動物（諸如，如，人類）免疫系統疾病或病症的體內治療中）、抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及其他述於本文他處之方法。

此外或是或者，部分此等多肽具有壓抑或抑制免疫反應之能力，其係至少等於或大於hCTLA-4或hCTLA-4 ECD壓抑或抑制一或多種類型免疫反應之能力。舉例而言，部分此等多肽具有在活體外及/或活體內之分析及/或應用中（諸如該等述於上文並在下文詳述者）抑制T細胞活化或增殖之能力，其係至少約等於或大於hCTLA-4或hCTLA-4 ECD在此等應用中抑制T細胞活化或增殖之能力。此外，部分此等多肽具有抑制或壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、T細胞相關性抗體反應），其係大於LEA29Y多肽（一種特定之突變CTLA-4 ECD，包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列）抑制或壓抑免疫反應之能力。下文所示之實例4-9，舉例而言，相對包含hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽之融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力而比較包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。此等分子預期可在各種治療應用中具有效益用途，包括自體免疫疾病及病症之治療，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之預防及治療方法。

部分此等多肽在彼此之間可有，如，胺基酸缺失、添加及/或取代之差異。胺基酸取代可為保守性或非保守性取代。參見，如，標題為「序列變異」之部分。

在另一態樣中，本發明亦提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合單體hCD80或單體hCD86或是其任一或兩者之ECD。部分此等多肽具有（1） 對於單體hCD86之結合親和力，其係約等於或大於單體hCTLA-4或LEA29Y多

肽對於單體hCD86或其ECD之結合親和力，以及（2） 對於單體hCD80之結合親和力，其係約等於或大於單體hCTLA-4對於單體hCD80之結合親和力。LEA29Y多肽包含SEQ ID NO:168之多肽序列。同時，部分此等多肽較單體hCTLA-4、單體hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽具有抑制一或多種本文所述免疫反應之較高能力（如，T細胞之活化/增殖、細胞因子之合成/生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、抗膠原Ab之生成及/或T細胞相關性Ab反應）。

本發明亦提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該多肽具有對於hCD86 ECD或hCD80 ECD之結合親和力，其係分別約等於或大於hCTLA-4 ECD對於hCD86 ECD或hCD80 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有對於hCD86 ECD之結合親和力，其係大於hCTLA-4 ECD（SEQ ID NO:159）或LEA29Y多肽（SEQ ID NO:168）對於hCD86 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有對於hCD80 ECD之結合親和力，其係大於hCTLA-4 ECD對於hCD80 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有抑制免疫反應之能力，在部分情形下係抑制一或多種免疫反應（包括述於上文及全文中者）之相較於hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽的較大能力。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之CTLA-4多肽變體，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD之多肽序列具有不超過15個胺基酸殘基、不超過14個胺基酸殘基、不超過13個胺基酸殘基、不超過12個胺基酸殘基、不超過11個胺基酸殘基、不超過10個胺基酸殘基、不超過9個胺基酸殘基、不超過8個胺基酸殘基、不超過7個胺基酸殘基、不超過6個胺基酸殘基、不超過5個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 其中位在該CTLA-4 ECD多肽

序列（SEQ ID NO:159）位置24、30、32、39、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104或106之胺基酸殘基，在該CTLA-4多肽變體序列中經不同之胺基酸殘基取代，其中該CTLA-4多肽變體之胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號，且其中該CTLA-4多肽變體具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域或片段的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。部分此等變體具有一或多個（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個）胺基酸取代，選自由A24E、A24S、S25A、G27H、K28N、T30N、T30D、T30A、V32I、Q39K、Q39E、D41G、D41N、D41S、A50M、A50G、M54K、M54E、M54V、G55E、G55K、N56D、D63K、S64P、I65S、I65F、I65T、S70F、M85A、M85V、M85A、L104E、L104D及I106M、I106F及I106L所組成之群。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過12個胺基酸殘基（如，不超過2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個胺基酸殘基）之差異，以及（b）在選自由對應SEQ ID NO:159胺基酸位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70及104之胺基酸殘基位置所組成之群處包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個胺基酸取代，其中該突變CTLA-4多肽之胺基酸位置係根據SEQ ID NO:159而編號，且其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域或片段的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。此等位置中之例示性胺基酸取代包括，但不限於，WT hCTLA-4 ECD中胺基酸殘基之保守性胺基酸取代A24S/E （亦即，A24S或A24E）、T30N/D/A （亦即，T30N或T30D或T30A）、V32I/L/M/V、A50M/G、M54E/V/K、G55E/K/R、N56D/A、S64P/M/C、I65S/T/F/V、S70F/Y/W、L104E/M或是其任何取代組合。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽（如，突變

CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基之差異，以及（b）其中在該多肽序列中於胺基酸位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73之多肽）對應位置之胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應。在部分情形下，該多肽與所選多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73）具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，但佔據胺基酸殘基位置41、50、54、55、56、64、65、70及85中一或多者之胺基酸係與包括於所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73者）該位置之胺基酸殘基相同，且其未經刪除或經另一胺基酸取代。部分此等多肽包含多肽序列，其與所選多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，且其在胺基酸殘基位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106中之一或多者包括與位於所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基。此等多肽可在未經指明為具有與所選序列相同之胺基酸的位置（或多個位置）具有胺基酸缺失、添加及/或胺基酸取代而不同於所選多肽序列。其包括具有對於hCD86或其片段（如，hCD86 ECD）之結合親和力或結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽對於hCD86或其片段（如，ECD）之結合親和力或結合性的此等多肽。部分此等多肽具有對於hCD80或其片段（如，hCD80 ECD）之結合親和力，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4 ECD多肽對於hCD80或其片段之結合親和力或結合性。部分此等多肽包含多肽序列，其具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之長度，如，118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125

或124個胺基酸殘基之長度。

部分此等多肽可抑制各種免疫反應中之一或多者，包括，但不限於，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。相較於hCTLA-4、hCTLA-4 ECD多肽或LEA29Y多肽，部分此等多肽具有抑制一或多種此等免疫反應之較大能力。舉例而言，部分此等多肽可在活體外分析中抑制T細胞活化或T細胞增殖。實例4-9，例如，相對包含hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽之融合蛋白而比較包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等多肽可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投與治療或預防有效量之至少一種此等多肽。部分此等多肽預期可用於各種應用之中，包括，如，但不限於，用於治療其中需要抑制免疫反應之免疫系統疾病、病症及病況的預防或治療方法，其包括，如，用於治療自體免疫疾病及病症之預防及/或治療方法，抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及其他述於本文他處之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽序列具有不超過10個胺基酸殘基、不超過9個胺基酸殘基、不超過8個胺基酸殘基、不超過7個胺基酸殘基、不超過6個胺基酸殘基、不超過5個胺基酸殘基、不超過4個胺基酸殘基、不超過3個胺基酸殘基、不超過2個胺基酸殘基或不超過1個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基）之差異，以及（b）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘

基位置，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應），諸如，在下文詳述之活體外或活體內方法及/或分析中。部分此等多肽包含多肽序列，其長度係124個胺基酸殘基。部分此等多肽包含2、3、4、5或6個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159所示多肽序列中選自由胺基酸殘基位置50、54、55、56、64、65、70或85所組成之群的位置。部分此等多肽尚包含胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置104及/或30之胺基酸殘基位置。部分此等多肽包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置70（視情形為S70F）、位置64（視情形為S64P）、位置50（視情形為A50M/G，如，A50M、A50G）、位置54（視情形為M54K/V，如，M54K）、位置65（視情形為I65S）、位置56（視情形為N56D）、位置55（視情形為G55E/K，如，G55E、G55K）、位置85（視情形為M85A）及/或位置24（視情形為A24E/S，如，A24E）。任何此等多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104（視情況係L104E/D，如，L104E）、位置30（視情況係T30N/D/A，如，T30N、T30D或T30A）及/或位置32（視情況係V32I）。在部分情形下，該多肽包含一或多個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此等多肽具有對於CD86（如，hCD86）或CD86 ECD（如，hCD86 ECD）之結合親和力，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4 ECD對CD86或CD86 ECD之結合親和力。部分此等多肽具有對於CD80（如，hCD80）或CD80 ECD（如，hCD80 ECD）之結合親和力，其係分別大於單體hCTLA-4

ECD對CD80或CD80 ECD之結合親和力。

部分此等多肽具有壓抑或抑制一或多種免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成等），諸如，在試管中及/或在活體中。部分此等多肽可以大於hCTLA-4、hCTLA-4 ECD或LEA29Y多肽之程度抑制一或多種此等免疫反應。此等多肽預期可在各種治療應用中具有效益用途，包括用於治療自體免疫疾病及病症之預防及/或治療方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之預防及/或治療方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，以及（b） 包含一或多個取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或可在活體外分析及/或活體內方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、關節腫脹或壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應等）。此等多肽預期可用於治療罹患其中免疫抑制療法可具有效益之疾病、病症及病況的病患，其包括，如，用於治療自體免疫疾病及病症之治療及預防方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之預防及治療方法。

本發明亦提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的任何多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii） 位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中

該多肽可結合hCD80及/或hCD86或是其任一者之胞外域，及/或可在活體外分析及/或活體內方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、關節或壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應等）。部分此等多肽包含相對於所選序列之下列一或多者：位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基、位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基、位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基、位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基、位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基、位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基、位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基、以及位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。此等多肽預期可在各種應用中具有效益用途，包括用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

舉例而言，在一非限制性之態樣中，本發明包括一種分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其包含（i）與SEQ ID NO:24多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii）位在對應於SEQ ID NO:24多肽序列位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可在活體外及/或活體內抑制免疫反應。部分此等多肽包含相對SEQ ID NO:24多肽序列之下列至少一者：位在位置24之麩胺酸殘基、位在位置30之天冬醯胺殘基、位在位置32之異白胺酸殘基、位在位置50之甲硫胺酸殘基、位在位置54之離胺酸殘基、位在位置55之麩胺酸殘基、位在位置56之天冬胺酸殘基、位在位置64之脯胺酸殘基、位在位置65之絲胺酸殘基、以及位在位置104之麩胺酸殘基。

本發明亦包括一種分離或重組之多肽（如，突變CTLA-4

ECD多肽），其可結合hCD80及/或hCD86 （以及/或是其任一或兩者之ECD），及/或可抑制免疫反應（如上所述），如，在活體外及/或活體內，其中該多肽包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號。該多肽可進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。此等多肽預期可用於各種應用中，包括用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞、組織或移植物移植排斥之方法。

本發明亦包括一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可在活體外及/或活體內抑制如上所述之免疫反應。該多肽可包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。此等多肽預期可用於各種應用中，包括用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i） 與選自由SEQ ID NOS:36-46及55所

組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%或99%序列相同性，以及（ii） 位在該所選多肽序列胺基酸位置55之麩胺酸殘基，其中該多肽可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應。可受到抑制之免疫反應包括，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此種多肽序列可進一步包含位於胺基酸位置70之苯丙胺酸殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置64之脯胺酸殘基及/或位於位置30之天冬醯胺殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置50之甲硫胺酸殘基及/或位於位置54之離胺酸殘基。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i） 與選自由SEQ ID NOS:28、30、36-46、55-57及65-73所組成之群的多肽序列之至少95%、96%、97%、98%或99%序列相同性，以及（ii） 位在該所選多肽序列胺基酸位置55之麩胺酸殘基，其中該多肽可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應，諸如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、發炎分子之生成、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此種多肽序列可進一步包含位於胺基酸位置70之苯丙胺酸殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置64之脯胺酸殘基及/或位於位置30之天冬醯胺殘基。此種多肽序列可進一步包含位於位置50之甲硫胺酸殘基及/或位於位置54之離胺酸殘基。

上述之任何本發明多肽可進一步包含可協助該多肽分泌之肽。因此，在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含（a） 如上所述之任何多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），以及（b） 可協助該經表現之多肽自宿主細胞分泌之肽。該肽視情況係一種信號肽。該信號肽之C-端一般而言共價

連結該多肽之N-端。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-35、1-36或1-37的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

上述之任何本發明多肽可進一步包含穿膜域及/或胞質域。因此，在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之多肽，其包含(a) 上述之任何本發明多肽(如，上述之突變CTLA-4 ECD)，以及(b) 穿膜域。此種蛋白可視情況進一步包含如上所示之信號肽，其中該信號肽之C-端共價連結該本發明多肽之N-端。該信號肽之C-端一般而言共價連結該穿膜域之N-端。該穿膜域之C-端一般而言共價連結該胞質域之N-端。在部分情形下，該穿膜域包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基162-182的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，該胞質域包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基183-223的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。任何上述之多肽可包含一或多個經糖基化或聚乙二醇化之胺基酸殘基。

本發明亦包括一種分離或重組之多肽多聚體，其包含二或多個多肽，其中至少一個該多聚體之諸等多肽係如本文所述之本發明突變CTLA-4多肽(如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig)。此種多聚體包含至少一個本發明之多肽，且可進一步包含並不一定須為本發明多肽之至少一個其他多肽。舉例而言，該多聚體可包含至少一個本發明之多肽，以及至少一個其他多肽，其可為，如，野生型多肽(如，hCTLA-4 ECD或hCTLA-4-Ig)，及或至少一種其他突變多肽(諸如，非本發明

多肽之突變多肽）。該多聚體（或多聚體多肽）中之部分或全部多肽可彼此相同，或者，在部分情況下，該多聚體中之全部多肽可彼此不同。在部分情況下，該多肽多聚體係包含兩個本發明多肽之二聚體，該等本發明多肽可視情況為相同之多肽（亦即，同質二聚體）或是不同之多肽（亦即，異質二聚體）。在部分情況下，該多肽多聚體係包含四個本發明多肽之四聚體。該四聚體可包含四個相同之多肽（亦即，同質四聚體），或是四個本發明多肽之任何組合，以使至少一個多肽不與其他三個多肽相同（亦即，異質四聚體）。本發明亦包括包含四個相同WT CTLA-4 ECD多肽（如，hCTLA-4 ECD）或四個相同WT CTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-Ig）之四聚體。在部分情況下，該多聚體可結合CD80及/或CD86（以及/或是其任一或兩者之ECD），及/或可在活體外及/或活體內之方法中壓抑或抑制免疫反應（如，T細胞之增殖或活化、細胞因子之生成等）。相較於hCTLA-4或hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2或Orencia®蛋白），部分此等多聚體具有在活體外及/或活體內壓抑或抑制免疫反應之較大能力。該等多聚體之諸等多肽可彼此連結，諸如，藉由共價連結，諸如，經由一或多個多肽中之一或多個半胱胺酸間之雙硫鍵。

部分此等本發明之四聚體包含類似抗體之結構，但其中抗體之可變域各經任何本文所述本發明突變CTLA-4 ECD多肽置換。抗體之重鏈包含一重鏈可變域（V_H），融合至一免疫球蛋白（Ig） CH1域（如，IgG2 CH1），其又融合至一鉸鏈。該鉸鏈融合至Ig CH2域（如，IgG2 CH2），其又融合至Ig CH3域（如，IgG2 CH3）。抗體之輕鏈包含一輕鏈可變域（V_L），融合至Ig C κ（C_κ）或C λ（C_λ）域。該兩條重鏈及兩條輕鏈藉由一或多個經由該等重及輕鏈中之半胱胺酸殘基所形成之雙硫鍵而彼此共價連結。本發明包括突變CTLA-4四聚體，其中該等重及輕鏈之可變域各經本發明之突變CTLA-4 ECD多肽置換。因此，此種四聚體包含兩條輕鏈及兩條重鏈。各條輕鏈

包含突變CTLA-4 ECD多肽，融合至Ig C_κ或C_λ域。各條重鏈包含突變CTLA-4 ECD，融合至Ig CH1域（如，IgG2 CH1），其又融合至一鉸鏈。該鉸鏈融合至Ig CH2域（如，IgG2 CH2），其又融合至Ig CH3域（如，IgG2 CH3）。該兩條重鏈及兩條輕鏈藉由一或多個經由該等重及輕鏈中之半胱胺酸殘基所形成之雙硫鍵而彼此共價連結。此種四聚體可敘述為CTLA-4-Ig四聚體。用以建構此種CTLA-4-Ig四聚體之方法係為已知，且可由熟習技藝者明瞭。包含一CD4多肽且可中和原代HIV第1型分離物之四聚體CD4-Ig建構物述於Allaway, G.P. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 11（5）:533-9 （1995）。該四聚體可包含四個相同之突變CTLA-4 ECD多肽，或是四個本發明突變CTLA-4 ECD多肽之任何組合，以使至少一個突變CTLA-4 ECD不與其他三個突變CTLA-4 ECD多肽相同。部分此等四聚體可以相較於hCTLA-4 （或hCTLA-4-Ig）之較高結合親和力結合CD80及CD86。部分此等四聚體壓抑或抑制免疫反應；在部分情形下，此種四聚體相較於hCTLA-4或hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2或Orencia®）具有在活體外分析或活體內應用中壓抑或抑制免疫反應（如，T細胞之增殖或活化、細胞因子之生成等）之較大能力。本發明之多聚體預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

本發明亦包括一種分離或重組之複合物多聚體，其包含二或多個複合物，其中至少一個該等複合物係本發明之複合物，其包含本發明之突變CTLA-4多肽（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）。該多聚體中之部分或全部複合物可彼此相同，或者該多聚體中之全部複合物可彼此不同。在部分情況下，該複合物多聚體係包含兩個複合物之二聚體，或是包含四個複合物之四聚體。部分此等複合物多聚體可結合CD80及CD86（或是其任一或兩者之ECD），及/或可在活體外及/或活體內壓抑或抑制免疫反應。多聚體中之諸等複合物分子可彼此連結，諸

如，藉由共價連結，諸如，經由一或多個複合物中之一或多個半胱胺酸間之雙硫鍵。

本發明包括一種分離或重組之多肽二聚體，其包含任何兩個上述之本發明多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），其中該二聚體具有對於人類CD86或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD86或其胞外域之結合性。

本發明包括分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個上述之本發明多肽（如，上述之突變CTLA-4 ECD），其中該二聚體具有對於hCD80或其ECD之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）之二聚體對於hCD80或其ECD之結合性。舉例而言，在一非限制性之態樣中，該二聚體可包含兩個多肽，其中各多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，且各多肽可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應。在另一非限制性之態樣中，該二聚體可包含兩個多肽，其中各多肽與hCTLA-4 ECD之多肽序列（SEQ ID NO:159）具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置；且該多肽視情況尚包含取代L104E，且各多肽可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應。

在部分情形下，該二聚體具有對於hCD80或其ECD之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽之二聚體對於hCD80或其ECD之結合性。在部分情形下，該二聚體具有對於hCD86或其ECD之結合性，其係分別大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體對於hCD86或其ECD之結合性，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。在部分情形下，該二聚體分別係以小於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽

之二聚體自結合之hCD86或其ECD解離之速率而自結合之hCD86或其ECD解離。在部分情形下，該二聚體分別係以小於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體自結合之hCD86或其ECD解離之速率而自結合之hCD86或其ECD解離，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

在部分情形下，該二聚體分別係以大於包含兩個hCTLA-4 ECD多肽之二聚體與hCD86或其ECD結合之速率而與hCD86或其ECD結合。在部分情形下，該二聚體分別係以大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體與hCD86或其ECD結合之速率而與hCD86或其ECD結合，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

在部分情形下，此種包含突變CTLA-4 ECD之二聚體相較於包含兩個人類CTLA-4胞外域或兩個LEA29Y多肽之二聚體具有抑制免疫反應（如，T細胞之增殖或活化、細胞因子之生成等）之較大能力。

部分此等二聚體具有小於包含兩個hCTLA-4 ECD或兩個LEA29Y多肽之二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。部分此等二聚體具有小於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D），各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

相較於相同效價之全長hCTLA-4多聚體（亦即，包含相同數目全長hCTLA-4多肽之多聚體，部分包含至少兩個本發明多肽之此等多聚體（如，包含兩個本發明突變CTLA-4 ECD多肽之二聚體）具有抑制免疫反應之增進能力。相較於相同效價之hCTLA-4 ECD多聚體（亦即，包含相同數目hCTLA-4 ECD多肽之多聚體，部分包含至少兩個本發明多肽之此等多聚體具有抑制免疫反應之增進能力。

上述之任何本發明多肽可進一步包含可增進溶解度之其他多肽序列，諸如，免疫球蛋白（Ig）多肽序列，因而形成，

如，可溶性融合蛋白，其如下文詳細討論。多肽多聚體之各個多肽可進一步包含可增進溶解度之其他多肽序列，諸如，Ig多肽序列，因而形成，如，可溶性融合蛋白。因此，舉例而言，如上所述包含二或多個本發明多肽之二聚體的各個多肽可進一步包含可增進溶解度之其他多肽序列，諸如，Ig多肽序列，因而形成，如，可溶性融合蛋白。

此等本發明之多肽及二聚體預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

如先前所討論，成熟hCTLA-4蛋白序列一般而言係以位在示於SEQ ID NO:160之全長hCTLA-4蛋白序列胺基酸位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟hCTLA-4蛋白序列之胺基酸殘基一般而言係將此甲硫胺酸殘基編號為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。

部分之本發明突變CTLA-4多肽（包括單體以及二聚體融合蛋白以及多具性多肽）在對應位於典型hCTLA-4/hB7-2結合界面（參見，如，Schwartz et al., Nature 410:604-608 （2001））外之成熟hCTLA-4蛋白序列胺基酸位置的胺基酸位置包括至少一個胺基酸取代，其包括，但不限於，例如，胺基酸位置24、41、54、55、56、64、65、70及85中之任一者。一般而言，一般熟習技藝者將不會預期，位在上述位置（24、41、54、55、56、64、65、70及/或85）之胺基酸取代，或是選自位置24、41、54、55、56、64、65、70及85之群的一或多個取代之任何組合，可具有增進hCTLA-4對hB7-2之結合親和力或結合性的能力，具有抑制CD28-陽性細胞與B7-2-陽性細胞作用之增進能力，或是提供相較於，如，hCTLA-4 ECD或hCTLA-4-Ig之壓抑或抑制免疫反應的較大能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之合成或生成、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應及其類似者）。同時，一般熟習技藝者將不會預期，位在任何上述位置（24、41、

54、55、56、64、65、70及/或85）或是此等位置之任何組合的本文所述特定胺基酸取代或是特定胺基酸取代之組合，可具有增進hCTLA-4對hB7-2之結合親和力或結合性的能力，具有抑制CD28-陽性細胞與B7-2-陽性細胞作用之增進能力，或是提供相較於，如，hCTLA-4 ECD或hCTLA-4-Ig之壓抑或抑制免疫反應的較大能力。

突變CTLA-4融合蛋白

本發明亦提供新穎之分離或重組融合蛋白，其包含第多肽（其係至少一種上文及全文所述之本發明多肽（諸如，本發明之突變CTLA-4多肽，諸如，如，突變CTLA-4 ECD多肽））融合第二多肽，因而形成融合蛋白。該第二多肽一般而言可協助該該第多肽之分泌或表現。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括該等包含辨識為SEQ ID NOS:1-73之序列者。本發明包括融合蛋白，其包含免疫球蛋白（Ig）域（諸如，Ig Fc域）融合或連富於本發明之生物活性分子部分（諸如，本發明之突變CTLA-4多肽）。本發明之融合蛋白咸信可作為預防及/或治療劑，用於各種其中免疫調控及/或免疫抑制具有效益之免疫系統疾病及病症及病況、用於診斷分析、以及用以製備具有免疫調控及/或免疫抑制活性或特性之藥物或試劑，如本文他處詳細討論。

包含突變CTLA-4多肽及Ig多肽（如，Ig Fc）之本發明融合蛋白一般而言稱為CTLA-4-Ig融合蛋白。任何此等本發明之融合蛋白，包括下文及實例中所詳述之單體及二聚體本發明融合蛋白，可包含，諸如，如，Ig Fc多肽作為Ig多肽，如本文以及上及下文她處所述。該第二多肽可直接連結該第多肽。舉例而言，該第二多肽（如，Ig多肽，諸如，Ig Fc多肽）之N-端可與該本發明第多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽）之C-端直接共價融合。或者，該第二多肽可間接連結該第多肽，諸如，其中在該第一及第二多肽間包括一包含1、2、3、4、5、6、7、8、

9或10個或以上胺基酸殘基之連接子胺基酸序列的情形下。在其中包括連接子之情形下，該胺基酸連接子序列之N-端一般而言係與該第多肽（如，突變CTLA-4 ECD）之C-端共價融合，而該第二多肽（如，Ig多肽，諸如，Ig Fc）之N-端一般而言則與該胺基酸連接子序列之C-端共價融合。

在部分情形下，該第二多肽包含Ig多肽之至少一部份，諸如，如，Ig重鏈恆定區之一或多個蛋白域。該第二多肽可包含Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。在部分情形下，該第二多肽包含WT Ig多肽之Fc域（亦即，WT Ig Fc多肽），諸如，如，WT人類Ig多肽之Fc域（亦即，WT人類Ig Fc多肽）。如他處所論，該Ig多肽可來自各種生物種，包括，如，哺乳動物，如，人類、小鼠、非人類靈長類（如，猴、大猩猩）、貓、狗、馬等，且可來自各種類型（如，IgG、IgM、IgE等）及亞型（如，對IgG而言包括IgG1、IgG2、IgG4等），且可包含任何此種Ig多肽之Fc域或部分。此等各種生物種之Ig多肽的胺基酸及核酸序列係技藝中所已知。

在一態樣中，本發明提供新穎之分離或重組融合蛋白，其各包含上述之本發明分離或重組突變CTLA-4多肽（如，突變CTLA-4 ECD)），其在C-端直接或間接（經由胺基酸連接子序列）共價連結或融合Ig Fc多肽（亦即，Ig多肽之Fc域）之N-端。任何本發明之融合蛋白，包括下文及實例中所詳述之本發明單體及二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，可包含如本文以及上及下文他處所述之Ig Fc多肽。該Ig Fc多肽一般而言包含Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。該Ig Fc多肽可衍生自各種生物種，包括，如，人類、小鼠、靈長類等，且可包含野生型Ig Fc多肽（如，WT IgG1、IgG2或IgG4）。例示性之人類IgG Fc多肽包括，如，但不限於，人類IgG1、人類IgG2、人類IgG4等。例示性人類IgG1 Fc之多肽序列示於SEQ ID NO:185。例示性人類IgG2 Fc多肽之多肽序列分別示於SEQ ID NO:184及218。或者，該Ig Fc多肽可包含突變Ig多肽。舉例而言，在突

變CTLA-4-Ig融合蛋白中可包含其中一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸（如，絲胺酸殘基）取代之突變IgG1 Fc，因而消除兩個Ig鏈間所形成之一或多個雙硫鍵，或是其中一或多個脯胺酸殘基已經另一胺基酸（如，脯胺酸殘基）取代者，以降低效應功能（較低之Fc受體結合）。例示性突變IgG1 Fc多肽之多肽序列示於SEQ ID NO:186。本發明包括分離或重組之融合蛋白，諸如，突變CTLA-4-Ig二聚體或突變CTLA-4-Ig單體，其包含至少一種上述之重組突變CTLA-4多肽，其在C-端連結重組Ig Fc多肽（亦即，Ig多肽之Fc域）之N-端，該Ig Fc多肽包含一胺基酸序列，與選自由SEQ ID NOS:184 （人類IgG2 Fc多肽）、185 （人類IgG1 Fc多肽）、186 （突變IgG1 Fc多肽）及218 （無C-端離胺酸（K）殘基之人類IgG2 Fc 多肽）所組成之群的胺基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。

在一態樣中，本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之預測多肽序列包含下列節段：信號肽序列，其可協助該融合蛋白之分泌（如，hCTLA-4信號肽（SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216））；突變CTLA-4 ECD多肽，該突變CTLA-4 ECD多肽一般而言但非必須包含自約118至130個胺基酸殘基之長度，且通常係約124個胺基酸殘基；以及Ig Fc多肽。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括該等述於上及下文者。在部分情形下，在該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端與該人類Ig Fc多肽之N-端間並不包括胺基酸連接子序列；亦即，在該突變CTLA-4-Ig融合蛋白中，該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端係直接共價融合該Ig Fc多肽之N-端。然而，如需要，突變CTLA-4-Ig可在該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端與該人類Ig Fc多肽之N-端間包括連接子（如，一或多個胺基酸殘基）。本發明預測性單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白之信號肽一般而言在加工過程中自該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端切除，而因此本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之成熟或分泌形式通常並不包括信號肽序列。包含兩個此種單體突

變CTLA-4-Ig融合蛋白之融合蛋白二聚體一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係形成於（1） 其中一個此種單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及IgG2 Fc中之半胱胺酸殘基，以及（2） 第二（其一般而言但並非必須相同）單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及IgG2 Fc中之半胱胺酸殘基之間。

本發明包括二聚體融合蛋白（亦稱為融合蛋白二聚體），其各包含兩個本發明之單體融合蛋白。該二聚體可包含兩個相同或不同之單體融合蛋白。該二聚體融合蛋白係藉著兩個單體融合蛋白間之連結（或多個連結）而形成。包含兩個此種單體融合蛋白之二聚體融合蛋白一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在一單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間產生。因此，在部分情形下，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白係以包含兩個本發明單體融合蛋白之二聚體形式表現。

在一態樣中，本發明提供包含兩個單體融合蛋白之分離或重組二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其中各個單體融合蛋白包含如上及下文所詳述之本發明突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端融合Ig Fc多肽。該二聚體係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在一單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及Ig Fc中的半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白之突變CTLA-4 ECD及Ig Fc中的半胱胺酸殘基間產生。該兩個單體融合蛋白一般而言但並非必須包含相同之序列。分泌或成熟形式之突變CTLA-4-Ig融合蛋白並不包括信號肽，因信號肽一般而言在加工過程中自該蛋白之N-端切除。預測之突變CTLA-4-Ig融合蛋白包括信號肽，其C-端一般而言共價連結該突變CTLA-4-Ig蛋白之N-端。各個成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體之N-端一般而言包含甲硫胺酸（M）。

作為一種非限制性之實例，本發明提供包含兩個單體CTLA-4-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白，其中各個單體突變

CTLA-4-Ig融合蛋白包含突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端融合Ig Fc多肽之N-端，其中該突變CTLA-4 ECD多肽包含選自SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列。在部分此等二聚體融合蛋白中，該兩個單體融合蛋白係由共價雙硫鍵彼此共價連接，該雙硫鍵係在細胞加工過程中，於位在各個CTLA-4突變ECD多肽序列中位置120之半胱胺酸殘基間形成。或者，或是此外，該兩個單體融合蛋白係由共價雙硫鍵彼此共價連接，該雙硫鍵係在該第一單體融合蛋白之Ig Fc多肽中的一或多個半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白之Ig Fc多肽中的一或多個半胱胺酸殘基間產生。該等單體融合蛋白可由多個雙硫鍵彼此連結（如，一、二、三、四或多個雙硫鍵），該雙硫鍵係在細胞加工過程中，於存在於各個Ig Fc多肽中的半胱胺酸殘基間產生。在部分情形下，各個單體融合蛋白係由相同之Ig Fc多肽構成（如，人類IgG2 Fc，如述於，如，SEQ ID NO:184或218者），且共價雙硫鍵可在細胞加工過程中，於位在各個Ig Fc多肽中相當位置之半胱胺酸殘基間產生。

例示性之突變CTLA-4 ECD多肽係D3-12突變CTLA-4 ECD多肽，其包含SEQ ID NO:11之多肽序列。例示性之本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白係D3-12突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:218之人類IgG2 Fc多肽之N-端，因而形成示於SEQ ID NO:205之D3-12-IgG2融合蛋白，或者其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:184之人類IgG2 Fc多肽之N-端，因而形成示於SEQ ID NO:74之D3-12-IgG2融合蛋白。SEQ ID NO:74之序列與SEQ ID NO:205具有一個殘基的差異—亦即，在SEQ ID NO:74之C-端存在一個額外的離胺酸殘基。我們在以液相層析質譜分析（LCMS）或是類似者所進行之實驗中發現，在CHO細胞中藉由轉染包含編碼突變CTLA-4 ECD （諸如，如，示於SEQ ID NO:11之D3-12 ECD多肽序列）及示於SEQ ID NO:184之hIgG2 Fc多肽的核苷酸序列之表現載體而製備之

成熟CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言並不包括該預期之C-端離胺酸（K）殘基，如根據示於SEQ ID NO:184之hIgG2 Fc序列而可預期者。

舉例而言，SEQ ID NO:153之核苷酸序列編碼hCTLA-4信號肽及D3-12-IgG2融合蛋白，且其在其C-端包括中止密碼子TAA。密碼子AAA （其編碼離胺酸殘基）在SEQ ID NO:153之序列中緊鄰位於該中止密碼子TAA之前。藉著將包含核苷酸序列SEQ ID NO:153之表現載體轉染進入CHO細胞中而產生之成熟D3-12-IgG2融合蛋白的預測多肽序列示於SEQ ID NO:74。該信號肽不存在於該成熟形式之D3-12-IgG2融合蛋白中，因其已在加工過程自該成熟融合蛋白切除。然而，我們發現，根據LCMS分析，在此種情形下，該成熟D3-12-IgG2一般而言並不包括該預測之C-端離胺酸，如根據SEQ ID NO:153之核苷酸序列而可預期者。相反的，由此種方法產生之所得成熟D3-12-IgG2多肽序列係示於SEQ ID NO:205者。咸信該IgG2 Fc多肽之C-端離胺酸係在加工過程或是在分泌之前受到切割。

咸信使用另一哺乳動物細胞系，藉著將此種包含核苷酸序列SEQ ID NO:153之表現載體轉染進入此種哺乳細胞（如，CHO細胞或類似者）而進行之D3-12-IgG2蛋白製備，將會因為類似之加工或分泌機制而產生缺乏預測C-端離胺酸殘基之類似D3-12-IgG2融合蛋白。

二聚體D3-12-IgG2融合蛋白包含兩個此種D3-12-IgG2單體，其以一或多個雙硫鍵彼此連結，該等雙硫鍵係在細胞加工過程中，藉著在半胱胺酸殘基間產生共價雙硫鍵而形成。D3-12-IgG2及本發明之其他融合蛋白可藉由，如，使用示於實例3之方法而製備。舉例而言，可將編碼D3-12多肽之核酸序列（如，SEQ ID NO:90）選殖進入IgG2 Fc融合載體，以該載體轉染哺乳動物細胞，再表現該所得之融合蛋白（一般而言係二聚體形式），純化，並進行評估，如實例3所述。

另一例示性之突變CTLA-4 ECD多肽係D3-54突變

CTLA-4 ECD多肽，其包含SEQ ID NO:36之多肽序列，而例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含D3-54突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:218之hIgG2 Fc多肽之N-端（無C-端離胺酸），因而形成示於SEQ ID NO:211之D3-54-IgG2融合蛋白，或者其在C-端直接（無連接子）共價連結或融合示於SEQ ID NO:184之hIgG2 Fc多肽之N-端（無C-端離胺酸），因而形成示於SEQ ID NO:197之D3-54-IgG2融合蛋白。如上所論，實驗分析指出，在CHO細胞中所製備之成熟D3-54-IgG2融合蛋白一般而言並不包括該預期之C-端離胺酸殘基。咸信該hIgG2 Fc之C-端離胺酸係在加工過程或是在分泌之前受到切割，因而造成示於SEQ ID NO:211之D3-54-IgG2融合蛋白序列。同時，如上所註記，D3-29-IgG2可使用實例3之方法製備。二聚體D3-54-IgG2融合蛋白包含兩個D3-54-IgG2單體，其以一或多個雙硫鍵彼此連結，該等雙硫鍵係在細胞加工過程中，藉著在半胱胺酸殘基間產生共價雙硫鍵而形成。示於SEQ ID NO:201之核酸序列編碼示於SEQ ID NOS:197及211之融合蛋白。

本發明之其他融合蛋白可類似包含連結或融合hIgG2（SEQ ID NO:218或84）之突變CTLA-4 ECD多肽。例示性之本發明成熟突變CTLA-4-IgG2融合蛋白包括，如，SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222各者之多肽序列。SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之多肽序列各包括一個C-端離胺酸殘基；此一C-端離胺酸殘基一般而言係在加工過程或是在分泌之前受到切割，因而分別造成示於SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及221之無C-端離胺酸的多肽序列。

圖10係顯示例示性本發明突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之例示性構形或結構的圖式。其圖示兩個相同之單體突變CTLA-4-IgG2融合蛋白，其各包含一個成熟突變CTLA-4 ECD多肽，其在C-端共價連結人類IgG2 Fc多肽之N-端。各個人類IgG2 Fc多肽包括人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域。其亦顯

示存在於該ECD與Ig Fc多肽接合處之例示性胺基酸殘基。根據該突變CTLA-4 ECD多肽序列及/或Ig多肽序列，位在此等組成份接合處之胺基酸殘基可各有不同。此種二聚體突變CTLA-4-IgG2融合蛋白係由至少一個雙硫鍵之形成而產生，該雙硫鍵係在位於該兩個突變CTLA-4-IgG2融合蛋白單體中類似位置之半胱胺酸殘基間形成。該等潛在涉及兩單體間雙硫鍵形成之半胱胺酸（C）殘基以星號標記。各個單體融合蛋白之信號肽一般而言係在細胞加工過程中受到切割，並因此該分泌（成熟）融合蛋白一般而言並不包括該信號肽序列。該人類IgG2多肽之多肽序列（其包含人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域）示於SEQ ID NO:184。在另一態樣中，該人類IgG2多肽之多肽序列（其包含人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域）示於SEQ ID NO:218；在此情形下，該IgG2多肽相較於SEQ ID NO:184之序列並不包括C-端離胺酸（K）殘基。

可使本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之特性（其在他處詳述）與一或多種參照Ig融合蛋白之特性進行比較，諸如，如，hCTLA-4-IgG1、hCTLA-4-IgG2、Orencia® 融合蛋白及LEA29Y-Ig。可進行比較之特性包括，如，結合CD80及/或CD86（以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig）之能力，及/或抑制或壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖，細胞因子之生成等）。成熟之hCTLA-4-IgG1融合蛋白一般而言在溶液中係以hCTLA-4-IgG1融合蛋白二聚體之形式存在，其包含兩個相同之單體hCTLA-4-IgG1蛋白，各個單體hCTLA-4-IgG1融合蛋白包含連結IgG1 Fc多肽之hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）。成熟之hCTLA-4-IgG2融合蛋白一般而言在溶液中係以hCTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體之形式存在，其包含兩個相同之單體hCTLA-4-IgG2蛋白，各個單體hCTLA-4-IgG2融合蛋白包含連結IgG2 Fc多肽之hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）。成熟之Orencia®融合蛋白係一種融合蛋白二聚體，其包含兩個相同之單體Orencia®融合蛋白，各個單體融合蛋白

（SEQ ID NO:164）包含連結特定突變IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:186）之hCTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:159）。成熟之LEA29Y-Ig融合蛋白一般而言在溶液中係以LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體之形式存在，其包含兩個相同之單體LEA29Y-Ig融合蛋白，各個單體LEA29Y-Ig融合蛋白（SEQ ID NO:166）包含連結特定突變IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:186）之突變CTLA-4 ECD多肽（SEQ ID NO:168）。咸信Orencia®二聚體之該兩個融合蛋白單體係由單一雙硫鍵共價連結，該雙硫鍵係在位於各個hCTLA-4-突變IgG1單體位置120之半胱胺酸殘基間形成，且在該兩個突變IgG1 Fc多肽間並未形成任何雙硫鍵。

部分之突變CTLA-4融合蛋白可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）。部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白可結合CD80-Ig融合蛋白及/或CD86-Ig融合蛋白。例示性之CD80-Ig融合蛋白包括hCD80-mIg融合蛋白（SEQ ID NO:225），其包含連結小鼠Ig Fc多肽之人類CD80 ECD；以及hCD80-hIgG1融合蛋白（SEQ ID NO:171），其包含連結人類IgG1 Fc多肽之hCD80 ECD。例示性之CD86-Ig融合蛋白包括hCD86-mIg融合蛋白（SEQ ID NO:226），其包含連結小鼠Ig Fc多肽之hCD86 ECD （SEQ ID NO:180）；以及成熟之hCD86-hIgG1融合蛋白（SEQ ID NO:178），其包含連結人類IgG1 Fc多肽（SEQ ID NO:185）之hCD86 ECD （SEQ ID NO:180）。編碼hCD86-mIg及hCD80-mIg之例示性核酸序列分別示於SEQ ID NOS:227及228。

在一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白，其包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，以及（b） Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86，以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

該Ig Fc多肽可包含多肽序列，其與選自SEQ ID NO:184、185、186及218之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，多肽（a）之C-端係共價連結Ig Fc多肽（b）之N-端。部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白可結合哺乳動物CD80及/或CD86 （如，hCD80及/或hCD86），以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig融合蛋白。CD80-Ig可包含，如，連結Ig Fc之人類CD80 ECD （如，hCD80-Ig）。在一具體實例中，hCD80-Ig係連結人類Ig Fc之人類CD80 ECD（如，hCD80-hIg）；在另一具體實例中，hCD80-Ig係連結小鼠Ig Fc之人類CD80 ECD （如，hCD80-mIg）。在一具體實例中，hCD86-Ig係連結人類Ig Fc之人類CD86 ECD （如，hCD86-hIg）；在另一具體實例中，hCD86-Ig係連結小鼠Ig Fc之人類CD86 ECD （如，hCD86-mIg）。部分此等融合蛋白具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制或壓抑各種免疫反應之一或多者的能力，諸如，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）或是發炎分子之誘發、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此等融合蛋白預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療免疫系統疾病及病症（如，自體免疫疾病）之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法，如下文所討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體，其包含兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成。各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體包含：（a） 突變CTLA-4 ECD多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，以及（b） Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該融合蛋白二聚體可

結合CD80及/或CD86，以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。在部分情形下，多肽（a）之C-端係共價連結或融合Ig Fc多肽（b）之N-端。該Ig Fc多肽可包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NO:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，該融合蛋白二聚體係藉由共價雙硫鍵而形成，該雙硫鍵係位在各個突變CTLA-4 ECD多肽序列位置120之半胱胺酸殘基間，或是位在對應於各個突變CTLA-4 ECD多肽序列中相對示於SEQ ID NO:159之hCTLA-4 ECD多肽的位置120者。部分此等融合蛋白具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制或壓抑各種免疫反應之一或多者的能力，諸如，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）或是發炎分子之誘發、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。此等融合蛋白二聚體預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療免疫系統疾病及病症（如，自體免疫疾病）之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法，如下文所討論。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體具有對於hCD86或hCD86 ECD之結合親和力，其係分別等於或大於hCTLA-4 ECD及LEA29對於hCD86或hCD86 ECD者。參見，如，實例4之表5。存在於此等二聚體及單體融合蛋白中之突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之胺基酸長度。舉例而言，部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其長度係約110至138、112至136、114至134、116至132、118至130、119至129、120至128、121至127、122至126或是123至125個胺基酸殘基。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含具有124個胺基酸殘基之序列。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括，如，但不限於，該等包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少

95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列者，其中此種突變CTLA-4 ECD多肽可結合CD80及/或CD86（或是其任一或兩者之ECD），及/或具有抑制免疫反應之能力。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體具有對於hCD86及/或hCD86-Ig之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig對於hCD86及/或hCD86-Ig之結合性。部分此等融合蛋白二聚體具有對於hCD86及/或hCD86-mIg之結合性，其係2-10倍（2x-10x），5-10倍（5x-10x），10-20倍（10x-20x），20-40倍（20x-40x），或是超過40倍（>40x）大於Orencia®二聚體對於hCD86及/或hCD86-mIg之結合性。參見，如，下文表3中之例示性本發明二聚體融合蛋白。或者或是此外，部分此等融合蛋白二聚體具有對於hCD80及/或hCD80-Ig之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig對於hCD80及/或hCD80-Ig之結合性。部分此等融合蛋白二聚體具有對於hCD80及/或hCD80-mIg之結合性，其係0.5-2倍（0.5x-2x），2-4倍（2x-4x），或是超過2倍（>2x）大於Orencia®二聚體對於hCD86及/或hCD86-mIg之結合性。參見，如，下文表4中之例示性本發明二聚體融合蛋白。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體分別係以小於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig自結合之hCD86及/或hCD86-Ig解離之速率而自結合之hCD86及/或hCD86-Ig解離。部分此等融合蛋白分別係以至少等於或大於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig與hCD86及/或hCD86-Ig結合之速率而與hCD86及/或hCD86-Ig結合。就部分此等融合蛋白二聚體而

言，該在CD86 （或CD86-Ig）與本發明融合蛋白二聚體間之結合反應的平衡解離常數(K_D)係小於該在CD86（或CD86-Ig）與hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig二聚體間之結合反應的平衡解離常數（K_D）。參見，如，表3中之例示性本發明融合蛋白二聚體。就部分此等融合蛋白二聚體而言，該在CD80（或CD80-Ig）與本發明融合蛋白二聚體間之結合反應的平衡解離常數（K_D）係約等於或小於該在CD80 （或CD80-Ig）與hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體或LEA29Y-Ig二聚體間之結合反應的平衡解離常數（K_D）。參見，如，表4中之例示性本發明融合蛋白二聚體。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體具有抑制或壓抑免疫反應之能力（如，抑制T細胞之活化或增殖，抑制細胞因子之生成等），其係分別約等於或大於hCTLA-4-Ig二聚體（如，hCTLA-4-IgG2或hCTLA-4-IgG1二聚體）、Orencia®二聚體及/或LEA29Y-Ig二聚體抑制或壓抑該免疫反應之能力。舉例而言，部分此等融合蛋白二聚體可在活體外之分析中抑制T細胞之活化或T細胞之增殖。下文所示之實例4-9，舉例而言，說明包含代表性突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明融合蛋白二聚體在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等二聚體可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投予治療或預防有效量之至少一種該二聚體。部分此等融合蛋白二聚體預期可用於各種應用之中，包括，如，但不限於，用於在罹患其中需要免疫抑制之免疫系統疾病或病症（如，自體免疫疾病）的對象體內抑制或壓抑免疫反應之預防及/或治療方法，以及用以抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞或器官移植排斥之方法。

部分此等二聚體具有調控或抑制經由CD28之信號傳導的各異能力，因其具有對於CD80及CD86之不同比較性結合性。

此等二聚體可用於其中需要對T細胞反應進行差異操縱之應用中，包括用於治療免疫系統疾病及病症之治療及預防方法，諸如，如，免疫不全疾病及病症（如，RA、MS、牛皮癬等）。具有部分上述差異CD80/CD86結合性及免疫抑制特性之包含本發明多肽的例示性二聚體融合蛋白示於實例4。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有壓抑或抑制免疫反應之能力，其係分別約等於或大於hCTLA-4蛋白或hCTLA-4-Ig二聚體壓抑或抑制一或多種類型免疫反應之能力。舉例而言，部分此等二聚體具有在活體外及/或活體內之分析及/或應用中抑制T細胞之活化或增殖的能力，諸如該等述於上及下文之分析及/或應用，其係至少約等於或大於hCTLA-4蛋白或hCTLA-4-Ig二聚體（如，Orencia®、hCTLA-4-IgG2二聚體或hCTLA-4-IgG1二聚體）在此等應用中抑制T細胞之活化或增殖的能力。此外，部分此等二聚體具有抑制或壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、T細胞相關性抗體反應），其係大於LEA29Y-Ig二聚體抑制或壓抑免疫反應之能力。實例4-9，例如，相對二聚體hCTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig在活體外抑制T細胞增殖之能力而比較包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽序列之代表性本發明二聚體融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。參見，如，下文之表6-9。部分此等二聚體同時具有結合hCD80及/或hCD86（或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig）之能力，以及在活體外及/或活體內之分析及/或應用中抑制或壓抑免疫反應之能力，諸如該等述於上文且在下文詳述者（如，其中投予治療或預防有效量之至少一種此等二聚體之活體內方法）。部分此等二聚體具有對於hCD80及/或hCD86（或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig）之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2、Orencia®）或二聚體LEA29Y-Ig對於hCD80及/或hCD86（或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig）之結合性，並具有抑制免疫反應之能力，其係至少

等於或大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2、Orencia®）或二聚體LEA29Y-Ig抑制免疫反應之能力。此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體預期可用於各種應用之中，包括，如，用以治療免疫系統疾病、病症、疾病況之預防及/或治療方法，如下文所詳細討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個相同之單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%之相同性，其中該二聚體可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力，包括該等述於上文並在下文進一步敘述者。示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之各個多肽序列係在其C-端融合IgG2 Fc多肽之N-端的成熟突變CTLA-4 ECD，且各個此種序列可被稱為突變CTLA-4-Ig融合蛋白。SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222各者之多肽序列係與SEQ ID NOS:205-214、219及221相同，除外SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222各者在其C-端包括一個離胺酸。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白單體，其包含多肽序列，與包含SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之胺基酸殘基1-351的多肽序列具有至少90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%之相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力，包括該等

述於上文並在下文進一步敘述者。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個相同之單體融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與包含SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之胺基酸殘基1-351的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力，包括該等述於上文並在下文進一步敘述者。

亦提供一種突變之單體CTLA-4-Ig融合蛋白，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該單體融合蛋白可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig，分別諸如hCD80-mIg及/或hCD86-mIg），及/或具有抑制免疫反應之能力。部分此等融合蛋白單體及二聚體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力，包括，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記之誘發（如，CD25、IL-2受體）、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之此種二聚體融合蛋白之病患體內，如下文所詳細討論）。此等融合蛋白單體及二聚體預期可用於各種應用之中，包括用以治療免疫系統疾病之治療及/或預防方法，包括下文所討論者。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域多肽），

其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，且其中在該多肽序列中於胺基酸位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73之多肽）對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2） Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86 （或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記或是發炎分子之誘發、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應等），如下文所詳細討論。本發明亦包括如上所述之分離或重組單體融合蛋白，其可結合CD80及/或CD86 （或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在試管中或活體內誘發免疫反應。在該融合蛋白二聚體中，該兩個單體融合蛋白（如，突變CTLA-4-Ig單體）視情況可由經由各單體中半胱胺酸殘基形成之一或多個雙硫鍵而彼此共價連結，且該兩個單體一般而言係彼此相同。在部分情形下，在此種融合蛋白二聚體或單體中之突變CTLA-4 ECD多肽與所選多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73）具有不超過6個胺基酸殘基之差異，但佔據位置41、50、54、55、56、64、65、70及85中之胺基酸係與包括於所選多肽序列該位置之胺基酸殘基相同，亦即，在此種位置之胺基酸殘基不可經刪除或取代。在此種融合蛋白中之部分此等CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其與所選多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其在位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106包括與位於所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基。此等CTLA-4 ECD多肽可與所選多肽序列具有胺基酸缺失、添加及/或取代之差異。胺基酸取代可為保守性或非保守性取代。參見，如，「序列變異」章節。部分此等二聚體融合蛋白具有對於hCD86或hCD86-Ig之結合性，其係分別至

少約等於或大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig、二聚體LEA29Y-Ig或Orencia®蛋白對於hCD86或hCD86-Ig之結合性。部分此等單體融合蛋白具有對於hCD86、hCD86-Ig或hCD86 ECD之結合親和力或結合性，其係分別至少約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於hCD86、hCD86-Ig或hCD86 ECD之結合親和力或結合性。或者或是此外，部分此等二聚體融合蛋白具有對於hCD80或hCD80-Ig之結合性，其係分別至少約等於或大於hCTLA-4或hCTLA-4-Ig對於hCD80之結合性。或者或是此外，部分此等單體融合蛋白具有對於hCD80、hCD80-Ig或hCD80 ECD之結合親和力或結合性，其係分別至少約等於或大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於hCD80、hCD80-Ig或hCD80 ECD之結合親和力或結合性。在部分情形下，在此種融合蛋白二聚體或單體中之突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之長度，如，自約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。該Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc）之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。該Ig Fc多肽可包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列（如，SEQ ID NO:184、185、186及218之任一者）具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

部分此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體或單體可抑制各種免疫反應中之一或多者，其包括，如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）或是發炎分子之誘發、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig或二聚體LEA29Y-Ig之抑制一或多種此等免疫反

應的較大能力。實例4-9，舉例而言，相對於二聚體hCTLA-4-Ig或二聚體LEA29Y-Ig之能力，說明包含突變CTLA-4 ECD多肽之代表性本發明二聚體融合蛋白在活體外抑制T細胞增殖之能力。部分此等突變CTLA-4-Ig單體具有相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig之抑制一或多種此等免疫反應的較大能力。部分此等單體及二聚體可在活體內抑制或壓抑對象體內之免疫反應，諸如，經由對於需要免疫抑制療法之對象投與治療或預防有效量之至少一種此等多肽。此等融合蛋白預期可在各種應用中具有效益用途，包括用以治療其中免疫抑制可能具有效益之疾病、病症或病況，諸如，用於治療自體免疫疾病及病症之預防及/或治療方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 突變CTLA-4胞外域（ECD）多肽，其包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，且（b） 在對應於相對SEQ ID NO:159多肽序列之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置包含至少一個胺基酸取代；以及（2） Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應等），如下文所詳述。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。在部分情形下，CD80係hCD80，且CD86係hCD86。在該融合蛋白二聚體中，該兩個單體融合蛋白（如，

突變CTLA-4-Ig單體）係視情形藉著經由各單體中半胱胺酸殘基之一或多個雙硫鍵而彼此共價連結，且該兩個單體一般而言係彼此相同。該Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc）之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。該Ig Fc多肽可包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

部分此等融合蛋白二聚體或單體包含突變之CTLA-4 ECD多肽，其包含多肽序列，具有約等於hCTLA-4 ECD胺基酸長度之長度，如，118-130、119-129、120-128、121-127、122-126或123-125個胺基酸殘基之長度。在此種融合蛋白二聚體或單體中之部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其長度係124個胺基酸殘基。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含2、3、4、5或6個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159所示序列中選自由位置50、54、55、56、64、65、70或85所組成之群的位置。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽尚包含胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置104及/或30的位置。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置70（視情形為S70F）、位置64（視情形為S64P）、位置50（視情形為A50M）、位置54 （視情形為M54K/V，如，M54K）、位置65 （視情形為I65S）、位置56 （視情形為N56D）、位置55 （視情形為G55E）、位置85 （視情形為M85A） 及/或位置24 （視情形為A24E/S，如，A24E）。任何此等突變CTLA-4 ECD多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104 （視情況係L104E/D，如，L104E）、位置30 （視情況係T30N/D/A，如，T30N、T30D或T30A）及/或位置32 （視情況係V32I）。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含

至少一個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含2、3、4、5或6個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有對於CD86（如，hCD86）或二聚體CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白或二聚體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80（如，hCD80）或二聚體CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80（如，hCD80）或單體CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig（如，單體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之至少一種此等突變CTLA-4-Ig二聚體之病患體內）抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力，包括該等述於上文及本文全文中者（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應）。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig（如，二聚體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度抑制一或多種此等免疫反應。部分此等突變CTLA-4-Ig單體可以相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig之較大程度抑制一或多種此等免疫反應。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種應用之中具有效益用途，包括用以治療自體免疫疾病及病症之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域），其包含多肽序列，其（i） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，以及（ii） 在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置包括苯丙胺酸殘基，以及（2） Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc），其中該融合蛋白二聚體可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是具有在活體外及/或活體內抑制免疫反應之能力。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。在部分情形下，該Ig Fc多肽包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。該Ig Fc多肽之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連

接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。

在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽相對於該所選多肽序列包含下列之一或多者：位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基、位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基、位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基、位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基、位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基、位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基、位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基、以及位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。舉例而言，在此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含多肽序列，其包含（i） 與SEQ ID NO:24多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性，以及（ii） 位在對應於SEQ ID NO:24多肽序列位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86（以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），及/或可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應。在此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，部分此等突變CTLA-4 ECD多肽包含相對SEQ ID NO:24多肽序列之下列一或多者：位在位置24之麩胺酸殘基、位在位置30之天冬醯胺殘基、位在位置32之異白胺酸殘基、位在位置50之甲硫胺酸殘基、位在位置54之離胺酸殘基、位在位置55之麩胺酸殘基、位在位置56之天冬胺酸殘基、位在位置64之脯胺酸殘基、位在位置65之絲胺酸殘基、以及位在位置104之麩胺酸殘基。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體具有對於CD86 （如，hCD86）或二聚體CD86-Ig （如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白或二聚體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80 （如，hCD80）或二聚體

CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig或Orencia®蛋白對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig對於CD86或CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80（如，hCD80）或CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之集合親和力或結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之至少一種此等突變CTLA-4-Ig二聚體之病患體內）抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原Ab生成、T細胞相關性Ab反應）。部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig（如，二聚體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。部分此等突變CTLA-4-Ig單體可以相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種用以治療其中免疫抑制治療將具有效益之疾病或病症之治療及/或預防方法中具有效益用途，其包括，如，用以治療自體免疫疾病之方法，以及用以抑制器官、細胞或組織移植物移植排斥之方法。

在又另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融

合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號；以及（2） Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc），其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86 （以及/或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可在活體外及/或活體內之分析及/或方法中抑制免疫反應（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應等），如下文詳細討論。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。該Ig Fc多肽可包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。該Ig Fc多肽之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽進一步包含取代在部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽可進一步包含L104E，以及/或是二、三或四個額外之取代，選自由下列取代所組成之群：T30N、V32I、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P及I65S。

部分此等二聚體具有對於CD86（如，hCD86）或二聚體CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig及/或Orencia®蛋白對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80（如，hCD80）或二聚體CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig及/或Orencia®蛋白對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。部分此等單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於CD86或CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80（如，hCD80）或CD80-Ig（如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之集合親和力或結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內之分析及/或方法中（如，於活體內，在罹患其中免疫抑制療法將具有效益之疾病、病症或病況，且對其投藥治療有效量之至少一種此等突變CTLA-4-Ig二聚體之病患體內）抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應）。部分此等二聚體可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig（如，二聚體hCTLA-4-IgG1或hCTLA-4-IgG2）、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。部分此等單體可以相較於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig及/或單體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種用以治療其中免疫抑制治療將具有效益之疾病或病症之治療及/或預防方法中具有效益用途，其包括，如，用以治療自體免疫疾病之方法，以及用以抑制器官或組織移植物移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體），其包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4胞外域），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號；以及（2） Ig Fc多肽，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86 （以及/或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應。本發明亦包括分離或重組之單體融合蛋白，如上所述，其可結合CD80（如，hCD80）及/或CD86（如，hCD86）（以及/或是CD80-Ig，如，hCD80-Ig，及/或CD86-Ig，如，hCD86-Ig），以及/或是可在活體外或活體內誘發免疫反應。該Ig Fc多肽可包含IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能或Fc受體結合之突變IgG Fc。該Ig Fc多肽可包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。該Ig Fc多肽之N-端可直接或間接（經由包含，如，自1-10個胺基酸殘基之連接子）共價連結或融合該突變CTLA-4 ECD多肽之C-端。在部分此等二聚體或單體中，該突變CTLA-4 ECD多肽包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。

部分此等二聚體具有對於CD86 （如，hCD86）或二聚體CD86-Ig （如，hCD86-Ig）之結合性，其係分別約等於或大於

hCTLA-4蛋白、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig對於CD86或二聚體CD86-Ig之結合性。部分此等二聚體具有對於CD80 （如，hCD80）或二聚體CD80-Ig （如，hCD80-Ig）之結合性，其係分別大於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig及/或Orencia®蛋白對於CD80或二聚體CD80-Ig之結合性。部分此等單體具有對於CD86（如，hCD86）或CD86-Ig（如，hCD86-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別約等於或大於單體hCTLA-4、單體hCTLA-4-Ig或單體LEA29Y-Ig對於CD86或CD86-Ig之結合親和力或結合性。部分此等單體具有對於CD80 （如，hCD80）或CD80-Ig （如，hCD80-Ig）之結合親和力或結合性，其係分別大於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig對於CD80或二聚體CD80-Ig之集合親和力或結合性。

部分此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體具有在活體外及/或活體內抑制或壓抑一或多種免疫反應的能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之生成、活化標記之誘發、發炎、抗膠原抗體生成、T細胞相關性抗體反應），如下文詳細討論。部分此等二聚體具有可以相較於hCTLA-4、二聚體hCTLA-4-Ig、Orencia®蛋白及/或二聚體LEA29Y-Ig之較大程度壓抑一或多種此等免疫反應的能力。部分此等單體具有可以相較於單體hCTLA-4或單體hCTLA-4-Ig之較大程度壓抑或抑制一或多種此等免疫反應的能力。此等突變CTLA-4-Ig二聚體及單體預期可在各種用以治療其中免疫抑制治療將具有效益之疾病或病症之治療及/或預防方法中具有效益用途（如，自體免疫疾病及病症，以及用以抑制器官或組織移植物移植排斥之方法）。

任何此等上述之二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體或單體可進一步包括可協助該融合蛋白自宿主細胞分泌之肽。該肽視情況係一種信號肽。該信號肽之C-端一般而言共價連結該多肽之N-端。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。該信號肽可包含一胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基1-35、1-36或1-37的胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。同時，如下文所討論，任何此等上述之二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白可包含一或多個經糖基化或聚乙二醇化之胺基酸殘基。

本發明亦提供一種成熟/分泌之突變CTLA-4-IgG2融合蛋白，其長度係352個胺基酸，且其包含突變CTLA-4 ECD多肽，包含124個胺基酸殘基，以及一人類IgG2 Fc多肽，包含228個胺基酸殘基。例示性之突變CTLA-4 ECD多肽包括該等包含由SEQ ID NOS:1-73中任一者所辨識之序列的多肽。例示性之突變CTLA-4-IgG2融合蛋白包括該等包含由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者所辨識之多肽序列者。如需要，成熟突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之胺基酸可以該突變CTLA-4-IgG2之第一個胺基酸殘基（亦即，該突變CTLA-4 ECD多肽之第一個殘基）起始編號。在部分範疇中，該突變CTLA-4-IgG2融合蛋白（或突變CTLA-4 ECD）之第一個殘基係甲硫胺酸，並因此該突變CTLA-4-IgG2融合蛋白（或突變CTLA-4 ECD）之胺基酸編號將會由該甲硫胺酸起始（指稱為胺基酸殘基1）。

本發明亦包括分離或重組之多聚體融合蛋白，其包含二或多個上述之突變CTLA-4-Ig融合蛋白。在部分情形下，該多聚體係融合蛋白二聚體，包含兩個突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其可為相同之融合蛋白（亦即，同質二聚體）或是不同之融合蛋白（亦即，異質二聚體）。在部分情形下，該多聚體係四聚體融合蛋白，包含四個本發明之突變CTLA-4-ECD多肽。該四聚體可包含四個相同之突變CTLA-4 ECD多肽（亦即，同質四聚體），或是四個本發明突變CTLA-4 ECD多肽之任何組合，以使所有四個突變CTLA-4 ECD多肽皆不相同（亦即，異質四聚

體）。部分此等多聚體可結合CD80及/或CD86 （以及/或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可壓抑或抑制免疫反應。

本發明包括可溶形式之任何上述多肽、融合蛋白及多聚體。其亦包括可溶形式之下述本發明複合物。本發明之可溶性分子—如，可溶性之本發明多肽、二聚體融合蛋白、單體融合蛋白、多聚體及複合物—並未連結或連接或是結合細胞。部分此等可溶性分子可存在於溶液中，或是可循環，如，在液體中（如，在對象體內）。一般而言可使用信號肽以協助此種分子之分泌，但該信號肽在該分子自宿主細胞分泌之過程中會受到切割。因此，在大部分之情形下，可溶性之分子，諸如，可溶性之多肽、二聚體融合蛋白、單體融合蛋白或多聚體，並不包括信號肽。如上所討論，本發明之突變CTLA-4胞外域多肽可連結Ig分子，其包括，如，Ig多肽之一部份，諸如，如，Ig Fc多肽，其可造成可溶性之融合蛋白。因此，在一態樣中，本發明包括可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其包含任何如本文所述之本發明突變CTLA-4 ECD多肽，融合或連結Ig多肽之至少一部份，諸如，如，野生型Ig Fc （如，人類IgG2 Fc）或突變Ig Fc多肽。此等可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白可為單體或二聚體融合蛋白，且包括該等在上文及他處詳述之突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體及二聚體，包括在下文之實例中者。如上文及本文他處所詳述，部分此等可溶性之單體或二聚體融合蛋白可具有結合CD80及/或CD86之能力，以及/或是在活體外及/或活體內之應用中壓抑或抑制免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖）。

此等本發明之可溶性分子預期可在各種應用中具有特別效益，其包括，如，用以治療免疫系統疾病及病症（如，自體免疫疾病）之治療及預防方法，以及用以抑制細胞、器官或組織移植物排斥之預防及治療方法。本發明之可溶性分子—如，本發明之可溶性重組突變CTLA-4 ECD多肽、單體及二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白、突變CTLA-4 ECD複合物、突變

CTLA-4-Ig複合物、包含突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig之多聚體、包含突變CTLA-4複合物或突變CTLA-4-Ig複合物之多聚體—其可結合CD80及/或CD86，在以治療或預防有效量投與至對象時，可抑制內源性CD80及/或CD86與內源性CD28間的作用，因而在該對象體內抑制免疫系統反應或是抑制對於該對象健康體組織、器官及/或細胞之免疫系統攻擊。在其中對象係來自捐贈者之健康體組織、器官及/或細胞之接受者的情形下（如，諸如該對象接受者已接受捐贈者之組織移植物或是細胞或器官移植時），此等可溶性之分子可抑制內源性CD80及/或CD86與內源性CD28間的作用，因而抑制該對象之免疫系統對於由捐贈者捐與該對象之健康體組織、器官及/或細胞的有害反應或是攻擊。藉由抑制免疫系統反應或是對於健康體組織之攻擊，其可降低該對象體內與此種免疫系統反應或是對於健康體組織、器官或細胞之攻擊相關之副作用（如，疼痛、關節發炎等），並可延遲或預防由此種反應或攻擊所造成之損傷。

用以測量上述本發明多肽（其包括，如，突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）之結合親和力及結合性的方法可為一般熟習技藝者所知，且其包括，如，但不限於，Biacore™技術（GE Healthcare）、等溫滴定微量熱法（MicroCal LLC, Northampton, MA）、ELISA、結合親和力噬菌體展示法及FACS法。Biacore法在下文之實例4中詳述。FACS或其他分選方法在上文及本文他處詳述。以噬菌體ELISA測量本發明多肽對於hCD80及/或hCD86之結合性的方法述於下文實例2。

用以偵測及測量由本發明之分子（其包括，如，本發明之突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體及單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白、以及多聚體）所誘發之T細胞反應的方法係熟習技藝者所熟知。T細胞之活化常係以生理事件定性，其包括，如，T細胞相關性細胞因子之合成（如，IFN-γ之生成）以及活化標記

之誘發（如，CD25、IL-2受體）。CD4+ T細胞可在MHC II型分子中辨識其免疫原肽，而CD8+ T細胞則可在MHC I型分子中辨識其免疫原肽。用以評估及測量上述本發明分子抑制或壓抑T細胞活化及/或T細胞增殖或是阻斷經由CD86及/或CD80之信號傳導的例示性方法述於實例5-8以及本文他處。

本發明之多肽、單體及二聚體融合蛋白、以及多聚體，包括上文所討論者，視情形進一步包含一個額外之胺基酸（諸如，甲硫胺酸）添加至其N-端，以及/或是用以進行純化或辨識之肽標記。本發明之多肽，包括上文所討論者，視情形進一步包含多肽純化亞序列，諸如，選自抗原表位標記、FLAG標記、聚組胺酸序列及GST融合物之亞序列。

此外，如下文詳細討論者，本發明包括分離、重組或合成之核酸，其編碼上文所述以及下文進一步詳述之所有本發明之多肽、融合蛋白及多聚體。

序列相同性

如上文所討論，在一態樣中，本發明包括一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。在另一態樣中，如下文所詳述，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其ECD之能力，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

一序列（多肽或核酸）與另一者之相似程度可提供該兩序

列類似結構及功能特性之指標。因此，在本發明之內容中，與任何特定實例序列具有相似序列之序列係本發明之特徵。具有如下文所定義之序列相同性百分比之序列係本發明之特徵。可使用各種用以判定序列關係之方法，包括手動排比及電腦輔助性序列排比及分析。各種用以進行序列排比之電腦程式係可取得者，或者可由熟習技藝者產生。

如上文所註記，用於本發明之核酸及多肽序列與對應之本發明核酸或本發明多肽分別並不必須為相同，但可為實質上相同。舉例而言，可對本發明之多肽進行各種變化，諸如一或多個胺基酸之插入、缺失及/或取代，其可為保守性或非保守性者，包括，如，在此等變化可對其用途提供某些利益之情形下，諸如，在其治療及預防用途，或是其投藥或診斷應用中。亦可對本發明之核酸進行各種變化，諸如一或多個胺基酸在一或多個密碼子中之一或多個取代，其使特定密碼子編碼相同或不同之胺基酸，造成沈默變化（如，核苷酸序列之突變造成胺基酸序列之沈默變化，如，當經編碼之胺基酸並未由該核酸突變而改變時）或非沈默變化，該序列中一或多個核酸（或密碼子）之一或多個缺失，該序列中一或多個核酸（或密碼子）之一或多個添加或插入，該序列中一或多個核酸（或密碼子）之切割或一或多個截段。該等核酸亦可經修飾以包括一或多個密碼子，以在一表現系統中（如，細菌或哺乳動物表現系統中）提供最適表現，同時，如需要，該一或多個密碼子仍編碼該（等）相同之胺基酸。此等核酸變化可對其治療及預防用途，或是其投藥或診斷應用提供某些利益。該等核酸及多肽可以諸多方式進行修飾，只要其包含分別與本發明核酸或多肽之序列實質上相同（如下文所定義）之序列。

在有關二或多個核酸或多肽序列之內容中，名辭「相同」或「相同性」係指二或多個序列，其在為取得最大相似性而比較及排比時（如使用下文所述之序列比較算法或是由目視檢驗所判定者）係為相同，或是具有指定百分比之胺基酸殘基或核

苷酸係為相同。對象序列與參照（亦即，查詢）序列之「序列相同性百分比（「%相同性」）」意謂該對象序列在一比較長度中與該查詢序列具有指定百分比之相同性（亦即，就多肽序列而言為基於胺基酸對胺基酸之基礎，或是就聚核苷酸序列而言為基於核苷酸對核苷酸之基礎）。

對象序列與查詢序列之序列相同性百分比（「%序列相同性」或「%相同性」）可如下計算。首先，使用具有特定排比參數之序列比較算法判定兩序列之最適排比。此種最適排比之判定可使用電腦進行，或使可以人工計算，如下所述。接著，在該比較長度中對該兩個經最適排比之序列進行比較，並判定在該最適排比中於該兩序列中出現相同殘基之位置數目，其可提供相符位置數目。接著將該相符位置數目除以該比較長度（除非另有明示，其係該查詢序列之長度）之總位置數目，接著再將該結果乘以100，以產生該對象序列與該查詢序列之序列相同性百分比。

就多肽序列而言，一般而言，其會將一個序列視為「查詢序列」（例如，本發明之多肽序列），並對其使一或多個其他序列，亦即，「對象序列」（例如，存在於序列資料庫中之序列）進行比較。序列比較算法會使用指定之排比參數而判定該查詢序列與該（等）對象序列間之最適排比。當使查詢序列對序列資料庫進行比較時，諸如，GENBANK® 資料庫（Genetic Sequence Data Bank; U.S. Department of Health and Human Services）或GENESEQ® 資料庫（Thomson Derwent；亦可以DGENE® 資料庫之形式於STN取得），通常僅會將該查詢序列與該等排比參數輸入電腦；其會針對多達指定數目之對象序列而產生查詢序列與各個對象序列間之最適排比。

1. 最適排比之判定

在使用指定之參數進行排比，亦即，指定之胺基酸替換矩陣（substitution matrix）、間隙存在罰分（gap existence penalty）

（亦稱為間隙開放罰分（gap open penalty））及間隙延伸罰分（gap extension penalty），以取得該配對序列之最高可能相似性評分時，兩多肽序列即經「最適排比」。BLOSUM62矩陣（Henikoff and Henikoff（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89（22）:10915-10919）經常作為多肽序列排比算法（諸如，BLASTP，述於下文）之系統預設評分替換矩陣。其在將單一胺基酸間隙引入該等排比序列之一時課徵間隙存在罰分，並針對該間隙中之各個殘基位置課徵間隙延伸罰分。除非另有明示，用於本文之排比參數為：BLOSUM62評分矩陣，間隙存在罰分= 11，及間隙延伸罰分= 1。由排比開始及結束處（如，排比視窗）之各個序列的胺基酸位置定義排比評分，並視情形藉著在一或兩者之序列中插入一個間隙或多個間隙，以取得最高可能相似性評分。

儘管二或多個序列間之最適排比可以手動判定（如下所述），該流程可藉著使用電腦執行之排比算法而獲得協助，諸如，BLAST® （National Library of Medicine），如，多肽序列用之BLASTP以及核酸序列用之BLASTN，述於Altschul et al.（1997）Nucleic Acids Res. 25:3389-3402，並經由各種來源而可為公眾取得，諸如，國家生技資訊中心（National Center for Biotechnology Information）（NCBI）網站。在使用電腦化之BLAST界面時，如選項存在使用「低複雜性過濾器（low complexity filter）」，此一選項通常應該關閉（亦即，不使用過濾器）。

兩多肽序列間之最適排比亦可使用上文所指定之相同排比參數（矩陣= BLOSUM62，間隙開放罰分= 11，及間隙延伸罰分= 1），以BLASTP算法之手動計算（亦即，無電腦輔助）而判定。為開始進行，初始以目視檢驗排比該兩序列。接著如下計算初始排比評分：對該排比之各個位置（亦即，對各組排比殘基配對），根據BLOSUM62矩陣指定一數字值（圖13）。該等指定給與該排比中各對殘基之數值總和即係排比評分。如

該兩待排比之序列係高度相似，通常此種初始排比可提供最高可能排比評分。具有最高可能排比評分之排比係根據所用排比參數之最適排比。

有關兩序列排比評分之手動計算實例提供於圖14A-14D。圖14A顯示「查詢（query）」序列（其在本文中辨識為人類CTLA-4 ECD序列（SEQ ID NO:159）之殘基39-53）與「對象（subject）」序列（其在本文中辨識為D3 （SEQ ID NO:61）之殘基40-54）之任意排比（排比14A）的排比評分計算。由BLOSUM62矩陣對各排比胺基酸對所指定之數字值示於該排比中各位置之下。

圖14B顯示該相同兩序列之最適排比的排比評分。為協助視讀，將該排比中之各相同胺基酸對以粗體顯示。下文圖14B之排比（排比14B）可造成此兩序列之最高可能排比評分（各排比位置下所示數值之總和）；此兩序列之任何其他排比，在有或無間隙之情形下，將會造成較低之排比評分。

在部分情形下，可藉著在該排比中引入一或多個間隙而取得較高之排比評分。在將間隙引入排比之情形下，其指定間隙開放罰分，並針對該間隙中之各個殘基位置評估額外之間隙延伸罰分。因此，使用上述之排比參數（包括間隙開放罰分= 11及間隙延伸罰分= 1），在該排比中一個殘基長度之間隙將對應於指定給與該間隙之- （11+（1 x 1）） = -12數值；兩個殘基長度之間隙將對應於指定給與該間隙之
- （11+（2 x 1）） = -13數值等等。針對各個引入該排比中之新間隙重複此一計算。

下述係一實例，其說明，儘管在有間隙罰分之情況下，在排比中引入間隙如何仍可造成較高之排比評分。圖14C顯示「查詢」序列（其在本文中辨識為人類CTLA-4 ECD序列（SEQ ID NO:159）之殘基39-53）與「對象」序列（其在本文中辨識為D3 （SEQ ID NO:61）之殘基41-55，但在此情形下其具有胺基酸49-50之缺失）之排比（排比14C）。排比14C，其係在

未引入任何間隙下之最佳可能排比，產生排比評分34。

圖14D中之排比（排比14D）顯示在該下側序列中引入兩個殘基長度之間隙對於排比評分之作用。儘管具有總間隙罰分13（間隙開放罰分11，以及2倍之間隙延伸罰分1），該兩序列之整體排比評分增加至43。下部之排比D可產生最高之可能排比評分，並因此係此兩序列之最適排比；此兩序列之任何其他排比（在有或無間隙之情形下）將會造成較低之排比評分。

咸須明瞭，上述之序列排比計算實例（其使用相對較短之序列）僅係因說明目的而提供。在實務上，該等所用之排比參數（BLOSUM62矩陣，間隙開放罰分= 11，及間隙延伸罰分= 1）一般而言係欲用於長度為85個胺基酸或更長之多肽序列。NCBI網站針對其他長度之序列提供下列排比參數，其適用於電腦輔助性以及手動之排比計算，使用如上所述之相同流程進行。針對長度為50-85個胺基酸之序列，最適參數為BLOSUM80矩陣（Henikoff and Henikoff，上述文獻），間隙開放罰分= 10，及間隙延伸罰分= 1。針對長度為35-50個胺基酸之序列，最適參數為PAM70矩陣（Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C.（1978）"A model of evolutionary change in proteins [蛋白之演化性變化模式]" 於*Atlas of Protein Sequence and Structure [蛋白序列及結構圖集]*, vol. 5, suppl. 3, M.O. Dayhoff（ed.）, pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.），間隙開放罰分= 10，及間隙延伸罰分= 1。針對長度為小於35個胺基酸之序列，最適參數為PAM30矩陣（Dayhoff, M.O.，上述文獻），間隙開放罰分= 9，及間隙延伸罰分= 1。

2.相同性百分比之計算

一旦使序列進行最適排比後，即可計算在該最適排比中含有相同殘基對之位置數目，除以在該比較長度（亦稱為比較視窗）中之殘基數目（除非另有明示，其係該查詢序列中之殘基數目），再將該所得之數目乘以100，以計算該對象序列相對於

該查詢序列之相同性百分比。回頭參見上述之排比，在各個實例中，經指定為查詢（上側）序列之序列長度為15個胺基酸。在排比B中，在該查詢序列（上側）與對象序列（下側）之最適排比中，共有12對之排比胺基酸殘基（以粗體字顯示）為相同。因此，此一特定之對象序列與該15個殘基之查詢序列的完整長度具有（12/15） x 100 = 80%之相同性；換言之，在排比B中之該對象序列與該查詢序列具有至少80%之胺基酸相同性。在排比D中，在該最適排比中，共有11對之胺基酸殘基（以粗體字顯示）為相同；因此，此一特定之對象序列與該15個殘基之查詢序列的完整長度具有（11/15） x 100 = 73.3%之相同性；換言之，在排比D中之該對象序列與該查詢序列具有至少73%之胺基酸序列相同性。

在應用於多肽時，名辭「實質上之相同性」（或「實質上相同」）一般而言意謂當使用BLASTP算法（手動或經由電腦）使用上述之適當參數而使兩胺基酸序列（亦即，查詢序列及對象序列）最適排比時，該對象序列與該查詢序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之胺基酸序列相同性。在部分情形下，實質上之相同性存在於至少100個胺基酸殘基之比較長度中，諸如，如，至少110、115、118、119、120、121、122、123、124、125、130、135、140、145、150、200、250、300、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、375、400、450或500個胺基酸殘基。

相似者，在應用於兩核酸序列之內容中時，名辭實質上之相同性（或實質上相同）意謂當使用BLASTN算法（手動或經由電腦）使用上述之適當參數而使兩核酸序列（亦即，查詢序列及對象序列）最適排比時，該對象序列與該查詢序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之核酸序列相同

性。用於核酸序列排比之參數為：配對給分（match reward）1，錯配罰分（mismatch penalty） -3，間隙存在罰分5，間隙延伸罰分2 （在BLASTN算法中並不使用替換矩陣）。在部分情形下，實質上之相同性存在於至少300個核苷酸殘基之比較長度中，諸如，如，至少330、345、354、357、360、363、366、369、362、365、375、390、405、420、435、450、600、750、900、1035、1038、1041、1044、1047、1050、1053、1056、1059、1062、1065、1068、1071、1074、1077、1080、1200、1350或1500個核苷酸殘基。

可使用其他技藝中已知之序列排比程式。ALIGN程式可使用由Myers and Miller CABIOS 4:11-17 （1988）所述動態規劃算法之改良算法而產生兩所選蛋白或核酸序列之最適全體（整體）排比。ALIGN程式一般而言（但並非必須）係以加權末端間隙使用。如有間隙開放罰分及間隙延伸罰分時，其針對胺基酸序列排比通常分別係設定在約-5至-15以及0至-3間，更佳者係分別為約-12以及-0.5至-2，且針對核酸序列排比分別為約-10至-20以及-3至-5，更常見者係分別為約-16以及-4。ALIGN程式進一步述於Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 （1988），以及Pearson et al., Meth. Enzymol. 18:63-98 （1990）。

或者，且特別針對多重序列分析（亦即，超過三種序列之比較），可使用CLUSTALW程式（述於，如，Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22:4673-4680 （1994））。CLUSTALW程式係一種適用於進行多重DNA及胺基酸序列排比之算法（Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22:4673-4680 （1994））。CLUSTALW可在序列群間進行多重之逐對比較，並根據同源性而將其組合成為多重排比。在一態樣中，間隙開放及間隙延伸罰分係分別設為10及0.05。或者或是此外，CLUSTALW程式係使用「動態」（相對「固定」）設定而執行。一般而言，以CLUSTALW進行之核苷酸序列分析係使用BESTFIT矩陣執

行；而胺基酸序列係根據該等序列間之相同性程度而使用不同組之BLOSUM矩陣進行評估（如，如可經由聖地牙哥超級電腦中心（San Diego Supercomputer Center （SDSC））取得之CLUSTALW 1.6版程式或是可由歐洲生物資訊中心（European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK）取得之W 1.8版所用者）。較佳者，CLUSTALW之設定係設定為SDSC CLUSTALW系統預設之設定（如，關於胺基酸序列分析中之特定疏水性間隙罰分）。CLUSTALW程式進一步述於，如，Higgins et al., CABIOS 8（2）:189-91 （1992），Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-80 （1994），及Jeanmougin et al., Trends Biochem. Sci. 2:403-07 （1998）。

在另一形式中，特定排比胺基酸序列對間之相同性或相同性百分比係指由CLUSTALW分析（如W 1.8版）所取得之胺基酸序列相同性百分比，其計算該排比中之相同配對數目，再將該相同配對數目除以（i）排比序列長度及（ii） 96中之較大者，並使用下列之系統預設ClustalW參數以達成慢速/逐對之排比—間隙開放罰分：10；間隙延伸罰分：0.10；蛋白重量矩陣：Gonnet系列；DNA重量矩陣：IUB；Toggle慢速/快速逐對排比=SLOW或FULL排比。

另一用於判定相同性百分比或類似性百分比之有用算法係FASTA算法，其述於Pearson et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 （1988）及Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258（1996）。用於DNA序列之FASTA排比中以計算相同性百分比之典型參數經最適化，BL50矩陣15: -5，k序列（k-tuple） =2；結合罰分（joining penalty） =40，最適化（optimization） =28；間隙罰分（gap penalty） = -12，間隙長度罰分（gap length penalty） =-2；及寬度（width） =16。

其他適當之算法包括BLAST及BLAST 2.0算法，其可協助分析至少兩個胺基酸或核苷酸序列，藉著使所選序列對抗資料庫（如，GenSeq）中之多個序列進行排比，或者，當以諸如

BL2SEQ之其他算法進行修飾時，可在兩個所選序列間進行排比。用以進行BLAST分析之軟體可經由國家生技資訊中心（NCBI）（全球資訊網網址ncbi.nlm.nih.gov）而為公眾取得。BLAST算法涉及首先藉著在該查詢序列中辨識長度為W之短字序而辨識高分序列對（HSPs），其在與資料庫序列中具有相同長度之字序排比時係相應或符合某個正值閾值評分T。T係指鄰近字序評分閾值（neighborhood word score threshold）（Altschul et al.，上述文獻）。此等初始之鄰近字序相符結果可作為種子而起始搜尋發現含其之較長HSPs。將該等字序相符結果沿著各序列而向兩方向延伸，只要可增加累積排比評分便繼續進行。針對核苷酸序列，累積評分係使用參數M （配對殘基對之給分；永遠> 0）及N （錯配殘基之罰分；永遠< 0）而計算。針對胺基酸序列，其使用評分矩陣以計算該累積評分。該等字序相符結果向各方向之延伸在下列情形下停止：在累積排比評分由其最大達成值下滑X之量時；在累積評分因為累積一或多個負分殘基排比而到達0或以下時；或是在到達任一序列之末端時。BLAST算法參數W、T'及X可決定該排比之敏感性及速度。BLASTN程式（用於核苷酸序列）可以字序長度（W） 11、期望值（E） 10、M=5、N=-4、以及兩股之比較。針對胺基酸序列，BLASTP程式（如，BLASTP 2.0.14; Jun-29-2000）可以字序長度3及期望值（E） 10使用。BLOSUM62評分矩陣(參見Henikoff & Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915)使用排比（B） 50、期望值（E） 10、M=5、N=-4、以及兩股之比較。同樣的，如同其他適用之算法，可增加比較之嚴格性，直到該程式僅辨識出與該等本文序列表中者較為密切相關之序列（如，包含與選自SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之多肽序列具有至少85、90、91、92、93、49、95、96、97、98、99%或100%相同性之多肽序列的多肽，或是包含與選自SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224之核苷酸序列具有至少85、

90、91、92、93、49、95、96、97、98、99%或100%相同性之核苷酸序列或是其互補核苷酸序列的核酸。

BLAST算法亦對兩序列間之相似性或相同性進行統計分析（參見，如，Karlin & Altschul, （1993） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787）。其中一種由BLAST算法所提供之相似性或相同性度量係最小總和機率（smallest sum probability） （P（N）），其提供一種有關兩核苷酸或胺基酸序列間隨機產生配對之機率的指標。舉例而言，如在試驗核酸與參照核酸之比較中，該最小總和機率係小於約0.2，諸如，小於約0.01或小於約0.001，該核酸即被視為與該參照序列相似。

BLAST程式分析亦或可由低複雜度過濾程式修飾，諸如，DUST或SEG程式，其較佳係整合近如該BLAST程式之操作中（參見，如，Wootton et al., Comput. Chem. 17:149-63（1993），Altschul et al., Nat. Genet. 6:119-29 （1991），Hancock et al., Comput. Appl. Biosci. 10:67-70 （1991），及Wootton et al., Meth. Enzymol. 266:554-71 （1996））。在此等態樣中，如使用λ比例（lambda ratio），該比例之可用設定係介於0.75及0.95間，包括介於0.8及0.9間。如在此等態樣中使用間隙存在代價（或間隙評分），該間隙存在代價一般而言係設定在介於約-5及-15間，更一般而言係約-10，且每個殘基之間隙代價一般而言係設定在介於約0至-5間，諸如介於0及-3間（如，-0.5）。可如適當者以其他程式使用類似之間隙參數。BLAST程式以及其下之原則進一步述於，如，Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10 （1990），Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68 （199） （如由Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 （1993）修飾），以及Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 （1997）。

可用算法之另一實例係合併於PILEUP軟體中。PILEUP程式可使用漸進式之逐對排比，由一群相關之序列中創造出多重序列排比，以顯示其關係以及序列相同性百分比或序列相似性

百分比。PILEUP係使用Feng & Doolittle （1987） J. Mol. Evol. 35:351-360之漸進式排比法的簡化版本，其類似Higgins & Sharp （1989） CABIOS 5:151-153所述之方法。該程式可針對最多300個序列進行排比，其各自之最大長度為5,000個核苷酸或胺基酸。該多重排比流程始於兩個最相似序列之逐對排比，產生兩經排比序列之群組。接著使此群組與次一個最為相關之序列或是經排比序列之群組進行排比。兩個序列群組間之排比係藉由兩個別序列之逐對排比的簡單延伸而進行。終排比係藉由一系列之漸進式逐對排比而達成。該程式係藉由指定特定之序列以及其序列比較區域之胺基酸或核苷酸座標，並藉由指定程式參數而執行。藉著使用PILEUP，其使用特定之參數使一參照序列與其他試驗序列進行比較，以判定序列相同性百分比（或序列相似性百分比）關係。PILEUP程式之例示性參數為：系統預設間隙權數（3.00），系統預設間隙長度權數（0.10），以及加權之末端間隙。PILEUP係GCG序列分析套裝軟體之組件之一，如，7.0版（Devereaux et al. （1984） Nucl. Acids Res. 12:387-395）。

可用於進行相同性分析之其他可用算法包括之局部同源性算法Smith and Waterman （1981） Adv. Appl. Math. 2:482，Needleman and Wunsch （1970） J. Mol. Biol. 48:443之同源性排比算法，以及Pearson and Lipman （1988） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444之相似性搜尋法。此等算法之電腦化實施（如， GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA）提供於Wisconsin Genetics套裝軟體7.0版（Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）。

序列變異

如上所討論，本發明提供一種分離或重組之突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基

（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，其中該突變CTLA-4 ECD多肽可結合CD80及/或CD86，以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此（等）胺基酸取代包括保守性之胺基酸取代。

作為一種非限制性之實例，本發明之多肽可具有多肽序列，其與SEQ ID NO:1具有總共最多6個胺基酸之差異（其可為胺基酸取代、缺失及/或插入之組合，包括該等述於上文者）。在部分情形下，該等取代中之無、部分或全部係根據下文所定義之取代組中之取代。

根據本發明之胺基酸取代可包括，但不限於，22

一或多個保守性胺基酸取代。保守性之胺基酸殘基取代一般而言涉及將一種胺基酸殘基功能類型中之成員以屬於該相同功能類型中之殘基進行交換(該等相同之胺基酸殘基在計算功能同源性百分比時係視為功能同源性或保守性者)。提供功能類似性胺基酸之保守性取代表係技藝中所熟知。其實例之一提供於表1，其顯示六種例示性之群組，含有彼此可被視為「保守性取代」之胺基酸。

表1. 保守性胺基酸殘基取代組

1	丙胺酸（A） 甘胺酸（G） 絲胺酸（S） 羥丁胺酸(T)
2	天冬胺酸（D） 麩胺酸（E）
3	天冬醯胺（N） 麩醯胺（Q）
4	精胺酸（R） 離胺酸（K） 組胺酸（H）
5	異白胺酸（I） 白胺酸（L） 甲硫胺酸（M） 纈胺酸（V）
6	苯丙胺酸（F） 酪胺酸（Y） 色胺酸（W）

可預期其他之取代組。舉例而言，可以類似之功能或化學結構或組成而分組胺基酸（如，酸性、鹼性、脂族、芳族、含硫）。舉例而言，脂族之分組可包含：甘胺酸(G)、丙胺酸(A)、

纈胺酸（V）、白胺酸（L）、異白胺酸（I）。其他含有彼此間被視為保守性取代之胺基酸的組群包括：芳族：苯丙胺酸(F)、酪胺酸（Y）、色胺酸（W）；含硫：甲硫胺酸（M）、半胱胺酸（C）；鹼性：精胺酸（R）、離胺酸（K）、組胺酸（H）；酸性：天冬胺酸（D）、麩胺酸（E）；非極性無電荷殘基，半胱胺酸（C）、甲硫胺酸（M）及脯胺酸（P）；親水性無電荷殘基：絲胺酸（S）羥丁胺酸（T）天冬醯胺（N）及麩醯胺（Q）。關於其他胺基酸之分組，亦參見Creighton （1984） Proteins, W.H. Freeman and Company。本文之多肽序列表列，結合上述之取代組，可提供所有經保守取代多肽序列之明示表列。

其他之保守性取代存在於上述之胺基酸殘基類別中，其亦可或是或可為適當者。更為保守之取代保守組群包括：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸，苯丙胺酸-酪胺酸，離胺酸-精胺酸，丙胺酸-纈胺酸，以及天冬醯胺-麩醯胺。因此，舉例而言，在一特定態樣中，本發明提供分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與SEQ ID NO:1（或是SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222中任一者）具有至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%之相同性，且其與SEQ ID NO:1之序列大部分（如，至少50%、60%、70%、75%、80%、90%）之差異（如非全部）係由此等保守性胺基酸取代所造成。

其他亦可為適當之胺基酸組群可使用述於，如，Creighton（1984） Proteins: Structure and Molecular Properties （2d Ed. 1993）, W.H. Freeman and Company之原則判定。在部分態樣中，胺基酸序列變體中至少33%, 50%, 60%, 70%或以上（如，至少75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%或以上）之取代包含本發明多肽序列中一或多個胺基酸殘基經由該與其所取代之多肽序列胺基酸殘基相同之功能同源性類別(如以任何適當之分類系統判定）中的殘基所進行之取代。

本發明多肽序列之保守性取代變體包括小百分比(一般而言係小於該多肽序列胺基酸之10%、9%、8%、7%或6%，或

更一般而言係小於該多肽序列胺基酸之5%、4%、3%、2%或1%）之經由相同保守性取代組中保守選擇之胺基酸的取代。

本發明包括包含本文所述本發明多肽序列胺基酸變異之多肽。如上所討論，在一態樣中，本發明提供分離或重組之多肽，（如，突變CTLA-4多肽，諸如，如，突變CTLA-4 ECD多肽），其各包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86，或是CD80及/或CD86之多肽片段（或是其任一或兩者之ECD），及/或可抑制免疫反應。此等多肽可具有一或多個胺基酸缺失、添加或取代之差異，包括一或多個保守性或非保守性之取代，然而，其條件為該等多肽具有所述之功能特性。在一特定態樣中，本發明提供多肽變體，其包含本文所述任何此種多肽（諸如，如，包含選自SEQ ID NOS:1-73之群的多肽序列者）之保守性修飾變化。

亦如上所討論，在另一態樣中，本發明提供分離或重組之融合蛋白（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白），其各包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），及/或可抑制免疫反應。此等融合蛋白可具有一或多個胺基酸缺失、添加或取代之差異，包括一或多個保守性或非保守性之取代，然而，其條件為該等融合蛋白具有所述之功能特性。在一特定態樣中，本發明提供多肽變體，其包含本文所述任何此種融合蛋白（諸如，如，包含選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的多肽序列者）之保守性修飾變化。

亦提供上文或本文他處所述之任何本發明分離或重組多

肽之多肽變體，其中該多肽變體之胺基酸序列與該參照序列之對應多肽序列具有一或多個保守性胺基酸殘基取代之差異，但非保守性之取代有時係可允許或甚至係較佳者（此等非保守性取代之實例於本文進一步討論）。舉例而言，該多肽變體之序列可與突變CTLA-4多肽序列具有突變CTLA-4 ECD多肽序列中之一或多個胺基酸殘基經由一或多個具有類似重量之胺基酸殘基（亦即，與其所取代之對應多肽序列中之殘基具有重量同源性之殘基）的取代。多肽胺基酸殘基之重量（以及對應之大小）對於多肽之結構具有顯著之影響。重量基礎性之保守性或同源性係根據非相同之對應胺基酸在本文所述之重量基礎性矩陣之一中（如，BLOSUM50矩陣；PAM250矩陣）是否連結正評分。

與上述之功能性胺基酸類別相似，可將天然之胺基酸殘基劃分為重量基礎性保守組群（其區分為「強」及「弱」保守組群）。常用之八個重量基礎性強保守組群為Ser Thr Ala、Asn Glu Gln Lys、Asn His Gln Lys、Asn Asp Glu Gln、Gln His Arg Lys、Met Ile Leu Val、Met Ile Leu Phe、His Tyr、and Phe Tyr Trp。重量基礎性弱保守性群包括Cys Ser Ala、Ala Thr Val、Ser Ala Gly、Ser Thr Asn Lys、Ser Thr Pro Ala、Ser Gly Asn Asp、Ser Asn Asp Glu Gln Lys、Asn Asp Glu Gln His Lys、Asn Glu Gln His Arg Lys、Phe Val Leu Ile Met、and His Phe Tyr。部分版本之CLUSTAL W序列分析程式在排比之輸出中提供對於重量基礎性強保守性及弱保守性組群之分析，因而提供用以判定重量基礎性保守性之便利技術（如，由SDSC所提供之CLUSTAL W，其一般而言係以SDSC系統預設值之設定而使用）。在部分態樣中，在該等多肽變體中至少33%、50%、60%、70%、80%或90%之取代包含其中在一重量基礎性保守性組群中之殘基取代在該相同重量基礎性保守性組群中之多肽序列胺基酸殘基的取代。換言之，就胺基酸殘基重量之特徵而言，該百分比之取代係保守性者。

該多肽變體之序列可與本發明之突變CTLA-4多肽序列具有由一或多個與該突變CTLA-4多肽之經取代（原始）殘基具有類似親水特性（亦即，具有類似親水性）之胺基酸殘基所進行之一或多個胺基酸取代的差異。親水特性可使用Kyte & Doolittle指數判定，各種天然胺基酸在該指數中之評分如下：I（+4.5）、V （+4.2）、L （+3.8）、F （+2.8）、C （+2.5）、M（+1.9）; A（+1.8）、G（-0.4）、T（-0.7）、S（-0.8）、W（-0.9）、Y （-1.3）、P （-1.6）、H （-3.2）; E （-3.5）、Q （-3.5）、D（-3.5）、N （-3.5）、K （-3.9）及R （-4.5） （進一步之討論參見，如，美國專利第4,554,101號及Kyte & Doolittle、J. Molec. Biol. 157:105-32 （1982））。該變體多肽序列中之至少75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%98%、99%或100%之胺基酸殘基不同於本文所揭示之相同性或功能性同源突變CTLA-4多肽序列（「最相關同源物」）中之對應殘基，該同源物可係選自SEQ ID NOS:1-73中之任一者，其相對該最相關同源物中對應位置之非相同性胺基酸殘基具有小於+/-2之親水性變化，包括小於+/-1之親水性變化以及小於+/-0.5之親水性變化。相對其選自SEQ ID NOS:1-73之群之最相關同源物，該變體多肽可具有小於約150、小於約100及/或小於約50 （如，小於約30、20或10）之總親水性變化。

保留類似或相同親水性之典型胺基酸取代實例包括精胺酸-離胺酸取代、麩胺酸-天冬胺酸取代、絲胺酸-羥丁胺酸取代、麩醯胺-天冬醯胺取代、以及纈胺酸-白胺酸-異白胺酸取代。算法及軟體，諸如，可經由SDSC取得之GREASE程式，可提供用以快速評估胺基酸序列親水特性之便利方式。由於多肽變體序列中實質比例（如，至少約33%）之胺基酸取代（如非大部分（至少50%）或將近全部（如，約65、80、90、95、96、97、98、99%））通常將會與其在該（參照）多肽序列中所取代之胺基酸殘基具有類似之親水性分數，該多肽變體序列預期會與該多肽序列具有類似之GREASE程式輸出結果。舉例

而言，在一特定態樣中，SEQ ID NO:61之多肽變體預期會具有之GREASE程式（或類似程式）輸出結果係較類似由輸入SEQ ID NO:61之多肽所取得之GREASE輸出結果，而非使用WT CTLA-4多肽（如，hCTLA-4）所取得者，此可藉著就對該試驗序列與SEQ ID NO:1執行該程式而提供之圖形（如，圖形重疊/排比）及/或數字輸出結果進行目視檢驗或是電腦輔助性比較而判定。

就功能同源性、重量同源性、以及親水特性所言之胺基酸殘基保守性亦可應用於其他由本發明所提供之多肽序列變體，其包括，但不限於，具有選自由SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222所組成之群之多肽序列的多肽序列變體。

在一特定態樣中，本發明包括至少一個此種多肽變體，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之群的重組多肽序列不同，其中該變體之胺基酸序列具有至少一個此種根據如上所述之重量基礎性保守性或同源性或是類似之親水特性而選擇之胺基酸殘基取代。此等上述之多肽變體一般而言具有結合CD80及/或CD86之能力，及/或抑制至少一種類型免疫反應之能力，其係如上所述並在實例中於下文進一步詳述。

信號肽序列

本發明之多肽亦可包含任何數目及類型之其他胺基酸序列，諸如，一或多個肽片段。在一具體實例中，此種本發明之多肽進一步包含信號肽。一般而言，該信號肽可在該重組多肽在動物細胞中表現時，指引該重組多肽到達內質網。可包括可指引該多肽（當其在細胞中表現時）之至少一部份的胞器運輸及/或分泌之信號肽。此等序列一般而言存在於該多肽之不成熟（亦即，未經完全加工）形式中，並接著由細胞蛋白酶除去/降解，以達成該蛋白之成熟形式。舉例而言，本發明之突變CTLA-4多肽或融合蛋白可包括任何適當之信號序列或是信號

序列之組合，其可指引該多肽到達胞內區隔中，諸如可指引該多肽被運輸（如，移位）進入內質網或分泌途徑（如，ER、高基氏體、以及其他分泌相關性胞器及細胞區隔）（如，以使該蛋白由其加工或自其釋放）、細胞核，以及/或是可指引該多肽由該細胞分泌、在細胞膜中移位或是靶向除外分泌該蛋白之細胞之第二細胞的序列。在此態樣中，該多肽可包括胞內靶向序列（或「分選信號」），其可指引該多肽到達核內體及/或溶酶體區隔或是其他富含MHC II之區隔，以促進CD4+及/或CD8+ T細胞呈遞及反應，諸如，衍生自溶酶體相關膜蛋白1之溶酶體/核內體靶向分選信號（如，LAMP-1 - 參見，如，Wu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1161-75 （1995）及Ravipraskash et al., Virology 290:74-82 （2001））、其同源體之部分（參見，如，美國專利第5,633,234號）或是其他適當之溶酶體、核內體及/或ER靶向信號（參見，如，美國專利第6,248,565號）。在部分態樣中，其可能需要使該胞內靶向序列位於接近或毗鄰該多肽中經證實/辨識之抗原表位序列（其可由技藝中已知之技術辨識），因而增加包含此（等）抗原表位之多肽片段進行T細胞呈遞之可能性。此等多肽可自由一或多個核苷酸轉移載體傳遞至宿主細胞中之分離、重組或合成DNA或RNA而表現，該等載體包括，如，一或多個基因轉移載體，如本文進一步敘述。

該多肽可包含一信號肽，其可在該多肽表現於哺乳動物細胞中時指引該多肽到達內質網（ER）（如，協助該多肽之ER移位）。該多肽可包含任何適當之ER-靶向序列。諸多ER-靶向序列皆係技藝中所已知。此等信號序列之實例述於美國專利第5,846,540號。常用之ER/分泌信號序列包括酵母菌α因子信號序列，以及哺乳動物病毒信號序列，諸如，皰疹病毒gD信號序列。大腸桿菌生產之例示性信號肽包括大腸桿菌之STII或Ipp信號序列。信號序列之其他實例述於，如，美國專利第4,690,898、5,284,768、5,580,758、5,652,139及5,932,445號。使

當之信號序列可使用技藝中已知之技藝而辨識。舉例而言，可使用SignalP程式（述於，如，Nielsen et al. （1997） Protein Engineering 10:1-6），其可在指定為cbs.dtu.dk/services/SignalP之全球資訊網址經由生物序列分析中心（Center for Biological Sequence Analysis）而為公眾取得，或是可辨識似信號序列域之類似序列分析軟體。用以辨識適當信號肽之相關技術提供於Nielsen et al., Protein Eng. 10（1）:1-6 （1997）。可對序列進行手動分析，尋找常與信號序列相關之特徵，如述於，如，歐洲專利申請案（Appn）第0 621 337號，Zheng and Nicchitta（1999） J. Biol. Chem. 274（51）: 36623-30，及Ng et al. （1996） J. Cell Biol. 134（2）:269-78。

其他態樣

任何本發明之多肽（包括任何本發明之融合蛋白）皆可以較大多肽序列之部分的形式存在，諸如，在添加一或多個蛋白域或序列以安定或偵測或純化該多肽時所產生者。此等蛋白域或序列可共價融合本發明之多肽，如熟習技藝者可輕易明瞭並可建構者。多肽純化序列可包括，如，抗原表位標記、FLAG標記、聚組胺酸序列、GST融合物或是技藝所知任何其他偵測/純化亞序列或「標記」。此等額外之蛋白域或是亞序列或係對於本發明多肽之活性具有極少或無作用，或係可由合成後加工步驟除去，諸如，藉由蛋白酶之處理、蛋白內含子（intein）之包括或是其類似者。

任何本發明之多肽（包括任何本發明之融合蛋白）亦可包含一或多個經修飾之胺基酸。該經修飾之胺基酸可為，如，糖基化胺基酸、PEG化胺基酸、法尼基化（farnesylated）胺基酸、乙醯基化胺基酸、生物素化胺基酸、複合脂質分子部分之胺基酸及/或複合有機衍化劑之胺基酸。經修飾胺基酸之存在可有益於，例如，（a） 增加多肽之血清半生期及/或功能性活體內半生期，（b） 降低多肽之抗原性或免疫原性，（c） 增加多肽貯存安定性，（d） 增加生物可利用性，（e） 降低效應子功能，

及/或（f） 降低或抑制二或多個本發明分子間（諸如在二或多個本發明之融合蛋白二聚體間）之非所欲性自體連結（如，凝聚物形成）。胺基酸可在，例如，重組生成期間進行，例如，共轉譯性或後轉譯性之修飾（如，在於哺乳動物細胞中表現期間，在N-X-S/T基序進行N-連結性糖基化作用），或是可由合成方式進行修飾。

本文所述之本發明多肽（包括本發明之融合蛋白）可以各種方式進行進一步之修飾，如，後轉譯性修飾及/或合成性修飾或變化。舉例而言，本發明之多肽或融合蛋白可適當經糖基化，一般而言係經由在哺乳動物細胞中表現。舉例而言，在一態樣中，本發明提供糖基化之多肽，其可結合CD86及/或CD80，以及/或是具有壓抑免疫反應之能力（如，T細胞之增殖或活化），如本文他處所述，其中各個該經糖基化之多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222所組成之群之序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。

可對本發明之多肽進行任何數目其他適當形式之後轉譯性及/或合成性之修飾或變化。舉例而言，本發明提供本發明多肽之蛋白模擬物。肽模擬物係述於，如，美國專利第5,668,110號以及其中所引述之參考文獻中。

在另一態樣中，本發明之多肽或融合蛋白可藉著將保護基加至該多肽融合蛋白之一或多個胺基酸之側鏈而修飾。此等保護基可協助將該多肽或融合蛋白運輸通過膜（如需要），或是通過某些組織，例如，藉由降低該多肽或融合蛋白之親水性或是增加其親脂性。適當保護基之實例包括酯保護基、胺基保護基、醯基保護基及羧酸保護基，其係技藝中所已知（參見，如，美國專利第6,121,236號）。本發明之合成性融合蛋白可為任何適當之形式。舉例而言，該融合蛋白可由其天然構形經結構修飾而形成環狀肽或其他經結構修飾之肽。

本發明之多肽亦可連接一或多個非蛋白性之聚合物，一般

而言係親水合成聚合物，如，聚乙二醇（PEG）、聚丙二醇或聚氧化烯烴，使用技藝中所熟知之技術，諸如，述於，如，美國專利第4,179,337、4,301,144、4,496,689、4,640,835、4,670,417及4,791,192號者，或是類似之聚合物，諸如，聚乙烯醇或聚乙烯吡咯啶酮（PVP）。

本發明包括複合物，其包含至少一種本發明之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體或單體突變CTLA-4-Ig、多聚體突變CTLA-4 ECD多肽、多聚體突變CTLA-4-Ig）以及一種非多肽分子部分。名辭「複合物」（或可交互使用之「複合多肽」）係意指一種異源（就複合物或嵌合物之意義而言）分子，其係由一或多個多肽與一或多個非多肽分子部分之共價連附而形成。名辭「共價連附」意謂該多肽及該非多肽分子部分或係彼此直接共價連結，或係經由中間分子部分或多個分子部分（諸如，橋、間隔子或連結分子部分及多個分子部分），使用存在於該多肽中之連附基團而間接共價連結。較佳者，該複合物在相關濃度及條件下係為可溶，意即，可溶於生理液體中，諸如血液。本發明複合多肽之實例包括糖基化及/或PEG化多肽。名辭「未複合多肽」可用於說明該複合物之多肽部分。此種複合物一般而言可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86（如，hCD86）及/或其任一或兩者之胞外域（包括hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應之能力。此種免疫反應可包含，但不限於，如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成/生成、活化標記之誘發、發炎分子之生成、發炎、抗膠原Ab之生成及/或T細胞相關性Ab反應。例示性之多肽包括該等與SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性者。

名辭「非多肽分子部分」係意指一分子，其可與本發明多肽之連附基團複合。此種分子之較佳實例包括聚合物分子、糖類分子部分、親脂性化合物或有機衍化劑。在用於本文所述複

合物之內容中時，咸將可明瞭，該非多肽分子部分係經由多肽之連附基團而與該複合物之多肽部分連結。

名辭「聚合物分子」係定義為一分子，其係由二或多個單體之共價連結所形成，其中該等單體中並無任一者係胺基酸殘基，除外其中該聚合物係人類白蛋白或另一大量血漿蛋白之情形。名辭「聚合物」可與名辭「聚合物分子」交互使用。

N-糖基化位點具有序列N-X-S/T/C，其中X係除外脯胺酸之任何胺基酸殘基，N係天冬醯胺，且S/T/C係絲胺酸、羥丁胺酸或半胱胺酸，較佳者係絲胺酸或羥丁胺酸，且最佳者係羥丁胺酸。

「O-糖基化位點」包含絲胺酸或羥丁胺酸殘基之OH-基團。

名辭「連附基團」意指該多肽可偶合該相關非多肽分子部分（諸如，聚合物分子或糖類分子部分）之胺基酸殘基基團。可用連附基團之非限制性實例及部分對應之非多肽分子部分提供於下表2中。

表2. 可用之連附基團以及對應非多肽分子部分之實例

連附基團	胺基酸	非多肽分子部分之實例	複合方法/活化 PEG 之實例	參考文獻
$-NH_2$	N-端, Lys	聚合物, 如, PEG	mPEG-SPA mPEG2-NHS mPEG2-butyrALD	Nektar Inc. 2003 Catalog; 亦參見 Nektar Therapeutics, 2005-06 Catalog

連附基團	胺基酸	非多肽分子部分之實例	複合方法/活化 PEG 之實例	參考文獻
-COOH	C-端, Asp, Glu	聚合物, 如, PEG 糖類分子部分	mPEG-Hz 活體外之偶合	Nektar, Inc. 2003 Catalog; 亦參見 Nektar Therapeutics 2005-06 Catalog
-SH	Cys	聚合物, 如, PEG 糖類分子部分	mPEG-VS mPEG2-MAL（mPEG-順丁烯二醯亞胺） 活體外之偶合	Nektar Inc. 2003 Catalog; Nektar Therapeutics 2005-2006 Catalog; Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9（3,4）:249-304 （1992）
-OH	Ser, Thr, OH-	糖類分子部分	活體內之 O-連結性糖基化作用	
-$CONH_2$	作為 N-糖基化位點部分之 Asn	糖類分子部分	活體內之 N-糖基化作用	
芳族殘基	Phe, Tyr, Trp	糖類分子部分	活體外之偶合	

連附基團	胺基酸	非多肽分子部分之實例	複合方法/活化PEG之實例	參考文獻
$-CONH_2$	Gln	糖類分子部分	活體外之偶合	Yan and Wold, Biochemistry, 1984, Jul 31; 23 (16): 3759-65
醛 酮	氧化醣	聚合物, 如, PEG, PEG-醯肼	PEG化作用	Andresz et al., 1978, Makromol. Chem. 179:301; WO 92/16555, WO 00/23114
胍基	Arg	糖類分子部分	活體外之偶合	Lundblad and Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FI
咪唑環	His	糖類分子部分	活體外之偶合	同胍

就活體內之N-糖基化作用而言，名辭「連附基團」係以非習知之方式使用而指稱構成N-糖基化位點之該等胺基酸殘基（具有序列N-X-S/T/C，其中X係除外脯胺酸之任何胺基酸殘基，N係天冬醯胺，且S/T/C係絲胺酸、羥丁胺酸或半胱胺酸，較佳者係絲胺酸或羥丁胺酸，且最佳者係羥丁胺酸）。儘管N-糖基化位點之天冬醯胺殘基係糖基化作用過程中該糖類分子部分所連附者，除非存在該N-糖基化位點之其他胺基酸殘基，此種連附即無法達成。因

此，當該非多肽分子部分係糖類分子部分且該複合係欲以N-糖基化作用達成，在結合本發明多肽胺基酸序列之變化而使用時，名辭「包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基」係欲被明瞭為構成N-糖基化位點之一個、兩個或所有胺基酸殘基受到改變，其方式或可將功能性N-糖基化位點引入該胺基酸序列中或可自該序列中除去功能性N-糖基化位點或可在該胺基酸序列中保留功能性N-糖基化位點（如，藉著以羥丁胺酸殘基取代已構成N-糖基化位點部分之絲胺酸殘基，或是相反之情形）。

名辭「引入」（意即，「引入」之胺基酸殘基，胺基酸殘基之「引入」）主要係欲意謂以另一胺基酸殘基取代既有之胺基酸殘基，但亦可意謂插入額外之胺基酸殘基。

名辭「除去」（意即，「除去」之胺基酸殘基，胺基酸殘基之「除去」）主要係欲意謂以另一胺基酸殘基取代欲除去之胺基酸殘基，但亦可意謂移除（無取代）該欲除去之胺基酸殘基。

名辭「包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基」係意指該胺基酸殘基係該非多肽分子部分所結合（就引入之胺基酸殘基而言）或原本可能結合（就除去之胺基酸殘基而言）者。

藉由除去及/或引入包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基，咸可能專一修改本發明之多肽，以使該分子更易與該所選之非多肽分子部分複合、使該複合模式最適化（如，確保該非多肽分子部分在該多肽表面之最適分布，並因而，如，有效遮蔽抗原表位及該多肽之其他表面部分，同時不顯著損害其功能）。舉例而言，藉由引入連附基團，該多肽於該相關非多肽分子部分所結合之特定胺基酸殘基內容上獲得改變，因而達成更為有效、特定及/或廣泛之複合。藉由除去一或多個連附基團，其可能避免在此種複合作用具有不利性之多肽部分與該非多肽分子部分進行複合，如，在位於或接近該多肽功能位點之胺基酸殘基處（因此種位點處之複合作用可造成該所得複合物之失活或是降低之CD80-或CD86-結合或是降低之免疫抑制活性）。同時，移除鄰近另一連附基團處之連附基團可能為有利者。

包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基（不論其係既有之殘基或是除去或引入之殘基）係根據該非多肽分子部分之性質而選擇，並在部分情形下，根據欲使用之複合方法而選擇。舉例而言，當該非多肽分子部分係聚合物分子時，諸如，聚乙二醇（PEG）或聚氧化烯烴（PAO）衍生性分子，可作為連附基團之胺基酸殘基可選自由半胱胺酸、離胺酸（及/或該多肽之N-端胺基）、天冬胺酸、麩胺酸、組胺酸及精胺酸所組成之群。當該非多肽分子部分係糖類分子部分時，該連附基團係活體內或活體外之N-或O-糖基化位點，較佳者係N-糖基化位點。

在部分情形下，在本發明複合物之突變CTLA-4多肽部分中，其除去位在或接近受體結合位點之連附基團，諸如，藉由取代包含此種基團之胺基酸殘基。在部分情形下，其通常不會將包含該非多肽分子部分連附基團之胺基酸殘基（諸如，半胱胺酸或離胺酸）引入至位在或接近該突變CTLA-4多肽之受體結合位點處。

藉由複合非多肽分子部分，本發明之突變CTLA-4多肽可經修飾，以遮蔽並因而修飾或摧毀存在於該突變CTLA-4多肽中之抗原表位或以其他方式使其失活。突變CTLA-4多肽之抗原表位可藉由使用技藝中已知之方法而辨識，其亦稱為抗原表位作圖，參見，如，Romagnoli et al., J. Biol. Chem. 380(5):553-9（1999），DeLisser HM, Methods Mol Biol, 1999, 96:11-20，Van de Water et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 85（3）:229-35 （1997），Saint-Remy JM, Toxicology 119（1）:77-81 （1997）。

可用於進行複合及存在於突變CTLA-4多肽中之確切連附基團數目取決於欲藉由複合而達成之作用。該欲取得之作用係，如，依賴複合之性質及程度（如，該非多肽分子部分之身分、所欲或可能複合該多肽之非多肽分子部分數目、其應在何處複合或是何處應避免複合等）。舉例而言，如欲取得降低之免疫原性，連附基團之數目（以及位置）應足以遮蔽大部分或全部之抗原表位。這一般而言是在較大部分之該突變CTLA-4多肽獲得遮蔽之情形下取得。抗原表位之有效遮蔽一般而言是在當該可用於複合之連附

基團總數係在1-6個連附基團之範圍中時達成（如，1-5個），諸如，在1-3個連附基團之範圍中（諸如，1、2或3個）。

功能性之活體內半生期可取決於該複合物之分子量，而用以提供增加半生期所需之連附基團數目因此取決於該所論非多肽分子部分之分子量。部分此等複合物包含1-6個（如，1-5個），諸如，1-3個（如，1、2或3個）非多肽分子部分，其各具有約100-2000道耳吞（Da）之分子量，諸如約200 Da、約300 Da、約400 Da、約600 Da、約900 Da、約1000 Da或約2-40 kDa，諸如約2 kDa、約5 kDa、約12 kDa、約15 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa或約60 kDa。

在本發明之複合物中，其部分、大部分或實質上全部之可複合性連附基團皆由該相關非多肽分子部分佔據。

本發明之複合物可具有一或多個下列之改良特性：(a) 增加之血清半生期及/或功能性活體內半生期，(b) 降低之抗原性或免疫原性，(c) 增加之貯存安定性，(d) 增加之生物可利用性，(e) 降低之效應子功能，或是(f) 降低或抑制之二或多個本發明分子間之自體連結（如，降低之凝聚物形成）。舉例而言，該複合物可具有相較於hCTLA-4或是相較於對應未複合多肽之降低免疫原性，如，至少10%之降低，諸如至少25%之降低，諸如至少50%之降低，如，至少75%之降低，相較於該未複合多肽或是相較於hCTLA-4。該複合物可具有相較於參照分子（諸如，hCTLA-4）或是相較於對應未複合多肽之增加功能性活體內半生期及/或增加血清半生期。特別較佳之複合物係該等複合物，其中該複合物之功能性活體內半生期（或血清半生期）與該參照分子之功能性活體內半生期（或血清半生期）間之比例係至少1.25，諸如至少1.50，諸如至少1.75，諸如至少2，諸如至少3，諸如至少4，諸如至少5，諸如至少6，諸如至少7，諸如至少8。該半生期係在實驗動物（諸如，大鼠或猴）體內，且可根據靜脈或皮下投藥而便利測定。在另一態樣中，該複合物可具有相較於參照分子（諸如，hCTLA-4）或是相較於對應未複合多肽之增加生物可利用性。

該欲偶合該多肽之聚合物分子可為任何適當之聚合物分子，諸如，天然或合成之同元聚合物或異元聚合物，一般而言具有300-100,000 Da範圍之分子量，諸如，300-20,000 Da，較佳者係在500-10,000 Da範圍內，甚至更佳者係在500-5000 Da範圍內。

同元聚合物之實例包括多元醇（意即，聚-OH）、聚胺（意即，聚-NH_2）及聚羧酸（意即，聚-COOH）。異元聚合物係一種聚合物，其包含一或多種不同之偶合基團，諸如，如，羥基及胺基。適當聚合物之實例包括選自由聚氧化烯烴（POA），包括聚烯烴基二醇（PAG），諸如，聚乙二醇（PEG）及聚丙二醇（PPG）、支鏈PEGs、聚乙烯醇（PVA）、聚羧酸、聚乙烯吡咯啶酮、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、葡聚糖，包括羧甲基葡聚糖或是適用於降低免疫原性以及/或是增加功能性活體內半生期及/或血清半生期之任何其他生物聚合物所組成之群的聚合物分子。聚合物分子之另一實例係人類白蛋白或另一大量血漿蛋白。一般而言。聚乙二醇衍生性聚合物係生物可相容、無毒性、無抗原性、無免疫原性、具有各種水可溶性、且可輕易自活生物體排泄者。

PEG係待使用之較佳聚合物分子，因其相較於，如，多醣類，諸如，葡聚糖，或其類似者，僅具有極少數可進行交聯之反應基團。特定言之，單功能性PEG，如，單甲氧基聚乙二醇（mPEG）係具有益處者，因其偶合化學相對簡單（僅有一個反應基可用於與該多肽上之連附基團複合）。因此，其排除了交聯之風險，而該所得之多肽複合物即較為勻質，且該聚合物分子與該多肽之反應則較易控制。當該分子經PEG化時，其通常包含1、2、3、4或5個聚乙二醇（PEG）分子。各個PEG分子可具有約5 kDa（千道耳吞）至100 kDa之分子量，包括，如，約10 kDa、約12 kDa、約20 kDa、約40 kDa。適當之PEG分子可自Shearwater Polymers, Inc.及Enzon, Inc.取得，且其可選自SS-PEG、NPC-PEG、醛-PEG、mPEG-SPA、mPEG-SCM、mPEG-BTC、SC-PEG、三氟乙基磺酸單甲氧基化（tresylated） mPEG （US 5,880,255）或是氧羰基-氧基-N-二甲醯亞胺-PEG （US 5,122,614）。

在一態樣中，本發明提供分離或合成之複合物，其包含：(a)本發明之多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽、二聚體或單體突變CTLA-4-Ig、多聚體突變CTLA-4 ECD多肽、多聚體突變CTLA-4-Ig)；以及（b） 至少一種非多肽分子部分，諸如，如，1-10、1-9、1-8、1-7、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1、2或3個非多肽分子部分連附於該多肽上，其中該複合物可結合CD80 （如，hCD80）及/或CD86 （如，hCD86）及/或其任一或兩者之胞外域（包括hCD80-Ig及/或hCD86-Ig)，以及/或是具有誘發抑制免疫反應之能力（如，T細胞相關性免疫反應)。例示性之多肽包括該等與選自SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222之群的多肽序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性者。在部分情形下，該複合物包括二、三、四或多個非多肽分子部分。在部分情形下，該複合物之多肽的胺基酸序列進一步包含一或多個取代，其各引入一個該非多肽分子部分之連附基團（如，藉著以包含該非多肽分子部分連附基團之不同殘基取代該多肽序列之胺基酸殘基，或是藉著在該多肽序列中插入包含該非多肽分子部分連附基團之額外胺基酸殘基)。

複合物可包含二或多個本發明之多肽。在部分情形下，非多肽分子部分係共價連附該等多肽之任一或兩者。如該複合物包含二或多種相同之本發明多肽，一般而言係有相同類型及數目之非多肽分子部分連附於各個此等多肽上，通常係以相同方式連附各多肽上之對應連附基團。如上所註記，該非多肽分子部分可包含，如，糖類分子，其視情況可連附於N-糖基化位點，或是聚合物，諸如，如，聚乙二醇分子部分。該聚乙二醇分子部分可共價連附於本發明多肽之半胱胺酸殘基或離胺酸殘基。在部分情形下，該聚乙二醇分子部分係共價連附於該多肽之N-端胺基。包含本發明突變CTLA-4-Ig之複合物可敘述為本發明之突變CTLA-4-Ig複合物。亦包括複合物之多聚體。多聚體複合物包括二或多個複合物，其中至少一個複合物係包含至少一種本發明多肽之本發明複合物。在多聚體複合物中之該等複合物可為（但不一定必須）彼此

相同。

如上所論，本發明之多肽，包括本發明之融合蛋白，常可進行糖基化。本發明之多肽及融合蛋白可進一步進行（或經修飾以使其可進行）其他形式之後轉譯修飾，包括，如，羥化、脂質或脂質衍生物之連附、甲基化、十四烷基化、聚乙二醇化、磷酸化及硫酸化。可致使本發明之多肽及融合蛋白進行之其他後轉譯修飾包括乙醯化、醯化、ADP-核糖基化、醯胺化、核黃素之共價連附、原血紅素分子部分之共價連附、核苷酸或核苷酸衍生物之共價連附、磷脂醯肌醇之共價連附、交聯、環化、雙硫鍵形成、脫甲基化、甲醯化、GPI錨之形成、碘化、氧化、蛋白水解加工、異戊烯化、外消旋化、硒化、精胺酸化及泛素化。其他常見之蛋白修飾述於，如，Creighton, 上述文獻，Seifter et al., Meth. Enzymol. 18:626-646 （1990），及Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663:48-62（1992）。在宿主細胞中自核酸表現之多肽或融合蛋白之後轉譯修飾根據該多肽表現所在之宿主種類或宿主細胞類型而各異。舉例而言，糖基化作用通常不會在細菌宿主（諸如，大腸桿菌）中發生，並在桿狀病毒系統中有相當之變異（相較於哺乳動物細胞系統）。因此，在需要糖基化作用時（其通常係大部分本發明多肽之情形），多肽或融合蛋白應在糖基化宿主中表現（生產），一般而言係真核細胞（如，哺乳動物細胞或昆蟲細胞）。以後轉譯修飾而進行之多肽或融合蛋白之修飾可由任何適當之技術驗證，包括，如，X光散射、NMR顯影、質譜分析及/或層析（如，反相層析、親和層析或GLC）。

該多肽或融合蛋白亦可或是或可包含任何適當數目之非天然胺基酸（如，β胺基酸），及/或其他胺基酸（如，硒代半胱胺酸（selenocysteine）），或是胺基酸類似物，諸如該等列於Manual of Patent Examining Procedure § 2422 （7th Revision – 2000）者，其可由蛋白合成納入，諸如，經由固相蛋白合成（如述於，如，Merrifield, Adv. Enzymol. 32:221-296 （1969）以及其他其中所引述之參考文獻）。本發明之多肽或融合蛋白可藉由納入至少一個經

修飾之胺基酸而進一步修飾。該一或多個經修飾胺基酸之納入可可有益於，例如，(a) 增加多肽或融合蛋白之血清半生期，(b) 降低多肽或融合蛋白之抗原性，或是 (c) 增加多肽或融合蛋白之貯存安定性。胺基酸可在重組生成期間進行，例如，共轉譯性或後轉譯性之修飾(如，在於哺乳動物細胞中表現期間，在N-X-S/T基序進行N-連結性糖基化作用)，或是可由合成方式進行修飾。經修飾胺基酸之非限制性實例包括糖基化胺基酸、硫酸化胺基酸、異戊烯化（如，法尼基化、四異戊二烯化（geranylgeranylated））胺基酸、乙醯化胺基酸、醯化胺基酸、PEG化胺基酸、生物素化胺基酸、羧化胺基酸、磷酸化胺基酸及其類似者。適於引導熟習技藝者進行胺基酸修飾之參考文獻在文獻中相當充分。實例操作流程可見於Walker（1998）Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, Towata, NJ。該經修飾之胺基酸可選自糖基化胺基酸、PEG化胺基酸、法尼基化胺基酸、乙醯化胺基酸、生物素化胺基酸、複合脂質分子部分之胺基酸、以及複合有機衍化劑之胺基酸。

本發明進一步提供具有上述特性之多肽（包括融合蛋白），其尚包含可影響該多肽（或融合蛋白）生物功能（如，免疫原性、靶向及/或半生期）之額外胺基酸序列。

本發明之多肽或融合蛋白可進一步包括除外信號序列之靶向序列，或是在信號序列外尚包括靶向序列。舉例而言，該多肽或融合蛋白可包含一序列，其可靶向位於特定細胞類型上之受體（如，單核細胞、樹狀細胞或相關細胞），以提供該多肽對於此等細胞及/或相關組織之靶向傳遞。信號序列述於文，且其包括膜定位/錨定序列（如，中止轉移序列、GPI錨序列）及其類似者。

本發明多肽（包括本發明之融合蛋白）之其中一種特別有用之融合配對物係可協助該多肽純化之肽序列，如，多肽純化亞序列。本發明之聚核苷酸可包含一編碼序列，其以符合讀框之方式融合標記胺基酸序列，其可，如，協助該經編碼多肽純化。此等純化協助性肽功能域或多肽純化亞序列包括，但不限於，金屬螯合肽，諸如，組胺酸-色氨酸模組，其可容許在經固定之金屬上進

行純化，諸如，六組氨酸肽或其他聚組胺酸序列（其中一種編碼此種標記之序列被納入可由QIAGEN, Inc. （Chatsworth, California）取得之載體中）、可結合麩胱甘肽之序列（如，麩胱甘肽-S-轉移酶（GST））、血球凝集素（HA）標記（對應於衍生自流感血球凝集素蛋白之一抗原表位；Wilson et al., Cell 37:767（1984））、麥芽糖結合蛋白序列、用於FLAGS延伸/親和純化系統中之FLAG抗原表位（Immunex Corp, Seattle, WA）（市售可得之FLAG抗原表位亦可經由Kodak （New Haven, Connecticut）取得）、E-抗原表位標記（E-tag）、硫氧還蛋白（TRX）、親和素，及其類似者。純化協助性抗原表位標記已述於技藝中（參見，如，Whitehorn et al., Biotechnology 13:1215-19 （1995））。多肽可包括e-his標記，其可包含一聚組胺酸序列以及一抗-e-抗原表位序列（Pharmacia Biotech Catalog）；e-his標記可以標準技術製備。在該純化域及該多肽間納入一蛋白酶可切割性多肽連接子序列可用於協助純化。組胺酸殘基可協助在IMIAC上進行純化（固定金屬離子親和層析（IMAC），如述於Porath et al. Protein Expression and Purification 3:263-281 （1992）），而腸激酶切割位點則可提供一種用以使該多肽由該融合蛋白分離之方法。亦可使用pGEX載體（Promega; Madison, WI）而以與麩胱甘肽-S-轉移酶（GST）之融合蛋白的形式表現外源多肽。一般而言，此等融合蛋白係可溶性者，且可藉由吸收至配位體-瓊脂糖珠上（如，麩胱甘肽-瓊脂糖，就GST-融合物之情形而言），接著再在自由配位體之存在下進行溶析而輕易自經裂解之細胞中純化。多肽純化協助性亞序列之其他實例以及其對蛋白純化之應用述於，如，國際專利申請公開案WO 00/15823。在表現目標多肽並以此等融合配對物或其他如上所述之方法分離後，可使用蛋白再折疊步驟，如需要，以完成該成熟多肽之構形。

本發明之融合蛋白亦可包括一或多個額外之肽片段或肽部分，其可促進該融合蛋白之偵測。舉例而言，可將報導肽片段或部分（如，綠螢光蛋白（GFP）、β-半乳糖苷酶或其可偵測功能域）

納入該融合蛋白中。其他可與本發明多肽複合之標記分子包括放射核素、酶、螢光團、小分子配位體及其類似者。此等偵測促進性融合配對物特別可用於在本文他處所論及之診斷技術用融合蛋白。

在另一態樣中，本發明之多肽可包含一融合配對物，其可促進該多肽之安定性、該多肽之分泌（非信號靶向）或兩者。舉例而言，該多肽可包含免疫球蛋白（Ig）域，諸如，包含Fc鉸鏈區、CH2域及CH3域之IgG多肽，其可促進該多肽之安定性及/或分泌。

該等融合蛋白肽片段或肽部分可以任何適當方式連結。該融合蛋白之各種不同多肽片段或部分可經共價相連（如，藉由肽或雙硫鍵）。該等多肽片段或部分可直接融合（如，本發明之抗原性或免疫原性序列之C-端可與純化序列或異源免疫原性序列之N-端融合）。該融合蛋白可在該等肽部分之間包括任何適當數目之經修飾鍵結，如，同電子排列體。或者或是此外，該融合蛋白可在一或多個多肽片段或部分之間包括肽連接子，其包括一或多個不形成該生物活性肽部分之部分的胺基酸序列。可使用任何適當之肽連接子。此種連接子可為任何適當之大小。一般而言，該連接子係小於約30個胺基酸殘基，小於約20個胺基酸殘基，及/或小於約10個胺基酸。該連接子主要可包含中性胺基酸殘基，或係由其組成。適當之連接子通述於，如，美國專利第5,990,275、6,010,883、6,197,946號，以及歐洲專利申請案0 035 384。如需要分離肽片段或肽部分，可使用可協助分離之連接子。此種連接子之實例之一述於美國專利第4,719,326號。「撓性連接子」可為較佳者，其一般而言係由甘胺酸及/或絲胺酸殘基之組合構成。此種連接子之實例述於，如，McCafferty et al., Nature 348:552-554 （1990），Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 （1988），Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362-1367 （1990），及Cheadle et al., Molecular Immunol. 29:21-30 （1992），Bird et al., Science 242:423-26 （1988），以及美國專利第5,672,683、6,165,476及6,132,992號。

連接子之使用亦可降低對於該融合蛋白之非所欲性免疫反

應，該融合蛋白係藉著融合兩個肽片段或肽部分而產生，其可造成非所欲之MHC I及/或MHC II抗原表位存在於該融合蛋白中。除使用連接子外，經辨識之非所欲性抗原表位序列或是毗鄰序列可經PEG化（如，藉由插入離胺酸殘基以促進PEG連附）以遮蔽經辨識之抗原表位不使其暴露。其他用以降低本發明融合蛋白免疫原性之技術可結合該融合蛋白之投與而使用，包括提供於美國專利第6,093,699號之技術。

製備多肽

用以製備及分離本發明多肽（包括本發明融合蛋白）之重組方法述於下文。除重組製備外，該等多肽可使用固相技術而以直接之肽合成進行製備（參見，如，Stewart et al.（1969）Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield（1963） J. Am. Chem. Soc 85:2149-2154）。肽合成可使用手動技術或是藉由自動化而進行。自動化之合成可，例如，使用Applied Biosystems 431A肽合成儀（Perkin Elmer, Foster City, Calif.），根據製造商所提供之指示而達成。舉例而言，可分別以化學合成亞序列，並使用化學方法結合，以提供突變CTLA-4多肽或其功能性片段。或者，此等序列可自任何專門生產多肽之公司訂購。最常見者，本發明之多肽係藉由表現編碼核酸並回收多肽而製備，如，如下所述。

本發明提供用以製備本發明多肽（包括融合蛋白）之方法。其中一個此種方法包含將任何本文所述之核酸引入細胞種群中（該核酸係以可操作之方式連結可有效生產該經編碼多肽之調控序列），在培養基中培養該等細胞以生產該多肽，在自該等細胞或自培養基中分離該多肽。使用足以協助該等細胞攝入（轉染）及/或表現該多肽之核酸量。該培養基可為任何本文及實例中所述者。其他培養基則係熟習技藝者所知。該核酸係以任何本文所述之傳遞方法引入此等細胞中，包括，如，注射、無針注射裝置、基因槍、電穿孔（如，DNA電穿孔裝置，Inovio Biomedical Corp.

（San Diego））、穿皮傳遞、被動攝入等。本發明之核酸可為載體之部分，該載體諸如重組表現載體，包括DNA質體載體、病毒載體或任何本文所述之載體。該包含本發明核酸之核酸或載體可如本文、上文、以及下文之實例所述進行製備及調配。此種核酸或表現載體可在活體中引入哺乳動物之細胞種群中，或者可將所選之哺乳動物細胞（如，種瘤細胞）自該哺乳動物移除，再在活體外將該核酸表現載體引入此等細胞種群中，其引入之量係足以造成該經編碼多肽之攝入及表現。或者，可在試管中使用培養之細胞製備包含本發明核酸之核酸或載體。在一態樣中，該製備本發明多肽之方法包含在一細胞種群中引入包含任何本文所述核酸之重組表現載體，其量及調配係將可造成該載體之攝入及該多肽之表現；任何本文所述之引入/傳遞形式，將該表現載體投與至哺乳動物體內；再自該哺乳動物或是自該哺乳動物之副產物而分離該多肽。適當之宿主細胞、表現載體、以包含編碼本發明多肽之核酸序列的表現載體轉染宿主細胞之方法、細胞培養、以及用以生產及自細胞培養中回收此種多肽之流程在下文標題為「本發明核酸」之章節詳細敘述。其他之生產方法則在後文之實例中討論。

如上所註記，本發明之多肽（其包括本發明之融合蛋白）可進行各種變化，諸如，一或多個胺基酸或核酸之插入、缺失及取代，其可為保守性或非保守性者，包括在，如，此等變化可能提供其用途中之某些利益，如，在其治療或預防用途，或是投藥或診斷應用。用以藉由使用胺基酸之取代、缺失、插入及添加而製備多肽變體之流程係技藝中之慣常流程。多肽及其具有所欲結合CD80及/或CD86或其片段（如，ECD）之能力或是如本文他處詳述之在活體外或活體內抑制免疫反應之能力的變體可由熟習技藝者所知之分析以及本文所述之分析輕易辨識。參見，如，提供於下文實例中之分析。

本發明之核酸，其在後文詳述，亦可進行各種變化，諸如，在一或多個密碼子中之一或多個核酸之一或多個取代，以使該特定密碼子編碼相同或不同之胺基酸，造成保守性或非保守性之取

代，或是該序列中一或多個核酸之缺失。該等核酸亦可經修飾以包括一或多個密碼子，其可提供在一表現系統中之最適表現（如，哺乳動物細胞或哺乳動物表現系統），同時，如需要，該一或多個密碼子仍編碼該（等）相同之胺基酸。用以藉由使用核酸之取代、缺失、插入及添加以及簡併密碼子而製備核酸變體之流程係技藝中之慣常流程，而該等核酸變體編碼具有本文所述所欲特性之多肽（如，結合CD80及/或CD86之能力，以及/或是在活體外或活體內抑制免疫反應之能力），其可輕易使用本文所述之分析而辨識。此等核酸變化可能可在其治療或預防用途或是投與或診斷應用提供某些利益。在一態樣中，該等核酸及多肽可經諸多方式修飾，只要其分別包含一核酸或多肽序列，與對應之本發明突變CTLA-4多肽編碼核酸或突變CTLA-4多肽實質上相同。

本發明之核酸

本發明提供分離或重組之核酸（亦在本文中稱為聚核苷酸），其集合稱為「本發明之核酸」（或「本發明之聚核苷酸」），其編碼本發明之多肽。本發明之核酸，包括所有下述者，可用於重組製備（如，表現）本發明之多肽，一般而言係經由表現包含編碼該多肽或其片段之序列的質體表現載體；作為治療劑；作為預防劑；作為診斷工具；作為互補或部分互補核酸存在之診斷探針（包括用以偵測野生型CTLA-4核酸）。舉例而言，本發明之核酸，包括所有下述者，係因其編碼可用於在活體外及/或活體內之應用中壓抑或抑制免疫反應（如，T細胞之活化、T細胞之增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）之誘發、發炎、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應）之多肽而具有用途，該等應用包括，如，用於治療其中需要抑制免疫反應之免疫系統疾病、病症及病況的預防或治療方法（如，用於治療自體免疫疾病及病症之方法，以及抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞或器官移植排斥之方法）。本發明之核酸亦可納入可用於基因療法、DNA疫苗接種及免疫抑制

療法之表現載體中。本發明核酸及包含此等核酸之載體的其他用途述於本文他處。

在一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼任何上文述於標題為「本發明之多肽」之章節以及本文他處之本發明多肽（包括任何融合蛋白等）。本發明亦提供分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼任何上文及本文他處所述本發明多肽（包括任何融合蛋白等）之二或多者之組合。其亦包括一種核酸，其編碼任何本發明之多肽，諸如，如，突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其包含一密碼子序列，其實質上經最適化以在哺乳動物宿主（諸如，人類）體內進行表現。

舉例而言，在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之序列相同性，或是其互補聚核苷酸序列，其中該多肽可結合CD80及/或CD86，或是CD80及/或CD86之多肽片段（如，CD80及/或CD86之胞外域），以及/或是可在活體外或活體內抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。其他有關此等多肽功能特性及特徵之細節述於上文之「本發明之多肽」中。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約等於hCTLA-4 ECD之胺基酸長度的胺基酸長度；諸如，如，110-138、112-132、118-130,119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基。編碼突變CTLA-4 ECD多肽之例示性核酸包含示於SEQ ID NOS:1-73之序列，但不限於，如，分別具有示於SEQ ID NOS:80-152之核苷酸序列的核酸。舉例而言，編碼示於SEQ ID NO:1之多肽（純系D3-1）的例示性核酸係示於SEQ ID:80之核酸。亦包括任何此等核酸之片段，其中此種片段編碼可結合CD80及/或CD86及或其任一或兩者之ECD，以及/或是具有壓抑免疫反應之能力的多肽。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含核苷

酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽），其包含多肽序列，其（a） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基（如，不超過1、2、3、4、5或6個胺基酸殘基）之差異，且（b） 其中該多肽序列中於位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的該多肽序列之對應位置處的胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86及/或其任一或兩者之胞外域，以及/或是可在活體外或活體內抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。亦即，在此等所選多肽序列該位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係未經刪除或取代。部分此等核酸編碼多肽，其包含一序列，與該所選多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且在選自胺基酸位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106中之2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13及/或14個位置，包括與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同之胺基酸殘基。此等多肽可與該所選多肽序列具有胺基酸缺失、添加及/或胺基酸取代之差異。胺基酸取代可為保守性或非保守性之取代。例示性之保守性取代述於標題為「序列變異」之章節中。部分此等多肽包含一序列，其具有約118-130、119-129、120-128、121- 127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。例示性之核酸包括，但不限於，如，該等包含示於SEQ ID NOS:80-152之核苷酸序列者。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且（b） 在對應於SEQ ID NO:159多肽序列之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置包含至少一個胺基酸取代，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可在活體外及/或活體內抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等核酸編碼

多肽，其在相對示於SEQ ID NO:159之序列的選自由位置50、54、55、56、64、65、70或85所組成之群的位置包含2、3、4、5或6個胺基酸取代。部分此等核酸編碼多肽，其尚在對應相對SEQ ID NO:159之位置104及/或30的位置包含胺基酸取代。部分此等核酸編碼多肽，其包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置70（如，S70F）、位置64（如，S64P）、位置50（如，A50M）、位置54（如，M54K/V）、位置65（如，I65S）、位置56（如，N56D）、位置55（如，G55E）、位置85（如，M85A）及/或位置24（如，A24E）。任何此種多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104（視情況係L104E/D，如，L104E）、位置30（如，T30N/D/A）及/或位置32（如，V32I）。部分此等核酸編碼多肽，其包含一或多個取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此等經編碼之多肽包含一序列，其具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之胺基酸長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

本發明亦提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其包含（i）與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的任何多肽序列之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性，以及（ii）位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等核酸編碼多肽，其包含相對該所選序列之下列一或多者：位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基、位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基、位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基、位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基、位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基、位在對應位

置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基、位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基、位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基、以及位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代係S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號，其中該多肽可結合hCD80及/或hCD86 （及/或其任一或兩者之ECD），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等核酸編碼多肽，其可進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且其中該多肽可結合CD80

及/或CD86 及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。部分此等經編碼之多肽包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。部分此等核酸編碼多肽，其包含多肽序列，具有約118-130、119-129、120-128、121-127、122-126、123-125或124個胺基酸殘基之長度。關於此等多肽功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，或是其互補聚核苷酸序列，其中該核酸編碼多肽，其可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。包含以SEQ ID NOS:80-158所辨識之聚核苷酸序列的例示性核酸分別編碼包含以SEQ ID NOS:1-79所辨識之多肽序列的例示性多肽。包含以SEQ ID NOS:201-204所辨識之聚核苷酸序列的例示性核酸分別編碼包含以SEQ ID NOS:197-200所辨識之多肽序列的例示性多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含：（a）聚核苷酸序列，與一RNA聚核苷酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該RNA聚核苷酸序列包含一DNA序列，選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群，其中該DNA序列中所有之胸腺嘧啶核苷酸殘基經尿嘧啶核苷酸殘基置換；（b）（a）之互補聚核苷酸序列；或是（c）（a）或（b）之任何聚核苷酸序列之片段，其中該核酸編碼多肽，其（i）可結合CD80及/或CD86及/或其任一或兩者之ECD，以及/或是（ii）具有在活體外或活體內抑制免疫反應之能力（如，T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、活化標記（如，CD25、IL-2受體）之誘發、發炎、

抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應），或是其互補聚核苷酸序列。

本發明包括一種分離或重組之核酸，其編碼任何上述本發明多肽之任何多聚體（如，二聚體、四聚體等）。如他處所詳細討論者，包含兩個本發明多肽（包括兩個融合蛋白）之二聚體一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生一或多個共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在多肽中之半胱胺酸殘基與第二多肽中之半胱胺酸殘基間產生。其他多聚體可以類似方式形成。舉例而言，在一非限制性之態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個多肽之重組多肽二聚體，其中各個此種多肽包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。其亦包括一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個多肽之多肽二聚體，其中各個此種多肽與hCTLA-4 ECD之多肽序列（SEQ ID NO:159）具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置；且該多肽視情況尚包含取代L104E，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。關於此等二聚體功能特性之其他細節於上文討論。

本發明亦提供一種分離或重組之核酸，其編碼任何本發明之融合蛋白，包括任何本發明之多聚體融合蛋白（如，二聚體、四聚體等）。在一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其包含（a） 多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，以及（b） Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是

CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。包含兩個此等單體融合蛋白之二聚體融合蛋白一般而言係在細胞加工過程中，藉著產生共價雙硫鍵而形成，該等雙硫鍵係在一單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基與第二單體融合蛋白中之半胱胺酸殘基間產生。其他多聚體可以類似方式形成。關於此等融合蛋白功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），各個單體融合蛋白包含：（a） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%之相同性，以及（b） Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制或壓抑免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。該兩個單體融合蛋白在表現時係經由至少一個雙硫鍵而連結在一起，該等雙硫鍵係在存在於各個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分情形下，（a）之多肽的C-端係與（b）之Ig Fc多肽的N-端共價連結或融合。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。

其一般而言會在各個核酸序列之C-端包括中止密碼子（如，tga），當該序列係包括在表現載體中以表現目標蛋白時。舉例而言，各個編碼突變CTLA-4多肽或突變CTLA-4融合蛋白之本發明核苷酸序列可視情形進一步在其C-端包括中止密碼子，諸如，

TAA。可以不同之中止密碼子取代TAA，諸如，TGA中止密碼子。編碼野生型融合蛋白（如，hCTLA-4-Ig、hCD86-Ig等）之核酸序列亦可在其C-端包括中止密碼子。各個該等核苷酸序列可視情形進一步在其N-端包括編碼信號肽之核苷酸序列，以協助突變CTLA-4多肽或融合蛋白之分泌。

例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之多肽序列者。編碼SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之突變CTLA-4-Ig融合蛋白之例示性核酸分別示於SEQ ID NO:153-158、201-204及223-224。SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及221之融合蛋白序列分別與SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之蛋白序列相同，除外SEQ ID NOS:205-210之蛋白序列並不包括該C-端離胺酸（K）殘基；如上文所解釋，咸信該預測C-端離胺酸殘基（其係由緊鄰位於各個此種聚核苷酸序列之TAA中止密碼子之前之AAA密碼子編碼）會在加工或分泌之過程中由該所得之融合蛋白上切除。SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之核酸序列分別編碼SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之融合蛋白序列，其各在切割/喪失該C-端K殘基後，分別產生示於SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及 221之融合蛋白序列。

聚核苷酸序列SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224各亦在其N-端包括編碼示於SEQ ID NO:181或215之信號肽的核苷酸序列，該信號肽最終會自該成熟融合蛋白切除。聚核苷酸序列SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之各者之核苷酸殘基1-111 （如自各個此種聚核苷酸序列之N-端起始計算者）（核苷酸殘基1-111示於SEQ ID NO:215）編碼示於SEQ ID NO:216之37個胺基酸殘基的WT hCTLA-4信號肽，該信號肽最終會在該成熟突變CTLA-4融合蛋白單體或二聚體表現時受到切除；因此。就各個SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之核酸序列而言，編碼該成熟IgG2融合蛋白之第一胺基酸殘基（甲硫胺酸）的第一密碼子係由該核苷酸序列之核苷酸殘基112-114構成。如上所註記，在部分情形下，

該信號肽序列可僅包含如示於SEQ ID NO:182之胺基酸殘基1-35，而編碼此35-胺基酸殘基信號肽之核苷酸序列則示於SEQ ID NO:181。然而，分別位在位置36及37之經編碼離胺酸（K）及丙胺酸（A）（由該兩個密碼子AAA-GCC編碼）並不存在於所得之成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白中，並咸信係在加工過程中自該成熟之突變CTLA-4-Ig融合蛋白上切除。該成熟之突變CTLA-4蛋白序列一般而言係以存在於該經編碼突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺基酸殘基位置38的甲硫胺酸殘基起始。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個相同單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。其亦提供一種分離或重組之核酸，其編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222之多肽序列者；編碼以突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體形式表現之此等突變CTLA-4-Ig融合蛋白之例示性核酸包括該等包含分別示於SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之聚核苷酸序列者。其他例示性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含SEQ ID NOS:205-210、211-214、219及222之多肽序列，其係以融合蛋白二聚體形式表現；此等融合蛋白缺乏C-端離胺酸殘基，因其一般而言會在加工過程中或是分泌之前受到切除。編碼此等融合蛋白序列與該C-端離胺酸（該離胺酸於後切除）之例示性核酸分別包括SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224之聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其中該融合蛋白包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明包括一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，與選自由SEQ ID NOS:153-158、201-204及223-224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中此種核酸編碼突變CTLA-4-Ig蛋白二聚體，其可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含:（1）多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且其中在該多肽序列中於胺基酸位置41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列（如，選自SEQ ID NOS:1-73之多肽）對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2）Ig Fc多肽（如，hIgG2 Fc），其中該二聚體可結合CD80及/或CD86（或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其包含核苷酸序列，編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含

聚核苷酸序列，編碼包含兩個單體融合蛋白（如，兩個單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（a）與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，且（b） 在對應於相對SEQ ID NO:159多肽序列之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置包含至少一個胺基酸取代；以及（2） Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。部分此種（a）之多肽包含至少一個取代，該取代係位在相對SEQ ID NO:159之選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群的胺基酸位置。部分此種（a）之多肽可進一步包含相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，該取代係位在位置104 （如，L104E/D）、位置30 （如，T30N/D/A）及/或位置32 （如，V32I）。其亦提供一種重組或分離之核酸，其編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（i） 與選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，以及（ii） 在對應於該選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置包括苯丙胺酸殘基，以及（2） Ig多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86 （或是

CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應之能力，或是其互補聚核苷酸序列。該經編碼之Ig多肽可包含Ig Fc多肽，其包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。部分此等經編碼之二聚體相對該（1）（i）之所選多肽序列包含下列一或多者：位在對應位置24之位置的Glu殘基、位在對應位置30之位置的Asn殘基、位在對應位置32之位置的Ile殘基、位在對應位置50之位置的Met殘基、位在對應位置54之位置的Lys殘基、位在對應位置55之位置的Glu殘基、位在對應位置56之位置的Asp殘基、位在對應位置64之位置的Pro殘基、位在對應位置65之位置的Ser殘基、以及位在對應位置104之位置的Glu殘基。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86（以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4 ECD多肽的多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號；以及（2） IgG Fc多肽，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86（或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。該Ig Fc多肽可包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。該經編碼之（1）之多肽可進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。

關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其包含核苷酸序列，編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其編碼包含兩個單體融合蛋白（如，單體突變CTLA-4-Ig）之融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-Ig二聚體），其中各個此種單體融合蛋白包含：（1） 多肽（如，突變CTLA-4 ECD），其包含多肽序列，其（a） 與SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b） 包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號；以及（2） Ig多肽，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86 （或是hCD80-Ig及/或hCD86-Ig），以及/或是可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。該Ig多肽可包含Ig Fc多肽，包括，如，Ig Fc多肽，其包含一序列，與選自由SEQ ID NOS:184-186及218所組成之群的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性。在部分此等二聚體或單體中，該（1）之多肽包含在對應於SEQ ID NO:31位置104之位置的麩胺酸殘基、位在對應位置30之位置的天冬醯胺殘基及/或位在對應位置32之位置的異白胺酸殘基。關於此等二聚體功能特性及特徵之其他細節於上文討論。其亦提供一種重組或分離之核酸，其包含核苷酸序列，編碼此種單體融合蛋白，該融合蛋白可結合CD80及/或CD86 （以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig），以及/或是具有抑制免疫反應的能力。

本發明亦包括任何此等上述本發明核酸之片段，其中該等片段編碼多肽，其可結合hCD80及/或hCD86及/或其任一或兩者之

ECD，以及/或是具有壓抑或抑制免疫反應之能力。諸多此等核酸之片段將會表現多肽，其可結合hCD80及/或hCD86或是其ECD，或是可壓抑免疫反應，該等特性可以合理之實驗輕易辨識。核苷酸片段一般而言包含至少250、300、400、500、600、700、800、900、950、1000個或以上之核苷酸鹼基。

本發明包括一種分離或重組之核酸，其編碼一蛋白，包含一信號肽以及一本發明之多肽（其包括本發明之二聚體或單體融合蛋白），諸如本發明之突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其可結合CD80及/或CD86，以及/或是，可在活體外或活體內之分析及/或本文他處所詳述之方法中抑制免疫反應。該經編碼之信號肽序列（其可指引成熟多肽通過原核或真核細胞膜而分泌）一般而言係共價連結該多肽之胺端。可使用各種信號肽，其包括，如，示於SEQ ID NO:182之信號肽序列，其係由，如，示於SEQ ID NO:181之核苷酸序列編碼，或是示於SEQ ID NO:216之信號肽序列，其係由，如，示於SEQ ID NO:215之核苷酸序列編碼。本發明亦包括一種分離或重組之核酸，其編碼一蛋白，包含一信號肽、本發明之突變CTLA-4 ECD多肽、穿膜域及/或胞質域，如上文所詳細討論。

可使用全長人類CTLA-4蛋白之信號肽序列以指引本發明重組突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表現或分泌。在一態樣中，該hCTLA-4蛋白之信號肽包含該hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基1-37；此種信號肽序列示於SEQ ID NO:216。在此情形下，該成熟hCTLA-4蛋白序列一般而言係以位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。因此，可使包含示於SEQ ID NO:216之多肽序列的信號肽與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺（N）端融合或連結，諸如，藉由共價連結，以分別協助該突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表現或分泌。包含編碼SEQ ID NO:216之hCTLA-4信號肽序列之核苷酸序列的例示性核酸示於

SEQ ID NO:215。

當SEQ ID NO:216之信號肽序列係與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端融合或連結時，在該多肽或融合蛋白表現或分泌時，該信號肽會受到切割；該所得之成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言係以位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。

本發明包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:216）以及突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4 ECD多肽之N-端共價連結。其亦包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:216）以及突變CTLA-4-Ig（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4-Ig之N-端共價連結。其亦提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列（如，SEQ ID NO:215），編碼一信號肽（如，SEQ ID NO:216），以及核苷酸序列，編碼突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列）或突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列）。

在另一態樣中，該hCTLA-4蛋白之信號肽包含該hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基1-35；此種信號肽包含示於SEQ ID NO:182之肽序列。然而，在此情形下，該hCTLA-4蛋白分別位於位置36及37之兩胺基酸殘基離胺酸（K）及丙胺酸（A）一般而言並不存在於該成熟之分泌hCTLA蛋白中，如以蛋白定序測定者。因此，該所得之成熟hCTLA-4蛋白係以類似方式而位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟hCTLA-4蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸而起始編號。由於該全長hCTLA-4蛋白分別位於位置36及37之胺基酸殘基離胺酸（K）及丙胺酸（A）並不存在於該所得之成熟hCTLA蛋白中，咸信其已在加工過程中自該

成熟hCTLA蛋白上切除。包含編碼hCTLA-4信號肽序列（SEQ ID NO:182）之核苷酸序列的例示性核酸示於SEQ ID NO:181。

可使包含示於SEQ ID NO:182之肽序列的信號肽與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端融合或連結，諸如，藉由共價連結，以分別協助該突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表現或分泌。當SEQ ID NO:182之信號肽序列係與本發明突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白之N-端融合或連結時，在該多肽或融合蛋白表現或分泌時，該信號肽會受到切割；該所得之成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白因此一般而言係以位在位置38的甲硫胺酸殘基起始，且該成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白之胺基酸殘基因此係將此甲硫胺酸殘基指定為第一胺基酸（亦即，佔據位置1）而起始編號。由於該全長hCTLA-4蛋白分別位於位置36及37之胺基酸殘基離胺酸（K）及丙胺酸（A）並不存在於該所得之成熟突變CTLA-4 ECD多肽或成熟突變CTLA-4-Ig融合蛋白中，咸信其已在加工過程中自該突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig融合蛋白上切除。

本發明包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:182）以及突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4 ECD多肽之N-端共價連結。其亦包括一種分離或重組之多肽，其包含一信號肽（如，SEQ ID NO:182）以及突變CTLA-4-Ig（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列），其中該信號肽係與該突變CTLA-4-Ig之N-端共價連結。其亦提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列（如，SEQ ID NO:181），編碼一信號肽（如，SEQ ID NO:182），以及核苷酸序列，編碼突變CTLA-4 ECD多肽（如，選自SEQ ID NOS:1-73之群的序列）或突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，選自SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222之群的序列）。

本發明之核酸可進一步包含一或多種適當之其他核苷酸序

列。舉例而言，由於本發明之多肽（其包括本發明之融合蛋白）可包含一或多種其他多肽序列，諸如，多肽純化亞序列（諸如，如，選自抗原表位標記、FLAG標記、聚組胺酸序列、GST融合物之亞序列）、信號肽等，本發明包括編碼全部此等包含該等其他序列之多肽的核酸。例示性之信號肽如上文所討論，其在表現時一般而言係共價連結本發明多肽之N-端。舉例而言，編碼SEQ ID NOS:1-79、197-200、205-214及219-222中任一者之多肽序列的核酸可進一步包含編碼信號肽（諸如，SEQ ID NO:182之信號肽序列）之核酸，諸如，示於SEQ ID NO:181之核苷酸序列，或是示於SEQ ID NO:216之信號肽序列，其係由，如，示於SEQ ID NO:215之核苷酸序列編碼。此等核苷酸序列可直接以適當之讀框而彼此融合，以使該所得之核酸包含編碼本發明信號肽之核苷酸序列以及編碼本發明多肽之核苷酸序列。

本發明之核酸可以任何適當之技術分離，其中數者係技藝中所已知。本發明之分離核酸（如，在宿主細胞中製備並接著以任何事當之核酸純化技術進行實質上純化之核酸）可再次引入宿主細胞中或是再次引入細胞或其他生物環境或組合物中，其中其不再是主要之核酸種類，且不再與其他核酸分離。

幾乎任何分離或重組之本發明核酸皆可使用標準之技術而插入或融合適當之較大核酸分子，其包括，如，但不限於，染色體、質體、表現載體或基因盒、病毒基因組、基因序列、線性表現元件、細菌基因組、植物基因組或人工染色體，諸如，哺乳動物人工染色體（MAC），或是其酵母菌或細菌對應物（亦即，YAC或BAC），以形成重組核酸。在另一實例中，分離之本發明核酸可融合較小之核苷酸序列，諸如，啟動子序列、免疫刺激序列及/或編碼其他胺基酸之序列，諸如，其他抗原表位及或連接子序列，以形成重組核酸。

在部分情形下，重組或合成之核酸可以應用於宿主細胞內容之外的化學合成技術而產生（如，經由聚合酶連鎖反應（PCR）或化學合成技術而製備之核酸，其實例於本文進一步敘述）。

編碼本發明多肽（包括融合蛋白）之核酸可具有任何事當之化學組成，該組成可容許本發明多肽之表現或是其他所欲之生物活性（如，與其他核酸之雜交）。本發明之聚核苷酸可為RNA之形式或是DNA之形式，並包括mRNA、cRNA、重組或合成之RNA及DNA、以及cDNA。本發明之核酸一般而言係DNA分子，且通常係雙股DNA分子。然而，其亦提供包含任何本發明核苷酸序列之單股DNA、單股RNA、雙股RNA及雜交DNA/RNA核酸或是其組合。本發明之核酸可包括任何適當之核苷酸鹼基、鹼基類似物及/或骨架（如，由非磷酸二酯之硫代磷酸酯連結所形成或包含其之骨架，如，包含硫代磷酸酯或硫代磷酸酯骨架之DNA）。本發明之核酸如為單股時可為該編碼股或該非編碼（亦即，反義或互補）股。除編碼本發明多肽之核苷酸序列外(如，包含突變CTLA-4 ECD多肽或突變CTLA-4-Ig之編碼序列的核苷酸序列)，本發明之聚核苷酸序列尚可包含一或多種其他之編碼核苷酸序列，以使其編碼，如，融合蛋白、靶向序列（非信號序列）或其類似者（其更特定之實例於本文進一步討論)，以及/或是可包含非編碼核苷酸序列，諸如，內含子、終止子序列或是5'及/或3'未轉譯區域（該等區域可有效使該編碼序列在適當宿主中進行表現)，以及/或是控制元件，諸如，啟動子（如，天然或重組或換移（shuffled）之啟動子）。

咸特別可耐受位在編碼此種多肽之mRNA密碼子序列第三位置之核酸修飾。在特定態樣中，該核酸之至少一部分包含硫代磷酸酯骨架，並納入至少一個合成核苷酸類似物，取代該核酸序列中之天然核苷酸或添加在其之外。該核酸亦可或是或可包含非鳥嘌呤、腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶及胞嘧啶之鹼基添加。此等修飾可與較長之半生期有關，並因此可為本發明之核酸載體所欲者。因此，在一態樣中，本發明提供重組核酸及核酸載體（如下文進一步討論)，該等核酸或載體包含至少一個前述之修飾，或是其任何適當組合，其中相較於無此種修飾或此等修飾之實質上相同核酸，該核酸可在哺乳動物宿主體內維持較長時間。可納入本發明核苷酸序列中之經修飾及/或非胞嘧啶、非腺嘌呤、非鳥嘌呤、

非胸腺嘧啶核苷酸之實例提供於，如，the Manual of Patent Examining Procedure § 2422 （7th Revision – 2000）。

咸須明瞭，編碼至少一種本發明多肽（其包括本發明之融合蛋白）之核酸，包括該等述於上文及本文他處者，並不限於直接編碼本發明多肽之表現或生成之序列。舉例而言，該核酸可包含核苷酸序列，其可經由似蛋白內含子之表現而造成本發明之多肽（如述於，如，Colson and Davis （1994） Mol. Microbiol. 12（3）:959-63，Duan et al.（1997） Cell 89(4):555-64，Perler（1998） Cell 92(1):1-4，Evans et al.（1999） Biopolymers 51(5):333-42，及de Grey, Trends Biotechnol. 18（9）:394-99 （2000）），或是包含核苷酸序列，其包含自體剪接性內含子(或是其他自體剪接性RNA轉錄物)，可形成中間重組多肽編碼序列（如述於，如，美國專利第6,010,884號）。該核酸亦可或是或可包含可在RNA層級產生編碼該多肽之mRNA轉錄物，及/或可在DNA層級在轉錄之前藉由反式剪接機制（有關此等機制之原則述於，如，Chabot, Trends Genet.（1996） 12（11）:472-78，Cooper （1997） Am. J. Hum. Genet. 61（2）:259-66，及Hertel et al. （1997） Curr. Opin. Cell. Biol. 9（3）:350-57），以造成其他剪接修飾的序列。由於遺傳密碼之固有簡併性，數種核酸可編碼任一特定之本發明多肽。因此，舉例而言，任何述於本文之特定核酸可藉著以根據基因密碼簡併性之相當密碼子（就該密碼子所代表之胺基酸而言）取代一或多個密碼子而進行修飾。亦可使用編碼與本發明之多肽序列具有相同或功能相當序列之多肽的核苷酸序列以合成、選殖或表現此種多肽。

一般而言，使用有關上述編碼本發明多肽之核酸（如，編碼突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig之核酸）之本文所例示技術，任何本發明之核酸皆可經修飾以增加其在特定宿主中之表現。任何本文所述之本發明核酸可經密碼子最適化以在特定宿主（一般而言係人類）中進行表現。各種用以進行密碼子最適化之技術係為技藝中所已知。最常用於特定宿主中之密碼子稱為最適密碼子，且該等不常使用者係歸類為罕見或低使用率密碼子（參見，

如，Zhang, S. P. et al. （1991） Gene 105:61-72）。密碼子可經取代以反應該宿主之偏好密碼子使用，此係稱為「密碼子最適化」或「控制生物種密碼子偏好」之流程。包含特定原核或真核宿主之偏好密碼子的最適化密碼子序列可用於增加轉譯率，或是生成具有所欲特性之重組RNA轉錄物，諸如，較長之半生期，相較於自非最適化序列所生成之轉錄物。用於產生密碼子最適化序列之技術係為已知（參見，如，Murray, E. et al. （1989） Nuc. Acids Res. 17:477-508）。亦可對轉譯中止密碼子進行修飾以反應宿主偏好。舉例而言，釀酒酵母（*S. cerevisiae*）及哺乳動物之偏好中止密碼子分別係UAA及UGA。單子葉植物之偏好中止密碼子係UGA，而昆蟲及大腸桿菌偏好使用UAA作為中止密碼子（參見，如，Dalphin, M.E. et al. （1996） Nuc. Acids Res. 24:216-218）。在其他密碼子內容中之密碼子安排亦可影響核酸序列之生物特性，而本發明亦預期為提供特定宿主所常用之密碼子內容安排的核酸修飾。因此，本發明之核酸可包含一密碼子最適化核苷酸序列，亦即，針對特定生物種而進行密碼子頻率最適化及/或進行密碼子對（亦即，密碼子內容）最適化者（如，該多肽可自一針對人類中之表現而進行最適化之聚核苷酸序列表現，該最適化係藉著置換根據密碼子頻率之「稀有」人類密碼子，或是置換密碼子內容，諸如，藉著使用諸如該等述於Buckingham et al. （1994） Biochimie 76（5）:351-54及美國專利第5,082,767、5,786,464及6,114,148號之技術）。

本發明之核酸可藉由切截一或多個該序列C-端部分之殘基而修飾。此外，可將各種不同之中止或終止密碼子包括在該核苷酸序列之末端，如下文進一步討論。

可將一或多種本發明之核酸包括於載體、細胞或宿主環境中，其中該本發明之編碼核苷酸序列係為異源基因。

本發明之聚核苷酸包括編碼任何可結合CD80及/或CD86以及/或是可抑制免疫反應之本發明多肽（或其多肽片段）之聚核苷酸序列，可在至少嚴格條件下與一或多種此種本文所述聚核苷酸序

列雜交之聚核苷酸，與任何此等聚核苷酸序列互補之聚核苷酸序列，以及所有上述者之變體、類似物或同源衍生物。編碼序列係指編碼特定多肽或蛋白域、該多肽之亞序列、區域或片段的核苷酸序列。編碼序列可編碼突變CTLA-4多肽或其具有功能特性（諸如，結合CD80及/或CD86之能力以及/或是抑制或壓抑免疫反應之能力）之片段。本發明之核酸可包含本發明突變CTLA-4多肽分別之編碼序列，以及其變體、類似物或同源衍生物。

本發明之核酸亦可見於與典型核酸組合調配物之組合中，其包括，在該等熟習技藝者所知之載體、緩衝劑、佐劑、賦形劑、稀釋劑及其類似者之存在下。

除非另有明示，本文所述之特定核酸亦隱含包括其經保守修飾之變體（如，簡併密碼子取代物）及互補序列，以及該序列所明示者。特定言之，簡併密碼子取代物可藉著產生其中一或多個所選（或全部）密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列而達成（Batzer et al.（1991）Nucl. Acid Res. 19:5081；Ohtsuka et al.（1985） J. Biol. Chem. 260:2605-2608；Cassol et al.（1992）；Rossolini et al.（1994） Mol. Cell. Probes 8:91-98）。

核酸之雜交

如上所註記，本發明包括可與本發明目標核酸雜交之核酸，諸如，如，選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸，或是其互補聚核苷酸序列，其中雜交係涵蓋該目標核酸實質上之全長。該雜交性核酸可在至少嚴格條件下或在至少高嚴格條件下雜交本發明之核苷酸序列，諸如，如，SEQ ID NO:80者。核酸雜交實驗之中度嚴格、嚴格及高度嚴格雜交條件係為已知。可予截何以達成此種嚴格性程度之因子實例簡短於本文中討論。

當核酸連結時，一般而言係在溶液中，其即為「雜交」。核酸可因各種已經詳細定性之物化力而雜交，諸如，氫鍵連結、溶劑排斥、鹼基堆積及其類似者。關於核酸雜交之詳細指引可見於P.

Tijssen （1993） Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes [生物化學及分子生物學實驗室技術--與核酸探針之雜交], vol. 24, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays [雜交原則及核酸探針分析策略之總論]," （Elsevier, NY）（後文稱為"Tijssen"），以及Ausubel, 上述文獻，Hames and Higgins （1995） Gene Probes 1, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England （Hames and Higgins 1）及Hames and Higgins （1995） Gene Probes 2, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England （Hames and Higgins 2），提供對於DNA及RNA （包括寡核苷酸）之合成、標記、偵測及定量之細節。

兩核酸序列實質上相同之指標之一係該兩分子可在至少嚴格條件下彼此雜交。辭句「專一雜交」係指一分子在嚴格條件下僅可與一特定核苷酸序列結合、雙鏈化或雜交，當該分序列存在於複合混合物（如，總體細胞） DNA或RNA中時。「實質上結合」係指一探針核酸與目標核酸之互補雜交，並包含少量之錯配，其可藉由降低該雜交基質之嚴格性而適應，以達成目標聚核苷酸序列之所欲偵測。

在核酸雜交實驗（諸如，南方及北方雜交）內容中之「嚴格雜交清洗條件」及「嚴格雜交條件」係具序列相關性，並在不同之環境參數下各為不同。關於核酸雜交之詳細指引可見於Tijssen（1993), 上述文獻，以及Hames and Higgins 1及Hames and Higgins 2, 上述文獻。

一般而言，其係選擇高嚴格條件，以使雜交係在約5° C或是低於該特定序列在指定離子力及pH下之熱熔點（T_m）下發生。T_m係50%之該試驗序列與一完全配對探針雜交之溫度(在指定離子力及pH下)。換言之，T_m係指該核酸雙鏈在特定條件下進行50%變性之溫度，且其代表該核酸雜交物安定性之一種直接度量。因此，T_m對應於由螺旋轉化為隨機捲曲之中點溫度；其取決於長度、核苷酸組成、以及較長核苷酸段落之離子力。一般而言，在「嚴格條

件」下，探針將會與其目標序列雜交，但不會與任何其他序列雜交。「極度嚴格條件」係選擇為等於特定探針之T_m。

DNA-DNA雙鏈之T_m可使用方程式（1）估計：T_m（°C）= 81.5°C + 16.6（$\log_{10}$M）+ 0.41（%G + C）– 0.72（%f）– 500/n，其中M係該單價陽離子（通常係Na+）之莫耳濃度，（%G + C）係鳥苷酸（G）與胞苷酸（C）之百分比，（%f）係形式化之百分比，且n係該雜交物核苷酸鹼基之數目（亦即，長度）。參見，Rapley, R. and Walker, J.M. eds., Molecular Biomethods Handbook（1998），Humana Press, Inc.（後文稱為Rapley and Walker），Tijssen（1993），上述文獻。RNA-DNA雙鏈之T_m可使用方程式（2）估計：T_m（°C）= 79.8°C + 18.5（$\log_{10}$M）+ 0.58（%G + C）– 11.8（%G + C）2 – 0.56（%f）– 820/n，其中M係該單價陽離子（通常係Na+）之莫耳濃度，（%G + C）係鳥苷酸（G）與胞苷酸（C）之百分比，（%f）係形式化之百分比，且n係該雜交物核苷酸鹼基之數目（亦即，長度）。同上述文獻。上述之方程式1及2一般而言僅對長度大於約100-200核苷酸之雜交雙鏈為準確。同上述文獻。長度短於50核苷酸之核酸序列的T_m可如下計算：T_m（°C）= 4（G + C）+ 2（A + T），其中A（腺嘌呤）、C、T（胸腺嘧啶）及G係對應核苷酸之數目。

一般而言，在進行雜交分析時，未雜交之核酸材料會藉由一系列之清洗而除去，其嚴格度可根據所欲之結果而調整。低嚴格度之清洗條件（如，使用較高之鹽度及較低之溫度）可增加敏感性，但可產生非專一信之雜交信號及高背景信號。較高嚴格度之條件，（如，使用較低之鹽度及較接近雜交溫度之較高溫度）可降低背景信號，一般而言使其僅保留該專一信號。有關此等雜交技術之其他有用指引提供於，如，Rapley and Walker, 上述文獻（特定言之，有關此等雜交實驗，part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays [雜交原則及核酸探針分析策略之總論]"），Elsevier, New York，以及Ausubel, 上述文獻，Sambrook, 上述文獻，Watson, 上

述文獻，Hames and Higgins （1995） Gene Probes 1, IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, England，及Hames and Higgins （1995） Gene Probes 2, IRL Press, Oxford Univ. Press, Oxford, England。

用以分析包含至少100核苷酸之至少兩個核酸之例示性嚴格（或普通嚴格）條件包括，在包含50%福馬林（或甲醯胺）及1毫克(mg)肝素之溶液中或是在南方或北方點漬中之濾膜上，於42°C下進行共置，其中該雜交隔夜進行。普通嚴格度清洗可使用，如，包含0.2x SSC之溶液在約65°C下處理約15分鐘而執行(關於SSC緩衝液參見Sambrook, 上述文獻)。通常在普通嚴格度清洗之前會先進行低嚴格度清洗，以除去背景探針信號。低嚴格度清洗可使用，如，包含2x SSC之溶液在約40°C下處理約15分鐘而執行。高嚴格度清洗可使用，如，包含0.15 M NaCl之溶液在約72°C下處理約15分鐘而執行。用於，如，超過100核苷酸之雙鏈之例示性中（普通）嚴格度清洗(嚴格度低於上述之普通嚴格度清洗)可在包含1x SSC之溶液中在約45°C下處理約15分鐘而執行。用於，如，超過100核苷酸之雙鏈之低嚴格度清洗實例係在包含4-6x SSC之溶液中在40°C下處理約15分鐘而執行。對短探針而言（如，約10-50核苷酸)，嚴格條件一般而言涉及小於約1.0 M Na^+離子之鹽濃度，一般而言係約0.01至1.0 M Na^+離子濃度（或其他鹽類)，pH 7.0至8.3，且該溫度一般而言係小於約30°C。嚴格條件亦可藉由添加諸如甲醯胺之去安定劑而達成。

例示性之中度嚴格條件包括在包含20%福馬林（或甲醯胺)、0.5x SSC、50 mM磷酸鈉（pH 7.6)、5x丹哈德溶液（Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖及20 mg/ml變性剪切鮭魚精子DNA之溶液中，於37°C下隔夜共置，接著再在1x SSC中於約37-50°C下清洗該濾膜，或是其實質上類似之條件，如，述於Sambrook, 上述文獻，及/或Ausubel, 上述文獻之中度嚴格條件。

高嚴格度條件係使用，例如，(1） 低離子力及高溫度進行清洗，諸如，0.015 M氯化鈉/0.015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉（SDS)，於50°C下，(2） 在雜交過程中使用變性劑，諸如，甲

醯胺，例如，50%（v/v）甲醯胺與0.1%牛血清白蛋白（BSA）/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯啶酮（PVP）/50 mM磷酸鈉緩衝液（pH 6.5），及750 mM氯化鈉，75 mM檸檬酸鈉，於42°C下，或是（3）使用50%甲醯胺，5x SSC （0.75 M NaCl，0.075 M檸檬酸鈉），50 mM磷酸鈉（pH 6.8），0.1%焦磷酸鈉，5x丹哈德溶液，經超音波破碎之鮭魚精子DNA（50 μg/ml），0.1% SDS，及10%硫酸葡聚糖，於42°C下，並在（i） 42°C下於0.2x SSC中，（ii） 在55°C下於50%甲醯胺中，及（iii） 在55°C下於0.1x SSC中（較佳結合EDTA）進行清洗之條件。

一般而言，為非相關探針於特定雜交分析中所觀察到者之2x或2.5x-5x （或較高）之信號對雜訊比指出偵測到專一性雜交。在本發明之內容中，兩序列間至少嚴格雜交之偵測指出與，如，本發明核酸之相對較強結構相似性或同源性。

如所註記，「高嚴格」條件係經選擇為約5° C或是低於該特定序列在指定離子力及pH下之熱熔點（T_m）。與關注核苷酸序列（如，探針）密切相近或相同之目標序列可在高嚴格條件下獲得辨識。較低嚴格度之條件則適用於互補性較低之序列。參見，如，Rapley and Walker；Sambrook，皆為上述文獻。

可使用競爭雜交作用以辨識本發明之核酸，且此競爭雜交法係區別本發明核酸之較佳方法。在本發明之內容中，兩核苷酸序列間高嚴格雜交之偵測可指出與，如，本文序列表中所提供核酸之強結構相似性/同源性。兩核苷酸序列間之高嚴格雜交作用可說明大於可由嚴格雜交條件所偵測得到之結構、核苷酸鹼基組成、排列或規則的相似性或同源性程度。特定言之，在本發明之內容中，高嚴格雜交作用之偵測可指出與，如，本文序列表中所提供核酸之強結構相似性或結構同源性（如，核苷酸結構、鹼基組成、排列或規則）。舉例而言，其需要辨識出可在嚴格條件下與本文之例示核酸雜交之試驗核酸。

因此，嚴格雜交之度量之一即係在高嚴格條件下（或極度嚴格條件，或是超高嚴格雜交條件，或是超-超高嚴格雜交條件）與

本發明核酸（如，包含選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群的聚核苷酸序列，或是其互補聚核苷酸序列之核酸）雜交之能力。任何試驗核酸之嚴格雜交（包括，如，高嚴格、超高嚴格或超-超高嚴格雜交條件)及清洗條件可由經驗輕易判定。

舉例而言，在判定高嚴格雜交其清洗條件時，其可逐漸增加該雜交及清洗條件（如，藉著增加該雜交或清洗之溫度、降低鹽濃度、增加清潔劑濃度及/或增加有機溶劑（諸如，福馬林）之濃度)，直到成所選之標準組為止。舉例而言，可逐漸增加該雜交及清洗條件，直到包含一或多種選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224，以及其互補聚核苷酸序列所組成之群之核酸序列的探針可結合完全配對互補目標（其再次為包含至少一種選自由SEQ ID NOS:80-158、201-204、223及224所組成之群之核酸序列，或是其互補聚核苷酸序列的核酸)，其信號對雜訊比為該探針對於非配對目標之雜交所觀察到者之至少2.5x高，且最佳為5x或更高。

通常言之，雜交分析係在經選擇之雜交條件下進行，以使包含與一經揭示參照（或已知）核苷酸序列（如，SEQ ID NO:80）完全互補之序列的核酸可雜交該重組抗原編碼序列（如，SEQ ID NO:80核酸序列之核苷酸序列變體)，其信號對雜訊比為該完全互補核酸與包含與該參照核酸至少約80或90%相同之核苷酸序列之核酸雜交所觀察到者之至少約5、7或10倍較高。此等條件可被視為專一性雜交之指標。

可調整上述之雜交條件，或是可選擇替代之雜交條件，以達成在選擇雜交核酸序列時之任何所欲嚴格程度。舉例而言，其可逐漸增加該上述之高嚴格雜交及清洗條件（如，藉著增加該雜交或清洗之溫度、降低鹽濃度、增加清潔劑濃度及/或增加有機溶劑（諸如，福馬林）之濃度)，直到成所選之標準組為止。舉例而言，可逐漸增加該雜交及清洗條件，直到所欲之探針可結合配對互補目標，其信號對雜訊比為該探針與非本發明核酸（諸如，編碼WT CTLA-4 ECD多肽之核酸）之雜交所觀察到者之至少約2.5x高，且

最佳為至少約5x （如，約10x、約20x、約50x、約100x或甚至約500x）。

製備及修飾核酸

本發明之核酸可藉由應用任何適當之合成、操縱及/或分離技術或是其組合而取得及/或產生。例示性之流程述於後文。舉例而言，本發明之聚核苷酸一般而言係經由標準之核酸合成技術製備，諸如，技藝中已知之固相合成技術。在此等技術中，其通常個別合成最多約100個鹼基之片段，接著再使其結合（如，藉由酶性或化學接合方法，或是聚合酶中介性重組方法）以形成基本上任何所欲之連續核酸序列。本發明核酸之合成亦可藉由化學合成而協助（或是替代完成），使用，如，經典之亞磷酸醯胺法，其述於，如，Beaucage et al. （1981） Tetrahedron Letters 22:1859-69，或是由Matthes et al. （1984） EMBO J. 3:801-05所述之方法，如，一般以自動化合成法實施者。本發明之核酸亦可藉著使用自動化DNA合成儀而製備。用以合成核酸之其他技術及相關原則述於，如，Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323 （1984），Itakura et al., Science 198:1056 （1984），及Ike et al., Nucl. Acid Res. 11:477 （1983）。

便利地，可自各種商業來源，諸如，The Midland Certified Reagent Company （mcrc@oligos.com）、the Great American Gene Company （全球資訊網址genco.com）、ExpressGen Inc. （全球資訊網址expressgen.com）、Operon Technologies Inc. （Alameda, CA），訂購訂製之核酸。類似地，可自各種來源之任一者，如，PeptidoGenic （pkim@ccnet.com）、HTI Bio-products, Inc. （全球資訊網址htibio.com）及BMA Biomedicals Ltd. （U.K.），Bio.Synthesis, Inc.，訂購訂製之肽及抗體。

部分本發明之核苷酸亦可藉著使用可雜交或PCR-擴增編碼本發明多肽之聚核苷酸的探針篩選cDNA庫而取得。篩選及分離cDNA純系之流程以及PCR擴增之流程係熟習技藝者所熟知；其例

示流程述於後文（參見，如，述於下文實例之流程）。此等技術述於，如，Berger and Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques [分子選殖技術指引]," 於Methods in Enzymol. Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, CA （"Berger"）；Sambrook, 上述文獻；及Ausubel, 上述文獻。部分本發明之核酸可藉著改變天然骨架而取得，如，藉由誘變、活體外之重組（如，換移（shuffling））或寡核苷酸重組。在其他情形下，此等聚核苷酸可在電腦中，或是經由寡聚核苷酸重組方法而製備，如述於本文所引述之參考文獻中者。

可用於修飾核酸之重組DNA技術係技藝中所熟知（如，限制核酸內切酶消化、接合、逆轉錄及cDNA生成、以及PCR）。可用之重組DNA技術及與其相關之原則，提供於，如，Mulligan（1993）Science 260:926-932，Friedman （1991） Therapy For Genetic Diseases [遺傳疾病之療法], Oxford University Press，Ibanez et al.（1991）EMBO J. 10:2105-10，Ibanez et al.（1992）Cell 69:329-41（1992），以及美國專利第4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075及4,810,648號，並更特定言之述於Sambrook et al. （1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖；實驗室手冊], Cold Spring Harbor Press，及其第三版（2001），Ausubel et al.（1994-1999）, Current Protocols in Molecular Biology [分子生物學之當前操作流程], Wiley Interscience Publishers （部分版本係Greene Publishing Associates），Berger, 上述文獻，及Watson,上述文獻。

經修飾之編碼序列

在適當時，本發明之核酸可藉由對該序列進行有關密碼子使用及/或密碼子內容之修飾而受到修飾，以增加或增進其在特定宿主中之表現，該（等）特定宿主係其中欲表現該核酸者。最常用於特定宿主中之密碼子稱為最適密碼子，且該等不常使用者係歸

類為罕見或低使用率密碼子（參見，如，Zhang, S. P. et al. （1991） Gene 105:61-72）。密碼子可經取代以反應該宿主之偏好密碼子使用，此係稱為「密碼子最適化」或「控制生物種密碼子偏好」之流程。

包含特定原核或真核宿主之偏好密碼子的最適化密碼子序列可用於增加轉譯率，或是生成具有所欲特性之重組RNA轉錄物，諸如，較長之半生期，相較於自非最適化序列所生成之轉錄物。用於產生密碼子最適化序列之技術係為已知（參見，如，Murray, E. et al. （1989） Nuc. Acids Res. 17:477-508）。

亦可對轉譯中止密碼子進行修飾以反應宿主偏好。舉例而言，釀酒酵母及哺乳動物之偏好中止密碼子分別係UAA及UGA。單子葉植物之偏好中止密碼子係UGA，而昆蟲及大腸桿菌偏好使用UAA作為中止密碼子（其討論參見，如，Dalphin, M.E. et al. （1996） Nuc. Acids Res. 24:216-218）。在其他密碼子內容中之密碼子安排亦可影響核酸序列之生物特性，而發明人亦預期為提供特定宿主所常用之密碼子內容安排的核酸修飾。因此，本發明之核酸可包含一密碼子最適化核苷酸序列，亦即，針對特定生物種而進行密碼子頻率最適化及/或進行密碼子對（亦即，密碼子內容）最適化者（如，該多肽可自一針對人類中之表現而進行最適化之聚核苷酸序列表現，該最適化係藉著置換根據密碼子頻率之「稀有」人類密碼子，或是置換密碼子內容，諸如，藉著使用諸如該等述於Buckingham et al. （1994） Biochimie 76（5）:351-54及美國專利第5,082,767、5,786,464及6,114,148號之技術）。舉例而言，本發明提供一種核酸，其包含SEQ ID NO:80之核苷酸序列變體，其中該核苷酸序列變體與SEQ ID NO:80之核苷酸序列之差異係藉著以該宿主中所經常表現之密碼子取代對於特定宿主之「罕見」密碼子而產生，該等密碼子係與SEQ ID NO:80中之經取代「罕見」密碼子編碼相同之胺基酸殘基。

載體、載體組成份及表現系統

本發明亦包括重組建構物，其包含一或多種本發明之核酸，如上文廣泛敘述。部分之建構物可包含載體，諸如，質體、黏粒（cosmid）、噬菌體、病毒、病毒顆粒、似病毒顆粒、細菌人工染色體（BAC）、酵母菌人工染色體（YAC）或其類似者，或是非複製性之載體，諸如，脂質體、裸或複合DNA、DNA-微顆粒，其中已插入至少一種本發明之核酸序列，其可為正向或反向排列。在此具體實例之特定態樣中，該建構物可進一步包含一或多種調控序列，其包括，例如，啟動子，以可操作之方式連結本發明之核酸序列（如，編碼分離或重組之突變CTLA-4 ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig之核酸）。大量之適當載體及啟動子皆為熟習技藝者所已知且可由市售取得。在部分情形下，載體，諸如，如，病毒或似病毒顆粒，亦可或是或可包括一或多種本發明之多肽，諸如，如，納入該病毒或似病毒顆粒之衣殼中。載體可作為傳遞劑，以對一對象進行外源基因或蛋白之傳遞或投與。本發明之載體，包括述於本文中者，可作為傳遞劑，以傳遞或投與本發明之核酸及/或多肽。

敘述可用於本文之分子生物學技術，包括載體、啟動子之使用，以及諸多其他相關主題之一般性文獻包括Berger, 上述文獻，Sambrook （1989）, 上述文獻，及Ausubel, 上述文獻。足以指引熟習技藝者進行活體外擴增之技術實例，包括聚合酶連鎖反應（PCR）、接合酶連鎖反應（LCR）、Q∃-複製酶擴增及其他RNA聚合酶中介性技術（如，NASBA），如，用餘生成本發明之同源核酸，可見於Berger、Sambrook及Ausubel，皆為上述文獻，以及Mullis et al. （1987）美國專利第4,683,202號；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [PCR流程：方法及應用指引]（Innis et al., eds.） Academic Press Inc. San Diego, CA （1990） （"Innis"）；Arnheim & Levinson （October 1, 1990） C&EN 36-47；The Journal Of NIH Research （1991） 3:81-94；（Kwoh et al. （1989） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177；Guatelli et al. （1990） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878；Lomeli et al. （1989） J.

Clin. Chem. 35:1826-1831；Landegren et al. （1988） Science 241:1077-1080；Van Brunt （1990） Biotechnology 8:291-294；Wu and Wallace （1989） Gene 4:560-569；Barringer et al. （1990） Gene 89:117-122，及Sooknanan and Malek （1995） Biotechnology 13:563-564。

PCR一般而言係指其中以技藝中所熟知之方法而擴增微量之一特定核酸片段（如，RNA或DNA）的流程（參見，如，美國專利第4,683,195號及其中所引述之其他參考文獻）。一般而言，其係使用起始自該目標區域之末端或以外之序列資訊而設計寡核苷酸引子。此等引子之序列將會與該待擴增樣板之相對股相同或相似。相對股之5'端核苷酸可與該經擴增物質之末端重合。PCR可用於擴增特定之RNA或特定之DNA序列、重組DNA或RNA序列、來自總體基因組DNA之DNA及RNA序列、以及轉錄自總體細胞RNA之cDNA、噬菌體或質體序列等。PCR係包含使用另一（如，已知）核酸作為引子而可用以擴增核酸試驗樣本之核酸聚合酶連鎖反應法之一個實例，但並非唯一之實例。選殖活體外擴增核酸之改良方法述於Wallace et al.，美國專利第5,426,039號。以PCR擴增大型核酸之改良方法摘述於Cheng et al. （1994） Nature 369:684 685及其中所引述之參考文獻，其中可產生高達40千鹼基（kb）之PCR擴增物。熟習技藝者將可明瞭，咸可用逆轉錄酶及聚合酶而將基本上任何RNA轉化成為適合進行限制酶切消化、PCR擴增及定序之雙股DNA。參見，Ausubel、Sambrook及Berger，皆為上述文獻。

可將本發明之核酸納入各種載體中之任一者中，如，表現載體，以表現多肽，包括，如，本發明之多肽。可使用可與原核宿主細胞相容之表現載體；此等原核表現載體係為技藝中所已知並可由市售取得。此等載體包括，但不限於，如，BLUESCRIPT載體（Stratagene），T7表現載體（Invitrogen），pET載體（Novagen），以及類似之原核載體。

或可替代使用可與真核宿主細胞相容之表現載體；此等真核表現載體係為技藝中所已知並可由市售取得。此等載體包括，但

不限於，如，pCMV載體（如，Invitrogen），pIRES載體（Clontech），pSG5 載體（Stratagene），pCDNA3.1（Invitrogen Life Technologies），pCDNA3（Invitrogen Life Technologies），遍在染色質開放元件（Ubiquitous Chromatin Opening Element）（UCOE™）表現載體（Millipore），以及類似之真核表現載體。該UCOE™載體一般而言係用於進行哺乳動物細胞中之蛋白生成（如，CHO細胞）。根據Millipore，UCOE™表現技術可阻礙轉基因沈默，並可不論染色體納入之位置而提供高含量之基因表現。參見全球資訊網址millipore.com之Millipore網站。其中可，例如，納入本發明核酸之一種例示性之UCOE表現載體係稱為CET1019AS-puro-SceI之UCOE表現載體，其可由Millipore之授權取得。有關UCOE表現載體CET1019AS-puro-SceI之資訊可見於，如，John Wynne, "UCOE™ Technology Maximizes Protein Expression [UCOE™技術可使蛋白表現最大化]," BioProcess International 4(7):104-105（July/August 2006）（RP1725EN00）（可自全球資訊網址millipore.com/bibliography/tech1/rp1725en00取得）；其他有關於此載體以及由Millipore授權此載體之資訊可見於Millipore網站，包括全球資訊網址millipore.com/company/cp3/ucoe_licensing及millipore.com/techpublications/tech1/ps1013en00。因此，舉例而言，可將與編碼IgG2 Fc多肽之DNA序列（如，SEQ ID NO:184）融合的編碼突變CTLA-4 ECD之DNA序列（如，SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:50）（造成SEQ ID NO:201之DNA序列）插入UCOE CET1019AS載體（Millipore），並將該所得之DNA質體用於轉染宿主細胞。

表現載體包括染色體、非染色體及合成性DNA序列，如，SV40之衍生物，細菌載體（如，傷寒沙門氏菌（*S. typhimurium*）、傷寒沙門氏菌（*S. typhi*）、弗氏志賀氏菌（*S. flexneri*）、單核細胞增生性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）、炭疽芽胞桿菌（*B. anthracis*））；質體；細菌質體；噬菌體DNA；桿狀病毒；酵母菌質體；衍生自質體及噬菌體DNA之組合之載體；病毒DNA或RNA

載體，其包括，如，痘瘡病毒、腺相關病毒（AAV）、腺病毒、Semliki-Forest病毒（如，Notka et al., Biol. Chem. 380:341-52（1999））、痘病毒（如，MVA）、α病毒，如，委內瑞拉馬腦炎病毒（VEE）、西部馬腦炎病毒（WEE）、東部馬腦炎病毒（EEE）、水泡性口炎病毒（VSV）、禽痘病毒、假性狂犬病病毒、單純皰疹病毒、逆轉錄病毒，及諸多其他者。可使用任何可將基因物質轉導至細胞中，並（如欲進行複製）係可複製且可在相關宿主中存活之載體。作為傳遞載劑之病毒及細菌載體可經減毒；減毒應足以降低（如非消除）非所欲疾病症狀之誘發。圖1係例示質體表現載體pCDNA突變CTLA-4-Ig之圖式，其編碼本發明之突變CTLA-4-Ig。有關適當表現載體之其他細節提供於下文，包括實例之中。

包含如本文所述之本發明核酸序列以及適當之啟動子或控制序列之本發明載體可用以轉形適當之宿主，以容許該宿主表現該蛋白。適當表現宿主之實例包括：細菌細胞，諸如，大腸桿菌、鏈黴菌（*Streptomyces*）及傷寒沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*）；真菌細胞，諸如，釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、畢赤酵母（*Pichia pastoris*）及粉色麵包黴菌（*Neurospora crassa*）；昆蟲細胞，諸如，果蠅（*Drosophila*）及秋行軍蟲（*Spodoptera frugiperda*）；哺乳動物細胞，諸如，中國倉鼠卵巢細胞（CHO）（如，CHO-K1）、COS（如，COS-1, COS-7）、幼倉鼠腎細胞（BHK）及人類胚胎腎細胞（HEK）（如，HEK 293）、Bowes黑色素瘤細胞，及植物細胞。有關適當宿主細胞之其他細節提供於下文。

在細菌系統中，其可根據該目標多肽或其片段之所欲用途而選擇諸多之表現載體。舉例而言，在需要大量之特定多肽或其片段以誘發抗體時，可能需要可指引高含量可輕易純化之融合蛋白表現的載體。此等載體包括，但不限於，多功能性大腸桿菌選殖及表現載體，諸如，BLUESCRIPT （Stratagene），其中目標核苷酸編碼序列（如，編碼重組突變CTLA-Ig之核苷酸序列）可以符合β半乳糖苷胺酶之胺端Met及其後續7個殘基之框構的方式接合進

入該載體中，以產生雜交蛋白；pIN載體（Van Heeke & Schuster（1989） J. Biol. Chem. 264:5503-5509）；pET載體（Novagen, Madison WI）；及其類似者。

相似地，在酵母菌釀酒酵母中，可使用包含組成性或誘發性啟動子（諸如，α因子、醇氧化酶及PGH）之諸多載體而製備本發明之多肽。就其回顧評論，參見，Ausubel, 上述文獻，Berger, 上述文獻，及Grant et al. （1987） Meth. Enzymol. 153:516-544。

在哺乳動物宿主細胞中，可使用諸多表現系統，諸如，病毒基礎性之系統。就其中使用腺病毒作為表現載體之情形中，其可使編碼序列視情形而接合進入由後期啟動子及三聯引導序列所構成之腺病毒轉錄/轉譯複合物中。在病毒基因組之非必要性E1或E3區域中之插入可造成可在經感染之宿主細胞中表現目標多肽之活病毒（Logan and Shenk （1984） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659）。此外，轉錄增強子，諸如勞氏肉瘤病毒（RSV）增強子，可用以增加哺乳動物宿主細胞中之表現。

載體，如，表現載體，或是本發明之聚核苷酸，可包含一或多種表現控制序列。表現控制序列一般而言係連結及/或以可操作之方式連結本發明之核酸序列，諸如，編碼重組突變CTLA-4 ECD多肽或重組突變CTLA-4- Ig融合蛋白之核酸。表現控制序列一般而言係核苷酸序列，其可啟動、增強或控制另一核苷酸序列之表現（一般而言係轉錄）。可用之適當表現控制序列包括啟動子（包括組成性啟動子、誘發性啟動子及/或可壓抑性啟動子）、用以擴增表現之增強子、起始序列、終止轉譯序列、剪切控制序列及其類似者。

當本發明之核酸係包括在載體中時，該核酸一般而言係以可操作之方式連結適當之轉錄控制序列（啟動子）以指引mRNA之合成。啟動子對於重組多肽表現之量具有特別重要之影響。可使用任何適當之啟動子。適當啟動子之實例包括巨細胞病毒（CMV）啟動子（有或無該第一內含子（內含子A））、HIV長終端重複啟動子、磷酸甘油酸激酶（PGK）啟動子、勞氏肉瘤病毒（RSV）啟

動子（諸如RSV長終端重複（LTR）啟動子）、SV40啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒（MMTV）啟動子、HSV啟動子（諸如，Lap2啟動子或皰疹胸苷激酶啟動子(如述於，如，Wagner et al.（1981）Proc. Natl. Acad. Sci. 78:144-145)、衍生自SV40或Epstein Barr病毒之啟動子、腺相關病毒（AAV）啟動子（諸如，p5啟動子）、金屬硫蛋白啟動子（諸如，綿羊金屬硫蛋白啟動子或小鼠金屬硫蛋白啟動子)(參見，如，Palmiter et al.（1983） Science 222:809-814)、人類遍在蛋白C啟動子、大腸桿菌啟動子(諸如，lac及trp啟動子)、噬菌體λ P_L啟動子及其他已知可控制基因在原核或真核細胞中（直接在該細胞中或是在感染該細胞之病毒中）表現之啟動子。可使用在哺乳動物中（特別係人類）具有強組成性基線表現之啟動子，諸如，CMV啟動子，諸如，CMV立即早期啟動子(其述於，如，美國專利第5,168,062、5,385,839、5,688,688及5,658,759號)，以及與此等CMV啟動子具有實質上序列相同性之啟動子。亦可使用具有增強特性之重組啟動子，諸如，述於國際專利公開案WO 02/00897中者。

以可操作之方式連結本發明核酸以進行該核酸表現之啟動子可具有任何適當之作用機制。因此，該啟動子可為，舉例而言，「誘發性」啟動子（如，生長激素啟動子、金屬硫蛋白啟動子、熱休克蛋白啟動子、E1B啟動子、缺氧誘發性啟動子、放射誘發性啟動子或腺病毒MLP啟動子及三聯引導序列)、誘發性-可壓抑性啟動子、發育階段相關性啟動子（如，球蛋白基因啟動子）或組織專一性啟動子（如，胃肌細胞α-肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白長鏈1A啟動子或血管內皮鈣黏附蛋白啟動子)。適當之誘發性啟動子包括蛻皮激素及蛻皮激素類似物誘發性啟動子。蛻皮激素類似物誘發性啟動子係市售可得者，如，經由Stratagene （La Jolla, CA)。如需要，可藉由使用誘發性開-及關-基因表現系統（on- and off-gene expression system）而誘發本發明之核酸。此種開-及關-基因表現系統之實例分別包括Tet-On™基因表現系統及Tet-Off™基因表現系統(Clontech, Palo Alto, CA；有關各個此等系統之詳述參見，如，

Clontech Catalog 2000, pg. 110-111）。誘發性啟動子可為任何反應適當信號而受到正-及/或負調節之啟動子。其他誘發性啟動子包括阿拉伯糖誘發性啟動子、類固醇誘發性啟動子（如，糖皮質素誘發性啟動子），以及pH、壓力及熱誘發性啟動子。

該啟動子可為，且通常係，宿主天然啟動子，或是衍生自可感染特定宿主之病毒的啟動子（如，人類β肌動蛋白啟動子、人類EF1α啟動子或是衍生自人類AAV之啟動子，以可操作之方式連結目標核酸），特別是在慮及須嚴格避免因為對於並非慣常存在於該宿主中之序列的宿主免疫反應而造成之基因表現沈默時。亦可使用連結多重目標核苷酸序列之雙方向性啟動子系統（如述於，如，U.S. 5,017,478）。

其他適當之啟動子以及有關適當啟動子之選擇、使用及建構之原則提供於，如，Werner（1999）Mamm Genome 10(2):168-75，Walther et al.（1996）J. Mol. Med. 74(7):379-92，Novina（1996）Trends Genet. 12（9）:351-55，Hart （1996） Semin. Oncol. 23（1）:154-58，Gralla（1996）Curr. Opin. Genet. Dev. 6(5):526-30，Fassler et al. （1996） Methods Enzymol 273:3-29，Ayoubi et al.（1996), 10(4) FASEB J 10(4):453-60，Goldsteine et al.（1995）Biotechnol. Annu. Rev. 1:105-28，Azizkhan et al.（1993）Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 3(4):229-54，Dynan（1989）Cell 58(1):1-4，Levine （1989） Cell 59（3）:405-8，及Berk et al.（1986） Annu. Rev. Genet. 20:45-79，以及美國專利第6,194,191號。其他適當之啟動子可藉由使用真核啟動子資料庫（68版）（可在全球資訊網址epd.isb-sib.ch/取得）以及其他類似之資料庫，諸如，轉錄調控區域資料庫（TRRD）（4.1版）（可在全球資訊網址bionet.nsc.ru/trrd/取得）及轉錄因子資料庫（TRANSFAC）（可在全球資訊網址transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html取得）而獲得辨識。

作為啟動子之替代，特別是在RNA載體擊劍購物中，本發明之載體或核酸可包含一或多個內部核糖體進入位點（IRESs）、IRES-編碼序列或RNA序列增強子（Kozak一致序列類似物），諸

如，煙草鑲嵌病毒Ω端序列。

本發明之載體或聚核苷酸可包括上游活化子序列（UAS），諸如，Gal4活化子序列（參見，如，美國專利第6,133,028號）或其他適當之上游調控序列（參見，如，美國專利第6,204,060號）。

本發明之載體或聚核苷酸可包括Kozak一致序列，其可在哺乳動物細胞中作用。該Kozak序列可為天然或經修飾之序列，諸如，述於美國專利第6,107,477號之經修飾Kozak一致序列。

特定之起始信號可協助有效轉譯本發明之編碼序列，諸如，突變CTLA-4 ECD多肽編碼核苷酸序列。此等信號可包括在本發明之載體中。此等信號可包括，如，ATG起始密碼子及毗鄰序列。在其中將編碼序列、其起始密碼子及上游序列插入適當表現載體中之情形下，其可能不需要額外之轉譯控制信號。然而，在其中僅將編碼序列（如，成熟蛋白編碼序列）或其部分插入之情形下，其即必須提供包括該ATG起始密碼子之外源核酸轉錄控制信號。同時，該起始密碼子必須係在正確之讀框中，以確保該完整插入物之轉錄。外源轉錄元件及起始密碼子可為各種來源—包括天然及合成兩者。表現之效率可藉著納入適用於所用細胞系統之增強子而增強（參見，如，Scharf et al., Results Probl. Cell. Differ. 20:125-62 （1994）；及Bittner et al., Meth. Enzymol. 153:516-544（1987））。適當之增強子包括勞氏肉瘤病毒（RSV）增強子以及述於美國專利第6,225,082號之RTE增強子。

熟習技藝者將可辨知，將起始密碼子（ATG）引入特定目標核苷酸序列之5'端通常會造成該經編碼之胺基酸序列在哺乳動物細胞中表現時添加一N-端甲硫胺酸（其他修飾可能會發生在細菌及/或其他真核細胞中，諸如在起始密碼子處引入一甲醯基-甲硫胺酸殘基）。就本發明之核酸於真核細胞中之表現而言，其一般而言係將起始密碼子及編碼信號肽之核苷酸序列包括在本發明核酸序列（如，SEQ ID NO:80）之5'端，且一般而言將終止密碼子包括於該核酸（如，SEQ ID NO:80）之C端。其中一種例示性之信號肽係hCTLA-4信號肽序列（SEQ ID NO:182）；編碼該組織型纖維蛋

白溶酶原激活劑信號肽之核酸示於SEQ ID NO:181。另一種例示性之信號肽係hCTLA-4信號肽序列（SEQ ID NO:216）；其係由示於SEQ ID NO:215之核酸序列編碼。

終止序列於下文詳細討論。

此等元件可包括在所選載體建構物中。在表現時，由該核酸（如，SEQ ID NO:80）編碼之多肽變體最初將會包括一N-端甲硫胺酸殘基及該信號肽序列。然而，該N-端甲硫胺酸及信號肽序列將會在分泌時受到切除，因而產生該經編碼之多肽（如，SEQ ID NO:1）。

本發明核酸（或是對應之本發明多肽）之表現量可以任何適當之技術評估。其實例包括北方點漬分析（其於，如，McMaster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(11):4835-38（1977）及Sambrook, 上述文獻中討論）、逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應（RT-PCR）（如述於，如，U.S. 5,601,820及Zaheer et al., Neurochem. Res. 20:1457-63（1995））、以及原位雜交技術（如述於，如，美國專利第5,750,340及5,506,098號）。蛋白之定量亦可以Lowry分析及其他蛋白定量分析完成（參見，如，Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254（1976）；Lowry et al., J. Biol. Chem. 193:265（1951））。針對取自經編碼本發明重組多肽之聚核苷酸轉染之細胞裂解物的本發明重組多肽所進行之西方點漬分析係用以評估重組多肽表現量之另一適當技術。

本發明之載體（如，表現載體）或聚核苷酸可包含用以進行轉譯起始之核糖體結合位點以及轉錄終止區域。適當之轉錄終止區域係，例如，聚腺苷酸序列，其可協助由DNA序列所生成之RNA轉錄物的切割及聚腺苷酸化。可使用任何適當之聚腺苷酸序列，包括合成性之最適化序列，以及BGH（牛生長激素）、人生長激素基因、多瘤病毒、TK（胸苷激酶）、EBV（Epstein Barr病毒）、兔β球蛋白及乳頭狀瘤病毒（包括人類乳頭狀瘤病毒及BVP（牛乳頭狀瘤病毒））之聚腺苷酸序列。適當之聚腺苷酸（polyA）序列亦包括SV40（人類肉瘤病毒-40）聚腺苷酸序列及BGH polyA

序列。此等polyA序列述於，如，Goodwin et al. （1998） Nucleic Acids Res. 26（12）:2891-8，Schek et al. （1992） Mol. Cell. Biol. 12（12）:5386-93，及van den Hoff et al. （1993） Nucleic Acids Res. 21（21）:4987-8。有關於適當聚腺苷酸序列選擇之其他原則述於，如，Levitt et al. （1989） Genes Dev. 1989 3（7）:1019-1025，Jacob et al. （1990） Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 1（1）:49-59，Chen et al. （1995） Nucleic Acids Res. 23（14）:2614-2620，Moreira et al. （1995） EMBO J. 14（15）:3809-3819，Carswell et al. （1989） Mol. Cell. Biol. 9（10）:4248-4258。

本發明之載體或聚核苷酸可進一步包含位點專一性重組位點，其可用於調節目標核苷酸序列之轉錄，如述於，如，美國專利第4,959,317、5,801,030及6,063,627號，歐洲專利申請案第0 987 326號，以及國際專利申請公開案WO 97/09439。

本發明之載體或聚核苷酸亦可包含編碼分泌/定位序列之核酸，以使多肽表現靶向至所欲之細胞區隔、膜或胞器，或是指引多肽分泌至週質空間或進入細胞培養基。此等序列係為技藝中所已知，並包括分泌引導肽或信號肽、胞器靶向序列（如，核定位序列、ER滯留信號、粒線體轉運序列、葉綠體體轉運序列）、膜定位/錨定序列（如，停止轉運序列、GPI錨定序列）、以及其類似者。本發明之聚核苷酸可以，例如，符合框構此種編碼分泌及/或定位序列之核酸。由此等本發明之聚核苷酸所表現之多肽可包括對應於該（等）分泌及/或定位序列之胺基酸序列。

此外，本發明之載體或聚核苷酸可包含一或多種可選擇性標記核苷酸序列或基因，以提供表型特色進行經轉形宿主細胞之選擇，諸如，真核細胞培養物之二氫葉酸還原酶抗性、新黴素抗性、G418抗性、嘌呤黴素（puromycin）抗性及/或保米黴素（blasticidin）抗性，或是諸如大腸桿菌中之四環黴素或胺苄青黴素抗性。

本發明之載體或聚核苷酸亦可包含可用於在微生物中進行增殖之複製起點。所用之細菌複製起點（Ori）較佳係並不會負面影響哺乳動物細胞中之基因表現者。可用之複製起點序列實例包括f1

噬菌體ori、RK2 oriV、pUC ori及pSC101 ori。複製起點序列包括ColEI ori及p15 （可自質體pACYC177取得，New England Biolab, Inc.），或是另一低拷貝ori序列（類似p15）可為部分內容中所需要。在此態樣中之核酸係欲作為穿梭載體；可在真核及原核宿主兩者中進行複製及/或表現（如，包含可在真核及原核生物兩者中獲得辨識之複製起點的載體）。

本發明包括裸DNA或RNA載體，其包括，例如，線性表現元件（如述於，如，Sykes and Johnston （1997） Nat Biotech 17:355-59）、壓縮核酸載體（如述於，如，美國專利第6,077,835號及/或國際專利申請公開案WO 00/70087）、質體載體（諸如，pCDNA3.1、pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119）、「侏儒」最小尺寸核酸載體（如述於，如，Schakowski et al. （2001） Mol. Ther. 3:793-800），或是為沈澱核酸載體建構物，諸如，$CaPO_4$沈澱建構物（如述於，如，國際專利申請案WO 00/46147，Benvenisty and Reshef （1986） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9551-55，Wigler et al. （1978）, Cell 14:725，及Coraro and Pearson （1981） Somatic Cell Genetics 7:603），其包含本發明之核酸。舉例而言，本發明提供一種裸DNA質體，其包含SEQ ID NO:80，以可操作之方式連結CMV啟動子或CMV啟動子變體以及適當之聚腺苷酸序列。裸核苷酸載體及其使用係技藝中所已知（參見，如，美國專利第5,589,466及5,973,972號）。

本發明之載體一般而言係表現載體，其適用於細菌系統、真核系統、哺乳動物系統或其他系統之表現（相對於設計用以複製核酸序列而不進行表現之載體，其可被稱為選殖載體）。舉例而言，在一態樣中，本發明提供一種細菌表現載體，其包含本發明之核酸序列（如，編碼重組突變CTLA-4-Ig之核酸序列）。適當之載體包括，例如，可指引可輕易純化之融合蛋白高量表現之載體（如，多功能性大腸桿菌選殖及表現載體，諸如，BLUESCRIPT（Stratagene）；pIN載體（Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509 （1989）；pET載體（Novagen, Madison WI）；及其

類似者）。儘管此等細菌表現載體可用於表現特定之本發明多肽，本發明之糖蛋白較佳係在真核細胞中表現，並因此本發明亦提供真核表現載體。

該表現載體可為適於在酵母菌細胞中表現本發明核酸之載體。可使用任何適用於在酵母菌系統中進行表現之載體。可用於，如，釀酒酵母中之適當載體包括，如，包含組成性或誘發性啟動子（諸如，α因子、醇氧化酶及PGH）之載體（回顧評論於Ausubel, 上述文獻，Berger, 上述文獻，及Grant et al., Meth. Enzymol. 153:516-544 （1987））。通常，該表現載體將係適用於在哺乳動物細胞中表現本發明核酸之載體，諸如，昆蟲細胞（如，SF-9細胞）或哺乳動物細胞（如，CHO細胞、293細胞、HeLa細胞、人類纖維母細胞或已經詳細定性之類似細胞）。適當之哺乳動物表現載體係為技藝中所已知（參見，如，Kaufman, Mol. Biotechnol. 16（2）:151-160 （2000），Van Craenenbroeck, Eur. J. Biochem. 267（18）:5665-5678 （2000），Makrides, Protein Expr. Purif. 17（2）:183-202 （1999），及Yarranton, Curr. Opin. Biotechnol. 3（5）:506-511 （1992））。適當之昆蟲細胞質體表現載體亦為已知（Braun, Biotechniques 26（6）:1038-1040:1042 （1999））。

表現載體一般而言可在宿主細胞中增殖，該宿主細胞可為真核細胞（諸如，哺乳動物細胞、酵母菌細胞或植物細胞）或原核細胞（諸如，細菌細胞）。核酸載體或表現載體進入宿主細胞之引入（如，轉染）可以磷酸鈣轉染（參見，如，Graham et al., Virology 52:456-457 （1973）之磷酸鈣共沉澱法）、DEAE-葡聚糖中介性轉染、電穿孔、基因或疫苗槍、注射、脂質體轉染（lipofection）及生物彈道（biolistics），或是其他常用技術而進行（參見，如，Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual [基因轉移及表現：實驗室手冊], Stockton Press （1990）；關於活體內、活體外及活體外方法之敘述，參見Davis, L., Dibner, M., and Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology [分子生物學基礎方法] （1986））。包含此等及其他本發明載體之細胞形成本發明之一重要部分。

在一態樣中，本發明提供一種表現載體，其包含：(i) 第一聚核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性，其中該第多肽可結合人類CD86及/或人類CD80 以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及/或是可抑制免疫反應，以及 (ii) 第二聚核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含一免疫球蛋白 (Ig) 多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。該Ig多肽視情況係人類Ig Fc多肽，如，IgG1、IgG2、IgG4等，或是突變Ig Fc多肽，如，Ig Fc多肽，其中一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸 (如，絲胺酸) 取代，因而消除形成於兩Ig鏈間之一或多個雙硫鍵，或是其中一或多個脯胺酸殘基經另一胺基酸 (如，脯胺酸) 取代，以降低效應子功能 (減少Fc受體結合)。在另一態樣中，本發明提供一種表現載體，其包含核苷酸序列，編碼一融合蛋白，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列相同性。

本發明所提供之其他核酸包括黏粒 (cosmid)。可使用任何適當之黏粒載體以複製、轉移及表現本發明之核酸序列。一般而言，黏粒包含細菌oriV、抗生素選擇標記、選殖位點、以及一或兩個衍生自噬菌體λ之cos位點。黏粒可為穿梭黏粒或哺乳動物黏粒，其包含SV40 oriV，以及，如所欲者，適當之哺乳動物選擇標記。黏粒載體進一步述於，如，Hohn et al. (1988) Biotechnology 10:113-27。

本發明之核酸可以適當傳遞載劑 (亦即，載體) 之形式而包括在宿主或宿主細胞中及/或對其進行投與。該載體可為任何適當之載體，包括染色體、非染色體及合成性核酸載體，或是其他上述之載體，且可包括上述表現元件以及/或噬其他轉染協助性及/或表現促進性序列元件之任何組合。此等載體之實例包括病毒、細菌質體、噬菌體、黏粒、噬菌質體 (phagemid)、SV40之衍生物、桿狀病毒、酵母菌質體、衍生自質體及噬菌體DNA之組合的載體、

以及病毒核酸（RNA或DNA）載體、聚離胺酸及細菌細胞。

本發明重組DNA序列之傳遞可以裸DNA質體或是連結一或多種轉染增強劑之質體而完成，如本文進一步討論。該質體DNA載體可具有任何適當之特徵組合。質體DNA載體可包含強啟動子/增強子區域（如，人類CMV、RSV、SV40、SL3-3、MMTV或HIV LTR啟動子）、有效之聚（A）終止序列、用於在大腸桿菌中生成質體之複製起點、作為選擇標記之抗生素抗性基因、以及便利之選殖位點（如，多位點連接子（polylinker））。在此態樣中之一種用以傳遞本發明核酸之特定質體載體示於圖1；此種載體之建構及特徵述於下文之實例中。

在另一態樣中，本發明提供一種非核酸載體，其包含至少一種本發明之核酸或多肽。此種非核酸載體包括，如，但不限於，重組病毒、病毒核酸-蛋白複合物（其與重組病毒顆粒有時可被稱作病毒載體）或細胞，諸如重組（且通常係經減毒）之沙門氏菌（*Salmonella*）、志賀氏菌（*Shigella*）、李斯特菌（*Listeria*）及卡介菌（*Bacillus Calmette-Guérin*）（BCG）細菌細胞。因此，舉例而言，本發明提供病毒載體、昆蟲載體、細菌載體或植物載體，其包含具本發明序列之核酸。可在此態樣中使用任何適當之病毒、昆蟲、植物或細菌載體，且諸多者係技藝中所已知。病毒載體可包含任何數目之病毒聚核苷酸，其係單獨存在（病毒核酸載體），或是更常見者為結合一或多種（一般而言係二、三種或以上）之病毒蛋白存在，該等蛋白可協助本發明之核酸在所欲宿主細胞中之傳遞、複製及/或表現。

在一態樣中，可使用胞內細菌（如，單核細胞增生性李斯特菌）而傳遞本發明之核酸。一種用以進行一或多種本發明核酸之質體DNA傳遞之例示性細菌載體係單核細胞增生性李斯特菌（Lieberman et al., Vaccine 20:2007-2010 （2002））。

本發明包括重組或分離之病毒載體，其已經修飾以包含一或多種本發明之核酸或多肽。病毒載體可包括包含所有或部分病毒基因組之聚核苷酸，病毒蛋白/核酸複合物、似病毒顆粒（VLP）、

類似該等述於美國專利第5,849,586號及國際專利申請公開案WO 97/04748之載體或是包含一或多種病毒核酸之完整病毒顆粒，且該病毒載體一般而言係經工程處理以包括至少一種本發明之核酸及/或多肽。病毒載體（亦即，重組病毒）可包含野生型之病毒顆粒或是經修飾之病毒顆粒，其特定實例於下文討論。諸多病毒皆一般而言可作為載體而傳遞外源核酸，包括至少一種本發明之核酸，諸如編碼本文所述之突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig之核酸。此等載體包括經重組修飾之具外膜或不具外膜之DNA及RNA病毒，一般而言係選自桿狀病毒科（*baculoviridiae*）、細小病毒科（*parvoviridiae*）、小RNA病毒科（*picomaviridiae*）、皰疹病毒科（*herpesviridiae*）、痘病毒科(*poxviridae*)、腺病毒科(*adenoviridiae*)或微小核糖核酸病毒科(*picornaviridiae*)。病毒載體可為野生型或是可由重組核酸技術修飾而成為複製缺陷型、複製型或條件複製型。

該病毒載體可為需要另一載體或野生型病毒之存在始可進行複製及/或表現之載體（亦即，輔助病毒依賴性載體），諸如，腺病毒載體複製子。一般而言，此等病毒載體包含野生型之病毒顆粒，或是在其蛋白及/或核酸內容中經修飾已增加轉基因能力或是協助核酸轉染及/或表現的病毒顆粒（此等載體之實例包括皰疹病毒/AAV複製子）。該病毒基因組可經修飾以包括誘發性啟動子，其可僅在特定條件下達成複製或表現。

該病毒載體可衍生自或包含一般而言感染動物（較佳係脊椎動物，諸如，哺乳動物，包括，如，人類）之病毒。在此態樣中之適當病毒載體顆粒包括，例如，腺病毒載體顆粒（包括任何腺病毒科之病毒或衍生自腺病毒科之病毒者）、腺相關病毒載體顆粒（AAV載體顆粒）或是其他細小病毒及細小病毒載體顆粒、乳頭瘤狀病毒載體顆粒、Semliki-Forest病毒載體、黃病毒載體、微小核糖核酸病毒載體、α病毒載體、皰疹病毒載體、痘病毒載體、逆轉錄病毒載體（包括慢病毒載體）。此等病毒及病毒載體之實例提供於，如，Fields Virology, 上述文獻，Fields et al., eds., Virology

[病毒學], Raven Press, Ltd., New York （3rd ed., 1996及4th ed., 2001），Encyclopedia of Virology [病毒學百科全書], R.G. Webster et al., eds., Academic Press （2nd ed., 1999），Fundamental Virology [基礎病毒學], Fields et al., eds., Lippincott-Raven （3rd ed., 1995），Levine, "Viruses [病毒]," Scientific American Library No. 37（1992），Medical Virology [醫學病毒學], D.O. White et al., eds., Academic Press （2nd ed. 1994），及Introduction to Modern Virology [現代病毒學介紹], Dimock, N.J. et al., eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. （1994）。

可與本發明之核酸及本文所述之方法共同使用之病毒載體包括腺相關病毒載體，其係於，如，Carter （1992） Curr. Opinion Biotech. 3:533-539 （1992）及Muzcyzka （1992） Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129 （1992）中進行回顧評論。AAV載體之其他類型及態樣述於，如，Buschacher et al., Blood 5（8）:2499-504，Carter, Contrib. Microbiol. 4:85-86 （2000），Smith-Arica, Curr. Cardiol. Rep. 3(1):41-49（2001），Taj, J. Biomed. Sci. 7(4):279-91 （2000），Vigna et al., J. Gene Med. 2(5):308-16（2000），Klimatcheva et al., Front. Biosci. 4:D481-96（1999），Lever et al., Biochem. Soc. Trans. 27(6):841-47 （1999），Snyder, J. Gene Med. 1（3）:166-75 （1999），Gerich et al., Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 5（2）:118-23 （1998），及During, Adv. Drug Deliv. Review 27（1）:83-94 （1997），及美國專利第4,797,368、5,139,941、5,173,414、5,614,404、5,658,785、5,858,775及5,994,136號，以及其他本文他處所論及之參考文獻。腺相關病毒載體可使用示於，例如，美國專利第4,797,368號及Laughlin et al., Gene 23:65-73 （1983）之方法而建構及/或純化。

α病毒載體可為其他內容中之基因傳遞載體。α病毒載體係技藝中所已知，並述於，如，Carter （1992） Curr Opinion Biotech 3:533-539，Schlesinger Expert Opin. Biol. Ther. （2001） 1（2）:177-91，Polo et al., Dev. Biol. （Basel）. 2000;104:181-5，

Wahlfors et al., Gene Ther. （2000） 7（6）:472-80，國際專利申請公開案WO 01/81609、WO 00/39318、WO 01/81553、WO 95/07994、WO 92/10578。

另一較佳之病毒載體群係皰疹病毒載體。其實例述於，如，Lachmann et al., Curr. Opin. Mol. Ther. （1999） 1（5）:622-32，Fraefel et al., Adv. Virus Res. （2000） 55:425-51，Huard et al., Neuromuscul. Disord. （1997） 7（5）:299-313，Frenkel et al., Gene Ther. （1994） Suppl 1:S40-6，美國專利第6,261,552及5,599,691號。

逆轉錄病毒，包括慢病毒載體，亦可為特定內容中之較佳基因傳遞載體。技藝中已知多種逆轉錄病毒載體。逆轉錄病毒載體之實例述於，如，Miller, Curr Top Microbiol. Immunol. （1992） 158:1-24，Weber et al., Curr. Opin. Mol. Ther. （2001） 3（5）:439-53，Hu et al., Pharmacol. Rev. （2000） 52（4）:493-511，Kim et al., Adv. Virus Res. （2000） 55:545-63，Palu et al., Rev. Med. Virol. （2000） 10（3）:185-202，Takeuchi et al., Adv. Exp. Med. Biol. （2000） 465:23-35，美國專利第6,326,195、5,888,502、5,580,766及5,672,510號。

桿狀病毒載體係另一較佳之病毒載體群，特別係就本發明多肽之製備而言。桿狀病毒載體之製備及使用係為已知（參見，如，Kost, Curr. Opin. Biotechnol. 10（5）:428-433 （1999）；Jones, Curr. Opin. Biotechnol. 7（5）:512-516 （1996））。在該載體係為治療用途而使用之情形下，該載體將會受到選擇以使其可適當感染（或是就核酸載體之情形而言為轉染或轉形）其中欲取得治療作用之目標細胞。

腺病毒載體亦可為用以進行基因轉移之適當病毒載體。腺病毒載體係為技藝中所熟知，且述於，如，Graham et al.（1995） Mol. Biotechnol. 33（3）:207-220，Stephenson （1998） Clin. Diagn. Virol. 10（2-3）:187-94，Jacobs （1993） Clin Sci （Lond）. 85（2）:117-22，美國專利第5,922,576、5,965,358及6,168,941號，及國際專利申請

案WO 98/22588、WO 98/56937、WO 99/15686、WO 99/54441及WO 00/32754。可用於本發明之實施並適用於進行生物之活體內轉導及本發明核酸之表現的腺病毒載體、皰疹病毒載體及辛得比斯（Sindbis）病毒載體廣泛述於，如，Jolly （1994） Cancer Gene Therapy 1:51-64，Latchman （1994） Molec. Biotechnol. 2:179-195，及Johanning et al. （1995） Nucl. Acids Res. 23:1495-1501。

病毒載體可為在宿主細胞中為複製缺陷者。其包括腺相關病毒（AAV）載體，其在無互補腺病毒或至少為腺病毒基因產物（其係由，如，輔助病毒、質體或補助細胞（complementing cell）提供）之存在下即係天然複製缺陷性者。「複製缺陷」意謂該病毒載體包含缺乏至少一種複製必要性基因功能之基因組。在本文中，基因、基因功能或是基因或基因組區域之缺陷係定義為刪除病毒基因組之足夠基因物質，以損害或刪除其核酸序列之全部或部分經刪除之該基因功能。

複製必要性基因功能係該等為使複製缺陷型病毒載體進行複製（亦即，增殖）所需之基因功能。病毒載體顆粒之必要基因功能隨該所論病毒載體顆粒之類型而各異。複製缺陷型病毒載體顆粒之實例述於，如，Marconi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93（21）:11319-20（1996），Johnson and Friedmann, Methods Cell Biol. 43 （pt. A）:211-30 （1994），Timiryasova et al., J. Gene Med. 3（5）:468-77 （2001），Burton et al., Stem Cells 19（5）:358-77（2001），Kim et al., Virology 282（1）:154-67 （2001），Jones et al., Virology 278（1）:137-50 （2000），Gill et al., J. Med. Virol. 62（2）:127-39 （2000）。其他複製缺陷型載體係基於單純MLV載體（Miller et al. （1990） Mol. Cell Biol. 10:4239；Kolberg （1992） J. NIH Res. 4:43，及Cornetta et al. （1991） Hum. Gene. Ther. 2:215）。金絲雀痘病毒載體係感染人類細胞之較佳者，但其天然無法在其中進行複製（亦即，無基因修飾）。

重組病毒載體之基礎建構係技藝中所詳細明瞭者，並涉及使用標準之分子生物學技術，諸如，該等述於，如，Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖：實驗室手冊]（Cold Spring Harbor Press 1989）及其第三版（2001），Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology [分子生物學之當前操作流程]（Wiley Interscience Publishers 1995），及Watson, 上述文獻，以及本文所提及之數種其他參考文獻。舉例而言，腺病毒載體可使用示於，舉例而言，Graham et al., Mol. Biotechnol. 33(3):207-220（1995），美國專利第5,965,358號，Donthine et al., Gene Ther. 7（20）:1707-14 （2000），及本文所述之其他參考文獻之方法而建構及/或純化。腺相關病毒載體可使用示於，舉例而言，美國專利第4,797,368號及Laughlin et al., Gene 23:65-73 （1983）之方法而建構及/或純化。有關其他病毒載體之類似技術係技藝中所已知，特別是有關皰疹病毒載體（參見，如，Lachman et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 1（5）:622-32 （1999））、慢病毒載體及其他逆轉錄病毒載體。一般而言，病毒載體包含核酸之插入（例如，野生型腺病毒載體可包含多達3 KB之插入而無缺失），或者，更一般而言，包含一或多個病毒基因組之缺失，以容納該核酸及其他核酸（如所需）之插入，並預防在宿主細胞中之複製。

非病毒載體，諸如，如，DNA質體、裸核酸及複合傳遞載劑（諸如，脂質體）之核酸亦可連結可使該載體靶向該宿主中特定區域（如，特定之器官、組織及/或細胞類型）之分子。舉例而言，可使核苷酸複合靶向蛋白，諸如可結合受體之病毒蛋白，或是可結合特定目標受體之蛋白（如，藉由修飾Wu et al., J. Biol. Chem. 263（29）:14621-24 （1988）中之技術）。靶向性之陽離子脂質組合物係為已知（參見，如，U.S. 6,120,799）。其他用以靶向基因建構物之技術提供於國際專利申請公開案WO 99/41402。

表現宿主

本發明亦提供經工程處理之宿主細胞，其經本發明之載體（如，選殖載體或表現載體）或本發明之核酸轉導、轉染或轉形。該經工程處理之宿主細胞可在習知之營養培養基中培養，該培養

基經修飾以適用於活化啟動子、選擇轉形株或擴增目標核酸。該培養條件，諸如，溫度、pH及其類似者，係該等先前用於該經選擇以進行表現之宿主細胞者，且將可為熟習技藝者明顯可知，並在本文所引述之參考文獻中明顯可知，其包括，如，Freshney（1994） Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique [動物細胞培養，基礎技術手冊], 3rd ed., Wiley - Liss, New York以及其中所引述之參考文獻。由此等本發明之載體或核酸所編碼之本發明多肽係在此等宿主細胞中表現，並可由標準技術分離。舉例而言，可以超離心或是類似之技術而自培養物中分離釋放至細胞培養物中之多肽。

本發明之多肽可在各種不同之表現宿主中生成，其包括，但不限於，動物細胞，諸如，哺乳動物細胞（如，CHO細胞），包括人類及非人類靈長類細胞，以及在非動物細胞中，諸如，植物、酵母菌、真菌、細菌及其類似者。適當表現宿主之實例包括細菌細胞，諸如，大腸桿菌、鏈黴菌及傷寒沙門氏菌；真菌細胞，諸如，釀酒酵母、畢赤酵母及粉色麵包黴菌；昆蟲細胞，諸如，果蠅及秋行軍蟲；哺乳動物細胞，諸如，CHO （如，CHO-K1）、COS （如，COS-1, COS-7）、BHK及HEK（如，HEK 293）細胞、Bowes黑色素瘤細胞，及植物細胞。如上所註記，本發明並不受到所用之宿主細胞限制。除外Sambrook, Berger and Ausubel, 皆為上述文獻，有關細胞培養之細節尚可見於，如，Payne et al. （1992） Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems [液態系統中之植物細胞及組織培養] John Wiley & Sons, Inc. New York, NY；Gamborg and Phillips （eds.） （1995） Plant Cell, Tissue and Organ Culture [植物細胞、組織及器官培養]；Fundamental Methods Springer Lab Manual [基礎方法 Springer實驗室手冊], Springer-Verlag （Berlin Heidelberg NY）；Atlas & Parks （eds.） The Handbook of Microbiological Media [微生物學培養基手冊]（1993） CRC Press, Boca Raton, FL。使用技藝中所知之流程，此等宿主細胞可經改製以在無血清、無蛋白培養基、無動物組成份培養基中生長，諸如，

如，化學限定（CD）培養基（諸如，如，CD OptiCHO™ （Invitrogen, #12681））。

本發明提供一種細胞，其包含本文所述之任何一或多種本發明之核酸、載體或其他建構物（如，表現突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig之建構物），或是其任何組合。其亦包括一種細胞，其包含本文所述之任何一或多種本發明之多肽、抗體或融合蛋白或其他建構物，或是此等一或多種之任何組合。本發明之細胞一般而言係分離或重組之細胞，且可包含宿主細胞。此種細胞，如，重組細胞，可以至少一種本發明之核酸、載體或其他建構物之轉形、轉染及/或感染而修飾。此種細胞可為真核細胞（如，哺乳動物、酵母菌或植物細胞）或原核細胞（如，細菌細胞），且其可使用各種已知之方法而以任何此種本發明之建構物轉形，其包括，如，磷酸鈣轉染（參見，如，磷酸鈣共沉澱法）、DEAE-葡聚糖中介性轉染、電穿孔（Irving et al., Cell 64:891-901 （1991））、基因或疫苗槍、注射、脂質體轉染及生物彈道，或是其他如上所註記之常用技術。亦參見全球資訊網址inovio.com之Inovio Biomedical Corp.電穿孔方法及技術。

宿主細胞株可視情形因其調控插入序列表現之能力或是以所欲方式加工經表現蛋白之能力而選擇。此等蛋白修飾包括，但不限於，乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化及醯化。不同之宿主細胞，諸如，大腸桿菌、桿菌屬、酵母菌或哺乳動物細胞，諸如，CHO、HeLa、BHK、MDCK、HEK 293、WI38等，具有特定之細胞機械及特徵機制以進行此等後轉譯活動，並可經選擇以確保該引入外源蛋白之正確修飾及加工。

本發明之核酸可插入適當之宿主細胞中（在培養物中或在宿主生物體中），以容許該宿主表現目標蛋白（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）。可以本發明之核酸轉形/轉導任何適當之宿主細胞。適當表現宿主之實例包括：細菌細胞，諸如，大腸桿菌、鏈黴菌、桿菌屬及傷寒沙門氏菌；真菌細胞，諸如，釀酒酵母、畢赤酵母及粉色麵包黴菌；昆蟲細胞，諸如，果蠅及秋行軍蟲；

哺乳動物細胞，諸如，Vero細胞、HeLa細胞、CHO細胞（如，CHO-K1）、COS細胞、WI38細胞、NIH-3T3細胞（以及其他纖維母細胞，諸如，MRC-5細胞）、MDCK細胞、KB細胞、SW-13細胞、MCF7細胞、BHK細胞、HEK-293細胞、Bowes黑色素瘤細胞，及植物細胞等。

本發明亦提供宿主細胞，其經至少一種本發明之核酸或載體轉導、轉形或轉染。如上所討論，本發明之載體一般而言包含本發明之核酸。宿主細胞係經本發明之載體進行基因工程處理（如，轉導、轉形、感染或轉染），該載體可為，如，選殖載體或表現載體。該載體可為質體、病毒顆粒、噬菌體、減毒細菌或任何其他適當類型載體之形式。適用於經本發明之病毒載體轉導及/或感染以製備本發明重組多肽及/或複製本發明病毒載體之宿主細胞包括上述之細胞。已經證實為適於包裝病毒載體顆粒之細胞實例述於，如，Polo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96（8）:4598-603 （1999），Farson et al., J. Gene Med. 1（3）:195-209 （1999），Sheridan et al., Mol. Ther. 2（3）:262-75 （2000），Chen et al., Gene Ther. 8（9）:697-703 （2001），及Pizzaro et al., Gene Ther. 8（10）:737-745（2001）。就複製缺陷型病毒載體而言，諸如，AAV載體，其需要補助細胞系、經輔助病毒轉形之細胞系或是經編碼必要基因之質體轉形之細胞系，以進行該病毒載體之複製。

該等經工程處理之宿主細胞可在習知之營養培養基中培養，該培養基經修飾以適用於活化啟動子、選擇轉形株或擴增目標核酸。宿主細胞可在含血清培養基或無血清培養基中培養。宿主細胞可在無血清、無蛋白、無動物組成份培養基中培養，包括，如，化學限定培養基（如，CD OptiCHO™ （Invitrogen, #12681））。如需要，該細胞培養基可經熟習技藝者所知之添加劑補充，諸如，如，一或多種胺基酸，諸如，L-麩醯胺（如，2% v/v之200 mM L-麩醯胺（Invitrogen, #25031））。該培養條件，諸如，溫度、pH及其類似者，係該等先前用於該經選擇以進行表現之宿主細胞者，且將可為熟習技藝者明顯可知，並在本文所引述之參考文獻中明

顯可知，其包括，如，Animal Cell Technology [動物細胞技術], Rhiel et al., eds., （Kluwer Academic Publishers 1999），Chaubard et al., Genetic Eng. News 20（18）（2000），Hu et al., ASM News 59:65-68（1993），Hu et al., Biotechnol. Prog. 1:209-215（1985），Martin et al., Biotechnol.（1987), Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique [動物細胞培養：基礎技術手冊], 4th ed.,（Wiley, 2000），Mather, Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique [細胞及組織培養介紹：理論及技術],（Plenum Press, 1998），Freshney, Culture of Immortalized Cells [無限增殖化細胞之培養], 3rd ed.,（John Wiley & Sons, 1996），Cell Culture: Essential Techniques [細胞培養：基礎技術], Doyle et al., eds.（John Wiley & Sons 1998），以及General Techniques of Cell Culture [細胞培養之一般性技術], Harrison et al., eds.,（Cambridge Univ. Press 1997）。

該核酸亦可在植物細胞中包含、複製及/或表現。有關植物細胞培養之技術述於，如，Payne et al.（1992） Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems [液態系統中之植物細胞及組織培養] John Wiley & Sons, Inc. New York, NY；Gamborg and Phillips（eds.）（1995） Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods Springer Lab Manual [植物細胞、組織及器官培養：基礎方法Springer實驗室手冊], Springer-Verlag（Berlin Heidelberg New York）；及Plant Molecular Biology [植物分子生物學]（1993） R.R.D. Croy（ed.） Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6。細胞培養基廣泛示於Atlas and Parks（eds.） The Handbook of Microbiological Media [微生物培養基手冊]（1993） CRC Press, Boca Raton, FL。

就重組蛋白之長期、高產率生成而言，可使用穩定之表現系統。舉例而言，可以包含病毒複製起點及/或內源表現元件及選擇標記基因之表現載體轉導穩定表現本發明多肽之細胞系。在引入該載體後，可使該細胞系中之細胞在富集培養基中進行生長1-2天，接著再將其轉換至選擇培養基中。該選擇標記之目的係產生

對於選擇之抗性，而其存在可容許成功表現該引入序列之細胞進行生長及回收。舉例而言，可以適用於該細胞類型之組織培養技術，使經穩定轉形細胞之抗性細胞叢進行增殖。無血清培養基可輕易取得（如，JRH Biosciences、SAFC Biosciences、Sigma-Aldrich Corporation，全球資訊網於 sigmaaldrich.com）。在部分情形下，無血清培養基或條件培養基（如，先前收穫自未經轉染或天然細胞培養物之生長培養基）可為進行蛋白生成或細胞貯存（cell-banking）之較佳者。

本發明包括無限增殖化細胞或細胞系，其包含一或多種本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或多聚體多肽）、複合物、核酸或載體。

經由表現載體及/或聚核苷酸轉形之宿主細胞視情況可在適於表現及自細胞培養物中回收該經編碼蛋白之條件下進行培養。由此種重組細胞所製備之多肽或其片段可為分泌性、膜連結性或包含於胞內者，根據該序列及/或所用之載體而定。包含編碼本發明成熟多肽之聚核苷酸的表現載體可經設計而具信號序列，其可指引該成熟多肽通過原核或真核細胞膜之分泌。此等信號序列一般而言係納入該載體中，以使該信號序列表現於本發明多肽之N-端。有關此等信號序列之原則於本文他處討論。

多肽生成及回收

在轉導適當之宿主株並使該宿主株生長至適當之細胞密度後，可以適當方式（如，溫度變遷或化學誘導）誘發該所選之啟動子，再使細胞培養一段額外期間。細胞一般而言係以離心收集，以物理或化學方法破壞，並保留該所得之粗萃取物以進行進一步之純化。用於表現蛋白之微生物細胞可以任何習知之方法破壞，包括冷凍-解凍循環、超音波處理、機械破壞或是使用細胞裂解劑，或是其他方法，其為熟習技藝者所熟知。

如所註記，可就諸多細胞之培養及製備取得諸多參考文獻，包括細菌、植物、動物（較佳為哺乳動物）及古細菌來源之細胞。

參見，如，Sambrook、Ausubel及Berger （皆為上述文獻），以及Freshney （1994） Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique [動物細胞培養，基礎技術手冊], 第三版, Wiley-Liss, New York以及其中所引述之參考文獻；Doyle and Griffiths （1997） Mammalian Cell Culture: Essential Techniques [哺乳動物細胞培養：必要技術], John Wiley and Sons, NY；Humason （1979） Animal Tissue Techniques [動物組織技術], 第四版, W.H. Freeman and Company；及Ricciardelli, et al., （1989） In vitro Cell Dev. Biol. 25:1016 1024。針對植物細胞之培養及再生，Payne et al. （1992） Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems [液態系統中之植物細胞及組織培養], John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.；Gamborg and Phillips （eds.） （1995） Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual [植物細胞、組織及器官培養：基礎方法Springer實驗室手冊], Springer-Verlag （Berlin Heidelberg New York）；及Plant Molecular Biology [植物分子生物學] （1993） R. R. D. Croy, Ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6。細胞培養基廣泛示於Atlas and Parks （eds.） The Handbook of Microbiological Media [微生物培養基手冊] （1993） CRC Press, Boca Raton, Fla。有關係胞培養之其他資訊可見於可得之商業文獻，諸如，取自Sigma-Aldrich, Inc. （St. Louis, Mo.）之Life Science Research Cell Culture Catalogue [Life Science Research 細胞培養物目錄] （1998） ("Sigma-LSRCCC")，以及，如，亦取自Sigma-Aldrich, Inc （St. Louis, Mo.）之Plant Culture Catalogue and supplement [植物培養物目錄及增刊] （1997） ("Sigma-PCCS")。

本發明之多肽可以諸多技藝中所熟知方法中之任一者而自重組細胞培養物中回收及純化，包括硫酸銨或乙醇沈澱、酸萃取、陰離子或陽離子交換層析、磷酸纖維素層析、疏水作用層析、親和層析（如，使用任何本文所註記之標記系統）、羥基磷灰石層析及卵磷脂層析。如需要，可使用蛋白再折疊步驟，以完成該成熟

蛋白之構形。最後，可在該等終純化步驟中使用高效液相層析（HPLC）。除上文所註記之參考文獻之外，各種純化方法皆為技藝中所熟知，包括，如，該等示於Sandana （1997） Bioseparation of Proteins [蛋白之生物分離], Academic Press, Inc.；及Bollag et al. （1996） Protein Methods [蛋白方法], 2.sup.nd Edition Wiley-Liss, NY；Walker （1996） The Protein Protocols Handbook [蛋白操作流程手冊] Humana Press, NJ；Harris and Angal （1990） Protein Purification Applications: A Practical Approach [蛋白純化應用：實用方法] IRL Press at Oxford, Oxford, England；Harris and Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach [蛋白純化方法：實用方法] IRL Press at Oxford, Oxford, England；Scopes （1993） Protein Purification: Principles and Practice [蛋白純化：原則及實施] 3.sup.rd Edition Springer Verlag, NY；Janson and Ryden （1998） Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications [蛋白純化：原則，高解析度方法及應用], 第二版 Wiley-VCH, NY；以及Walker （1998） Protein Protocols on CD-ROM [光碟版蛋白操作流程] Humana Press, NJ中者。

熟習技藝者將可明瞭，本發明之融合蛋白（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）可以各種本文所述之方法製備，包括，如，該等述於實例1中以製備LEA29Y-Ig者。舉例而言，可以編碼本發明突變CTLA-4 ECD多肽（如，D3-54多肽）之核酸序列取代LEA29Y-編碼核酸而選殖進入該IgG2 Fc融合載體中，以產生編碼該突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-54-IgG2）之載體，表現此種突變CTLA-4-Ig融合蛋白之穩定CHO-K1細胞可藉著以該突變CTLA-4-Ig融合蛋白編碼載體轉染此等細胞而製備，而所得之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-54-IgG2）可如實例1所述進行表現（一般而言係為二聚體形式）及純化。

活體外之表現系統

可使用無細胞之轉錄/轉譯系統而使用本發明之DNAs及/或

RNAs製備本發明之重組多肽或其片段。數種此等系統係市售可購得者。有關活體外之轉錄及轉譯操作流程之廣泛指引可見於Tymms （1995） In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology [活體外之轉錄及轉譯操作流程：分子生物學方法], Volume 37, Garland Publishing, New York。

本發明之方法

本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白及多聚體多肽）、複合物、組合物、核酸、載體及細胞具有各種特性及特徵，且咸信可用於各種應用中，其包括，但不限於，如，用以治療其中免疫系統及免疫系統反應之調節或調控可具有效益之免疫系統疾病、病症及病況的預防性或治療性方法。舉例而言，咸信具有結合CD80及/或CD86或其任一或兩者之ECD之能力以及/或是抑制免疫反應之能力的本發明多肽、複合物、組合物、核酸、載體及細胞可用於用以抑制或壓抑對象體內免疫反應之預防及/或治療方法、用以抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞或器官移植之排斥的方法、以及其他本文他處所述之方法。部分此等本發明之多肽、複合物、組合物、核酸、載體及細胞預期可用於調節或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間作用之方法。

在一態樣中，本發明之治療或預防方法涉及對一對象投與有效量之至少一種此種多肽（包括，如，融合蛋白、多聚體等）、複合物、組合物、核酸、載體及/或細胞，以壓抑或抑制免疫反應。在治療性之內容中，該對象一般而言係罹患免疫系統疾病、病症或病況者，且該投與係進行以預防該疾病、病症或病況之進一步進展。舉例而言，對於罹患免疫系統疾病（如，自體免疫疾病）之對象投與本發明之分子可造成壓抑或抑制此種免疫系統攻擊或是與其相關之生物反應。藉由壓抑此種對於健康體組織之免疫系統攻擊，該等由此種對於健康組織之攻擊所造成或是與其相關之所得身體症狀（如，疼痛、關節炎、關節腫脹或壓痛）可獲得減少或減輕，且由該免疫系統攻擊所造成或是與其相關之生物及身

體損傷可獲得減少、延緩或中止。

在預防性之內容中，該對象可為罹患、易罹患或是咸信具有免疫系統疾病、病症或病況者，且該投與一般而言係進行以預防該疾病、病症或病況之進展、抑制或減輕與其相關之症狀、徵兆或生物反應、預防潛在由其產生之身體損傷及/或維持或改良該對象之身體機能。

在一態樣中，本發明提供一種調節表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間作用之方法，該方法包含使B7-陽性細胞與有效量之下列至少一者接觸，以調節B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞間之作用：(1) 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；(2) 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；(3) 包含至少一種本發明多肽之複合物；(4) 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；(5) 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；(6) 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或 (7) 本發明之組合物，其中B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞間之作用受到調節。一般而言，該調節作用係一種抑制作用，以使B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞間之作用受到抑制。在部分情形下，該等B7-陽性細胞係抗原呈遞細胞（APCs）。在部分此等方法中，其抑制B7-2-陽性細胞（如，表現B7-2 （CD86）之APCs）與CD28-陽性T細胞間之作用。在部分此等方法中，其抑制B7-1-陽性細胞（如，表現B7-1 （CD80）之APCs）與CD28-陽性T細胞間之作用。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞間作用之方法，該方法包含使B7-陽性細胞（如，B7-1-陽性細胞及/或B7-2-陽性細胞）與有效量之至少一種下列之本發明分子或組成份接觸，以抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞間之作用：(1) 本發

明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，其中CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞間之作用受到抑制。在部分情形下，該等B7-陽性細胞係APCs。在部分此等情形下，其抑制CD28-陽性T細胞與hB7-1-陽性細胞及/或hB7-2-陽性細胞間之作用。在部分此等方法中，CD28-陽性T細胞與hB7-1-陽性細胞及/或hB7-2-陽性細胞間作用之抑制造成下列一或多者之壓抑或抑制：T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成（如，TNF-α、IFN-γ、IL-2之生成）、各種活化標記（如，CD25、IL-2受體）之誘發、發炎、關節腫脹或壓痛、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。

在部分此等方法中，其係對一對象投與有效量之至少一種此等本發明之分子或組成份，以在該對象體內抑制內源性CD28-陽性T細胞與內源性B7-1-陽性細胞及/或B7-2-陽性細胞間之作用。在部分此等方法中，其抑制內源性CD28-陽性T細胞與表現B7-2（CD86）或B7-1 （CD80）之B7-陽性細胞。在部分情形下，該B7-陽性細胞係表現B7-2或B7-1之APCs，且其抑制B7-2或B7-1與CD28-陽性T細胞間之作用。在部分情形下，其亦製表限於APCs上之B7-2及B7-1兩者與CD28-陽性T細胞間之作用。

在另一態樣中，本發明提供一種在活體外或活體內抑制免疫反應之方法。該方法包含使B7-陽性細胞與有效量之至少一種下列之本發明分子或組成份接觸，以抑制免疫反應：（1） 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚

體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，其中免疫反應因而受到抑制。其可抑制一或多種免疫反應，包括，如，T細胞反應、T細胞之增殖或活化、細胞因子之合成或生成、發炎、關節腫脹或壓痛、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。在該等包含使B7-陽性細胞與與本發明多肽接觸之方法中，該多肽可結合表現於B7-陽性細胞上之B7-1（如，人類B7-1），以及/或是結合表現於B7-陽性細胞上之B7-2（如，人類B7-2）。在部分情形下，該等B7-陽性細胞係APCs。在部分情形下，免疫反應係在試管中受到抑制，諸如，如，在活體外之分析中，包括該等於本文他處詳述者（參見，如，下文之實例）。在部分情形下，免疫反應係在對其投與有效量以抑制免疫反應之對象體內於活體中受到抑制，諸如，如，在治療性或預防性之治療方法中（如，治療關節疾病，諸如，類風濕性關節炎，或是其他免疫疾病之方法），其於本文他處詳述。

在另一態樣中，本發明提供一種在對象體內（如，哺乳動物，諸如，人類）抑制免疫反應之方法。該方法包含對需要該抑制之對象投與可在該對象體內抑制免疫反應之治療或預防有效量（如，治療或預防有效劑量）之至少一種下列之本發明分子或組成份：（1） 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，其中該對象體內之免疫反應因而受到抑制。

在另一態樣中，本發明提供一種治療具有免疫系統疾病或病

症之對象的方法，該疾病或病症係由內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞間的作用而調控。該方法包含對需要此種治療之對象投與治療有效量之：（1） 本發明之多肽（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）；（2） 包含一或多個本發明多肽之多聚體（如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體）；（3） 包含至少一種本發明多肽之複合物；（4） 本發明之核酸（如，編碼本發明多肽之核酸）；（5） 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；（6） 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或（7） 本發明之組合物，因而治療該對象體內之免疫系統疾病或病症。如該對象係人類，CD80係人類CD80、CD86係人類CD86、而CD28係人類CD28。在部分此等方法中，其抑制表現CD28之內源性T細胞與表現CD86之內源性細胞及/或表現CD80之內源性細胞間的作用。

咸信各種免疫系統疾病或病症，包括關節或自體免疫系統之疾病或病症，皆可使用本文所揭示之一或多種本發明之分子而有效治療，諸如，突變CTLA-4 ECD多肽（如，SEQ ID NOS:1-73中之任一者，諸如，如，D3-54 （SEQ ID NO:36）、D3-69 （SEQ ID NO:50）或D3-27 （SEQ ID NO:24）突變CTLA-4 ECD），或是其融合蛋白（如，D3-54-IgG2 （SEQ ID NO:197或211）、D3-69-IgG2 （SEQ ID NO:199或213）、D3-29-IgG2 （SEQ ID NO:79或210））。該免疫系統之疾病或病症可為或是涉及，如，但不限於，愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、伯格氏症（Berger's Disease）、

大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿

病、第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應。移植物相關性疾病或病症包括移植物對抗宿主疾病（GVDH），諸如，與骨髓移植相關者，以及由與對於器官、組織或細胞移植物之移植（如，組織或細胞同種移植物或異種移植物，包括，如，皮膚、肌肉、神經元、胰島、器官、肝實質細胞等之移植物）的排斥造成或是與其相關之免疫病症。關於接受者對象體內之捐贈者組織、細胞、移植物或實體器官之移植而言，咸信本文所揭示之此等本發明分子（如，突變CTLA-4-ECD多肽或是突變CTLA-4-Ig融合蛋白）可有效預防此種移植在接受者體內之急性排斥，及/或就長期之維持治療而言可預防此種移植在接受者體內之排斥（如，抑制來自捐贈者之胰島素生產性胰島細胞移植在罹患糖尿病之對象接受者體內的排斥）。

本發明包括任何此等本發明之突變CTLA-4-ECD多肽或是突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其用於抑制與至少一種上述之免疫系統疾病或病症相關之免疫反應。其亦提供任何此等本發明之突變CTLA-4-ECD多肽或是突變CTLA-4-Ig融合蛋白於製備用以抑制與至少一種上述免疫系統疾病或病症相關之免疫反應之藥物的用途。

於本文所述之方法中，本發明之分子，諸如，如，突變CTLA-4-ECD多肽（如，D3-54、D3-69、D3-29、D3-56、D3-75）或是包含本發明突變CTLA-4-ECD多肽之Ig融合蛋白（分別如，D3-54-IgG2、D3-69-IgG2、D3-29-IgG2、D3-56-IgG2、D3-75-IgG2），用以在對象體內抑制免疫反應或是治療由該對象體內內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症的有效量可包含自約0.0001微克每公斤（mg/kg）該對象體重至約200微克每公斤（mg/kg）該對象體重，諸如，如，自約0.001微克每公斤（mg/kg）該對象體重至約100微克每公斤（mg/kg）該對象體重，或是，如，自約0.001 mg/kg 該對象體重

至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50或75 mg/kg該對象體重。其可在該對象體內抑制一或多種免疫反應，包括，如，T細胞反應、T細胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成(如，TNF-α、IFN-γ、IL-2等之生成)、各種活化標記（如，CD25、IL-2受體等）之誘發、炎性分子之合成或生成、發炎、關節腫脹、關節壓痛、疼痛、僵硬、C-反應性蛋白之血清含量、抗膠原抗體生成及/或T細胞相關性抗體反應。用以抑制免疫反應之本發明分子或組成份的有效量可為可以可偵測之量測量而抑制免疫反應或其症狀或徵兆的量。該免疫反應可經部份或完全抑制。用以治療免疫系統疾病或病症之有效量可為可舒緩、減少或減輕至少一種與該疾病或病症相關之症狀或生物反應或作用、預防該疾病或病症之進展或改善該對象之身體機能的量。

用以調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間反應的本發明分子或組成份之有效量可為可分別調控或抑制B7-陽性細胞與CD28-陽性及/或CTLA-4-陽性T細胞間結合之量。此（等）結合作用可經部份或完全之調控或抑制。

在部分此等方法中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體係以足以抑制免疫反應、治療由T細胞與B7-表現性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症或是調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間之反應的治療或預防有效量（或劑量）而對該對象進行投與。該經投與之融合蛋白二聚體一般而言係可溶性Ig融合蛋白二聚體。在部分此等方法中，本發明融合蛋白二聚體之有效量或劑量包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至約200毫克每公斤（mg/kg）該對象（諸如，如，人類）體重，或是自約0.001 mg/kg至約300 mg/kg該對象體重。舉例而言，該融合蛋白二聚體之有效量或劑量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、25、30、40、50、60、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250或300 mg/kg該對象

（諸如，如，人類，包括成人）體重。在部分情形下，該有效量或劑量係自約0.001毫克（mg）至約50毫克每公斤（kg）該對象體重，其包括，但不限於，對該對象投與自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg該對象（如，人類）體重，自約0.01 mg/kg至約50 mg/kg該對象體重，或是自約0.01 mg/kg至約25 mg/kg該對象體重；例如，約0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg、約10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg或100 mg/kg該對象（如，成人病患）體重。在部分情形下，該融合蛋白二聚體之有效量或劑量係自約2至10 mg/kg、約3至10 mg/kg、約3至5 mg/kg、約5至10 mg/kg、0.1至5 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至3 mg/kg、約0.05至2.0 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.1至2.0 mg/kg、約0.1至3.0 mg/kg、約0.1至0.5 mg/kg、約0.1至0.8 mg/kg、約0.1至0.6 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.1 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約1 mg/kg、約0.01至約5 mg/kg、約0.01 mg/kg至約3 mg/kg、約0.05 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.1 mg/kg至約1 mg/kg、約0.1 mg/kg至約5 mg/kg、約0.2至1 mg/kg、約0.2至0.6 mg/kg、約0.2至0.5 mg/kg 約0.3至1 mg/kg、約0.3至0.6 mg/kg、約0.3至0.5 mg/kg對象體重。在部分情形下，該有效量或劑量對於體重小於60 kg之對象而言係小於約500 mg（如，小於約100 mg、75 mg、50 mg、25 mg、12.5 mg或10 mg），對於體重介於60-100 kg之對象而言係小於約750 mg（如，小於約150 mg、100 mg、75 mg、37.5 mg或20 mg），或是對於體重超過100 kg之對象而言係小於約1000 mg（如，小於約500 mg、100 mg、50 mg、25 mg或10 mg）。

在另一態樣中，在部分此等本發明之方法中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白係以，如，足以抑制免疫反應、治療由T細胞與B7-表現性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症或是調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間之反應的

治療或預防有效量（或劑量）而對該對象進行投與。該融合蛋白（其通常係可溶性融合蛋白）之有效量或劑量可包含自約0.001 mg/kg至約300 mg/kg、約0.001 mg/kg至約200 mg/kg或約0.001 mg/kg至約300 mg/kg該對象（如，人類）體重。在一態樣中，該融合蛋白之有效量或劑量包含自約0.001 mg/kg至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、25、30、40、50、60、75、80、90、100、125、150、175、200、225、250或300 mg/kg該對象體重。在另一態樣中，該有效量或劑量係自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg、自約0.01 mg/kg至約50 mg/kg或自約0.01 mg/kg至約25 mg/kg該對象體重。例示性之劑量或量包括約0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg、約10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg及100 mg/kg該對象（如，成人）體重。在另一態樣中，該融合蛋白之有效量或劑量係自約2至10 mg/kg、約3至10 mg/kg、約3至5 mg/kg、約5至10 mg/kg、0.1至5 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至3 mg/kg、約0.05至2.0 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.1至2.0 mg/kg、約0.1至3.0 mg/kg、約0.1至0.5 mg/kg、約0.1至0.8 mg/kg、約0.1至0.6 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.1 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.05 mg/kg、約0.01 mg/kg至約1 mg/kg、約0.01至約5 mg/kg、約0.01 mg/kg至約3 mg/kg、約0.05 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.1 mg/kg至約1 mg/kg、約0.1 mg/kg至約5 mg/kg、約0.2至1 mg/kg、約0.2至0.6 mg/kg、約0.2至0.5 mg/kg 約0.3至1 mg/kg、約0.3至0.6 mg/kg、約0.3至0.5 mg/kg對象體重。在部分態樣中，該有效量或劑量對於體重小於60 kg之對象而言係小於約500 mg（如，小於約100 mg、75 mg、50 mg、25 mg、12.5 mg或10 mg），對於體重介於60-100 kg之對象而言係小於約750 mg（如，小於約150 mg、100 mg、75 mg、37.5 mg或20 mg），或是對於體重超過100 kg之對象而言係小於約1000 mg（如，小於約500 mg、100 mg、50 mg、25

mg或10 mg）。

足以類似抑制免疫反應或是調控、治療由T細胞與B7-表現性細胞間之作用調控之免疫系統疾病或病症或是調控或抑制表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞間之反應的本發明核酸、載體、組合物及/或細胞之有效量可經判定。舉例而言，如欲將編碼此種本發明融合蛋白二聚體之載體投與至該對象，熟習技藝者可輕易判定該待投與之載體量，以使所欲之治療或預防有效量的該融合蛋白二聚體可能在該對象體內產生。

例示性之本發明融合蛋白二聚體包括任何該等述於上文及本文中者，其包括，如，包含兩個相同融合蛋白單體之融合蛋白二聚體，其中各個融合蛋白單體包含一本發明之突變CTLA-4-ECD多肽，以其C-端融合Ig Fc多肽（如，IgG2 Fc、IgG1 Fc、IgG4 Fc或是可降低效應功能之突變IgG Fc多肽）之N-端。例示性之突變CTLA-4-ECD多肽係包含選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列者。其中一種例示性之融合蛋白二具體細胞含兩個融合蛋白單體者，其中各個融合蛋白單體包含選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群的多肽序列。一般而言，該二聚體融合蛋白中之兩個單體融合蛋白係經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體中之半胱胺酸殘基間形成。

在任何上述之方法中，本發明之分子或組成份（如，本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或是多肽多聚體）、複合物、核酸、載體、組合物及/或細胞）可以組合物之形式對該對象進行投與。該組合物一般而言包含至少一種此等分子或組成份，以及賦形劑、載體或稀釋劑。該組合物可包含醫藥組合物，其包含至少一種此等分子或組成份，以及醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑（如，PBS）。本發明組合物之pH一般而言係介於自約pH 6.0至約pH 9.0，包括，如，自約pH 6.5至約pH 8.5，通常自約pH 7.0至約pH 8.0之間。在一態樣中，本發明組合物之pH一般而言係介於自約pH 3至約pH 10、自約pH 4至約pH 10、自約pH 5至

約pH 9、自約pH 6至約pH 9、自約pH 5.5至約pH 8.5、自約pH 6.0至約pH 6.7、自約pH 6.0至約pH 6.5、自約pH 6.2至約pH 8.7、自約pH 6.5至約pH 7.5、自約pH 6.2至約pH 7.0、自約pH 6.3至約pH 6.8、自約pH 6.4至約pH 6.8及約pH 7.0至約pH 7.4之間。在一態樣中，包含至少一種此等本發明之分子或組成份（諸如，如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）之組合物具有pH 5.5、pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4、pH 6.5、pH 6.6、pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9、pH 8.0、pH 8.1、pH 8.2、pH 8.3、pH 8.4、pH 8.5、pH 8.6、pH 8.7、pH 8.8、pH 8.9、pH 9.0、pH 9.1、pH 9.2、pH 9.3、pH 9.4、pH 9.5、pH 9.6、pH 9.7、pH 9.8、pH、9.9或pH 10.0之pH值。部分本發明之組合物包括一或多種鹽類（如，氯化鈉、磷酸鈉、氯化鈣及其類似者）、一或多種緩衝劑（如，HEPES、檸檬酸鈉、磷酸鈉（如，Na_2HPO_4/Na_3PO_4）、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、醋酸鹽、三（羥甲基）胺基甲烷（Tris）及其類似者）、一、二、三、四、五個或以上之醣類或糖類（如，蔗糖、甘露糖、麥芽糖、海藻糖、葡萄糖及其類似者）、以及/或是一、二、三、四個或以上之多元醇或糖醇（如，甘露糖醇、山梨糖醇、乙二醇、甘油、阿拉伯糖醇、赤藻糖醇、木糖醇、核糖醇、乳糖醇及其類似者）。可將一、二、三、四、五個或以上之單醣、雙醣及/或多醣包括於該組合物中。本發明之組合物可包含在對該對象進行投與時可有效抑制免疫反應之任何濃度的此種分子或組合物。舉例而言，在部分此等方法中（包括，如，其中需要免疫抑制之方法，諸如，但不限於，如，類風濕性關節炎或類似免疫病症之治療，或是用以抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或器官移植之排斥者），其係將包含醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑以及本發明之融合蛋白二聚體的醫藥組合物對該對象進行投與（如，經腸外、皮下、靜脈內、肌內等），其中該醫藥組合物包含本發明之融合蛋白二聚體，其濃度係自約0.001 mg/ml至約200 mg/ml、約0.001 mg/ml至約300

mg/ml、約0.01 mg/ml至約200 mg/ml、約0.01 mg/ml至約250 mg/ml、約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約0.001 mg/ml至約100 mg/ml、約0.001 mg/ml至約90 mg/ml、約0.01 mg/ml至約90 mg/ml、約0.01 mg/ml至約75 mg/ml、約0.1至約80 mg/ml、約0.1至約75 mg/ml、約0.1至約60 mg/ml、約0.1至約50 mg/ml、約0.1至約40 mg/ml、約0.1至約30 mg/ml、約1至約90 mg/ml、約1至約80 mg/ml、約1至約75 mg/ml、約1至約60 mg/ml、約1至約50 mg/ml、約1至約40 mg/ml、約1至約30 mg/ml、約1至約20 mg/ml、約1至約10 mg/ml、約1至約5 mg/ml、約5至約90 mg/ml、約5至約80 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約5至約60 mg/ml、約5至約50 mg/ml、約5至約40 mg/ml、約5至約30 mg/ml、約5至約20 mg/ml、約5至約10 mg/ml、約1至約5 mg/ml、約10至約75 mg/ml、約25 mg/ml至約75 mg/ml、約30 mg/ml至約60 mg/ml、約25至約50 mg/ml、約50 mg/ml至約100 mg/ml，其包括，如，約1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、約15 mg/ml、約25 mg/ml、約30 mg/ml、約40 mg/ml、約50 mg/ml、約60 mg/ml、約70 mg/ml、約80 mg/ml、約90 mg/ml或100 mg/ml。其他濃度亦可預期。在部分本文所述之本發明方法中，包括部分之治療或預防方法，其可經由單一之i.v.、s.c.、i.m.或i.p.注射而將介於約0.01毫升（ml）至約10 ml、約0.01 ml至約5 ml、約0.1 ml至約5 ml、約0.5 ml至約2ml、約1 ml至約2 ml之間之體積，其包括，如，0.01 ml、0.025 ml、0.05 ml、0.1ml、0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml、0.5 ml、0.75 ml、1 ml、2ml、3ml、4 ml、5 ml、10 ml、20ml、25 ml、50 ml、75 ml、100 ml、200 ml、250 ml、300 ml、500 ml、1000 ml等之體積的任何此種包含本發明融合蛋白之組合物（如，醫藥組合物）對該對象進行投與。關於本發明例示性組合物之進一步細節於本文他處討論。

對一特定對象進行投與之本發明分子的有效量或劑量可根據，如，該待治療之疾病、病症或病況、該待投與特定本發明突變CTLA-4分子之強度（亦即，其功效）（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體）、該分子之投藥模式、以及該對象耐

受特定量之該特定分子的個別能力而各異。舉例而言，在一種用以在罹患類風濕性關節炎（RA）之對象體內抑制免疫反應之方法中，或是一種用以治療RA之方法中，待對該對象投與之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體（如，D3-29-IGg2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2、D3-75-IgG2等）的有效量或劑量可根據各種因子而判定，包括該突變CTLA-4-Ig二聚體之強度、該二聚體之投藥模式及/或該對象類風濕性關節炎症狀或徵兆之嚴重性。在一態樣中，本發明特定突變CTLA-4-Ig二聚體之有效量或劑量可藉著比較此種突變CTLA-4-Ig二聚體之強度與Orencia®二聚體之強度而判定。可有效治療類風濕性關節炎及相關病症之Orencia®二聚體劑量係為技藝中所已知。舉例而言，Orencia®二聚體一般而言係以約10 mg Orencia®每公斤（kg）人類體重之劑量，經由靜脈內而對罹患類風濕性關節炎之人類投與。相較Orencia®約為「X」倍較強之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較該Orencia®二聚體劑量約為「X」倍較小之劑量而對罹患類風濕性關節炎之人類投與（如，經靜脈內、皮下或以其他本文所述之方式），以達成約相當於該Orencia®二聚體之治療作用（如，抑制免疫反應）。如需要較大之治療作用，可輕易判定比例增加之該突變CTLA-4-Ig二聚體之量或劑量，並對該人類進行投與。

在任何本文所述之該等方法中，本發明之分子或組成份（如，本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或是多肽多聚體）、複合物、核酸、載體、組合物及/或細胞）可經腸外、皮下或靜脈內，或是如本文他處所述進行投與。本發明之分子或組成份可以治療有效之量而每週、每雙週（每兩週）或每雙月（每兩個月）各一、二、三或四次進行投與。投與可持續1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個月或更長（如，一、二、三或四年或以上，包括該對象之一生）之週期。

任何本文所述之方法可進一步包含對該對象投與有效量之至少一種其他之治療性或免疫抑制性試劑或化合物。因此，舉例而言，本發明提供一種抑制免疫反應之方法，其包含對須要該方法

之對象投與（1） 有效量之至少一種第一免疫抑制劑，其中各個此種第一免疫抑制劑係本發明之多肽、核酸、載體、組合物及/或細胞，以及（2） 有效量之至少一種第二免疫抑制劑，其中該對象體內之免疫反應受到抑制。

各種其他之治療性或免疫抑制性試劑（其並非本發明之分子）皆可結合本發明之分子（如，本發明之多肽、核酸、載體、組合物及/或細胞）而使用或投與。此等試劑包括，如，疾病修飾性抗風溼藥物（DMARD） （諸如，如，胺甲蝶呤（MTX）、細胞因子拮抗劑（如，IL-2或IL-6拮抗劑）、類固醇化合物（如，皮質類固醇，糖皮質類固醇，如，強體松（prednisone）或甲基強體松）、非類固醇化合物、水楊酸鈉或鎂、伊布洛芬（ibuprofen）、乙醯水楊酸、乙醯胺苯酚、抗體、可阻斷抗炎細胞因子生成之生物劑、Raptiva® 依法利珠（efalizumab）、抗炎試劑或化合物及非類固醇抗炎藥物（NSAID）。此種其他之治療性或免疫抑制性試劑可在包含該其他試劑以及醫藥可接受性賦形劑或載體之醫藥組合物中對該對象進行投與。該待投與試劑之有藥量或劑量將取決於該特定試劑。部分此等試劑係目前用於免疫抑制療法中者，且適當之劑量可根據該待治療之疾病、病症或病況以及該對象耐受特定量或劑量之能力而決定。上述並非本發明分子之免疫抑制劑之例示性劑量係為已知。該並非本發明分子之其他免疫抑制劑可與本發明分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）之投與同時或是在其之前或之後進行投與。

治療之療程，包括，如，劑量、投藥時程、投藥方法（如，靜脈注射、皮下注射等）及包含至少一種此等本發明之分子或組成份的醫藥組合物，可根據該待治療之疾病、病症或病況而各異。可對一對象投與一或多種此等本發明之分子或組成份；各個此等分子或組成份並不需要在相同之醫藥調配物中、藉由相同之投藥方法、以相同之量或是藉由相同之投劑頻率時程而進行投與。

在部分此等方法中，舉例而言，可將約1 ml之包含醫藥可接受性賦形劑、載體或稀釋劑以及約50 mg/ml濃度之本發明融合蛋白

二聚體之醫藥組合物，經由皮下對需要免疫抑制之對象（如，成人）（如，罹患類風濕性關節炎之對象）進行投與。此種起始劑量係50 mg之融合蛋白二聚體。對於具有100 kg體重之對象而言，此起始劑量相當於每公斤該對象體重之0.5 mg融合蛋白二聚體。在該第一劑後一或兩週，經由皮下投與第二相同之量。視需要而每週、每雙週或一個月一次或是以更高或更低頻率經由皮下投與額外劑量。此等組合物及投藥形式咸信可用於，例如，治療罹患類風濕性關節炎或是其中需要免疫抑制之另一免疫病症，或是抑制人類接受者對於來自人類捐贈者之組織、細胞、移植物或器官移植之排斥。

治療類風濕性關節炎之方法

類風濕性關節炎係最常見之全身性炎性自體免疫疾病之一，且其估計影響1-2%之成人族群。參見，如，Dipiro, J.T., 類風濕性關節炎，於Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach [藥物治療：病生理學方法], 1671-1682 （Talbert, R.T. et al. eds., McGraw-Hill, New York, 6th ed. 2005）。該疾病之特徵為滑液膜之增生及炎性細胞之浸潤，包括活化之T細胞。活化之T細胞在類風濕性關節炎之進程中，藉由刺激各種細胞類型產生促炎性細胞因子（諸如，IL-1、IL-6及TNF-α）、自體抗體及基質金屬蛋白酶而扮演關鍵角色（Hoffman, R.W., Front. Biosci. 6:1369-1378 （2001）; Choy, E.K. et al., N. Engl. J. Med 344:907-916 （2001））。T細胞對於類風濕性關節炎之進程的強力貢獻使得T細胞之活化成為治療干預之合理目標。此等炎性分子咸信可造成與類風濕性關節炎相關之發炎反應、組織損傷（如，關節損傷）及疼痛。

藉由CD28受體與CD80及/或CD86配位體間之作用而中介之T細胞共刺激作用對於大部分T細胞之活化而言具有必要性（Riley, J.L. et al., Blood 105:13-21 （2005））。可拮抗該CD80/CD86 – CD28共刺激途徑之治療性或預防性試劑，諸如，Orencia® （阿巴西普（Abatacept））融合蛋白（其係一可溶性二聚體hCTLA-4-Ig融合蛋

白）已經顯示可臨床有效治療類風濕性關節炎（Kremer, J.M. et al., Ann. Intern. Med. 144:865-876 （2006）; Genovese, M.C. et al., N. Engl. J. Med. 353:1114-1123 （2005））。咸信阿巴西普在以治療或預防有效量而對一對象（如，成人）進行活體內之投藥時，可藉由結合抗原呈遞細胞上之CD80及/或CD86配位體而產生免疫抑制功能，因而預防此等配位體之任一或兩者與T細胞上之CD28受體作用。

目前阿巴西普已經核准用於治療具有中度至嚴重活性RA之成人病患，該等病患係對一或多種DMARDs （諸如，胺甲蝶呤）或TNF拮抗劑具有不適當之反應者。阿巴西普係以靜脈內之輸液，以10 mg/kg該對象體重之劑量對成人RA病患進行投藥。在該第一劑之後，分別在該第一劑後之二及四週時，投與10 mg/kg該融合蛋白之第二及第三劑。每四週（亦即，每個月一次）投與後續之劑量。阿巴西普之靜脈內輸液咸信為傳遞欲在類風濕性關節炎之治療中取得所欲功效所需之高劑量所必須者。

其他類風濕性關節炎之當前療法包括投藥非專一性免疫抑制劑（諸如，胺甲蝶呤），以及類固醇及非類固醇抗炎藥物。此外，亦已核准可靶向特定促炎細胞因子之生物試劑，諸如，TNF-α（如，Remicade® 英夫利西單抗（infliximab）、Enbrel® 益賽普（entanercept）、Humira® 阿達木單抗（adalimumab））及IL-1（如，Kineret® 阿那白滯素（anakinra））。然而，諸多此等法具有顯著之作用—其部分具毒性—特別係在長期投藥時。

盡管具有各種療法，RA之治療仍有顯著未達成之需求。舉例而言，60%具有失敗之先前DMARD治療之人類RA病患及80%具有失敗之先前抗-TNF治療之人類RA病患，在以Orencia治療6個月後，仍未達成ACR50分值（Kremer J.M. et al., Ann. Intern. Med. 144:865-876 （2006）; Genovese, M.C. et al., N. Engl. J. Med. 353:1114-11 （2005））。使用阿巴西普及貝拉西普（LEA29Y-Ig）融合蛋白於成人RA治療中之劑量反應實驗指出，該功效係劑量相關性者，且在最高試驗劑量下仍未飽和（Kremer, J.M. et al., N.

Engl. J. Med. 349:1907-1915（2003）；Moreland, L.W. et al., Arthrit. Rheum. 46:1470-1479 （2002））。

對於hCD80及/或hCD86之結合性高於阿巴西普之本發明可溶性二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白預期在對患有RA之病患投藥時可產生大於阿巴西普之較強免疫抑制作用。此種突變CTLA-4-Ig可以低於阿巴西普之較低濃度結合類似數目之CD80及/或CD86配位體。

分別具有較高之CD80或CD86結合性以及較慢之CD80或CD86解離速率的突變CTLA-4-Ig在此等配位體上具有較長之停留時間。此種較長之停留時間預期可與活體內之較高功效相關。咸信此種突變CTLA-4-Ig可以低於阿巴西普之劑量而對患有RA之對象有效進行治療性或預防性之治療。亦即，咸信此種突變CTLA-4-Ig在以低於10 mg/kg該對象體重阿巴西普劑量之劑量而對該RA對象投藥時，其可達成相當於阿巴西普之功效程度。本發明提供可溶性之二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其具有對於hCD80及/或hCD86之各異結合性。對於hCD86具有實質上高於阿巴西普之結合性的可溶性二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白在以實質上小於阿巴西普之劑量而對該RA對象投藥時，其可達成相當於阿巴西普之功效程度。較低劑量此種突變CTLA-4-Ig之投與可容許使用較目前用以投藥阿巴西普者（靜脈注射）更為便利之投藥方法（如，皮下注射）。

亦咸信，較阿巴西普或貝拉西普融合蛋白具有較高免疫抑制強度之本發明可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白將可在RA病患之治療中取得較高程度之功效。更具免疫抑制性之突變CTLA-4-Ig預期可較阿巴西普更為有效的減輕與RA相關之症狀，並抑制RA有害身體作用之進展。此種突變CTLA-4-Ig可以介於約0.1 – 200 mg/ml之濃度而調配在醫藥可接受之稀釋劑、賦形劑或載體（如，PBS）中。RA對象之治療可藉著以適當判定之投劑頻率（如，起始投劑接續每個月2至4次之一劑、每個月一劑或每兩個月一劑），以皮下注射或靜脈輸液，對該對象投與治療或預防有效量（劑量）之突變

CTLA-4-Ig而完成。該投劑將取決於該對象疾病或症狀之嚴重性。舉例而言，其可投與不超過約10 mg/kg （包括，如，歐1 mg/kg、0.5 mg/kg、0.25 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg或9 mg/kg）該對象體重之突變CTLA-4-Ig量或劑量。更具免疫抑制性之突變CTLA-4-Ig可容許使用較阿巴西普一般使用之投劑時程而言較不經常之投劑時程（如，每兩個月一次）。或者，可對患有RA之對象投與大於約10 mg/kg該對象體重（如，自約10 mg/kg至約100 mg/kg、自約10 mg/kg至約25 mg/kg、約10 mg/kg至約50 mg/kg、約10 mg/kg至約75 mg/kg等，包括，如，約15 mg/kg、 20 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、60 g/kg、70 mg/kg、75 mg/kg、80 mg/kg、90 mg/kg、100 mg/kg），如該對象之疾病病況及/或症狀可核准此種量或劑量。

用以在罹患RA之人類體內治療RA之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體的有效量可根據各種因子判定，諸如，該突變CTLA-4-Ig二聚體之強度、該二聚體之投藥模式及/或該對象風濕性關節炎症狀或徵兆之嚴重性。舉例而言，本發明突變CTLA-4-Ig二聚體之有效量或劑量可藉著比較此種二聚體與Orencia®二聚體之強度，並根據一般而言會對具有類似RA症狀或徵兆之人類對象投與之Orencia®量或劑量，判定可產生相較於Orencia®之所欲免疫抑制作用（如，改良或約相當之作用）之該突變CTLA-4-Ig二聚體之有效量或劑量而確認。

在一具體實例中，舉例而言，本發明提供一種在需要此種治療之病患體內治療類風濕性關節炎之方法，該方法包含藉由，如，靜脈或皮下注射而對該對象投與有效量之本發明可溶性二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白。該有效量或劑量可包含自約0.001毫克（mg）至約10毫克每公斤（kg）該對象體重，其包含，但不限於，如，對該對象投與自約0.01 mg/kg至約10 mg/kg該對象體重、自約0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg該成人病患體重。在部分情形下，該有效量或

劑量係自約2至10 mg/kg、約3至10 mg/kg、約3至5 mg/kg、約5至10 mg/kg, 0.1至5 mg/kg體重、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至3 mg/kg體重、約0.05至2.0 mg/kg、約0.05至1.0 mg/kg、約0.05至2.0 mg/kg、約0.1至2.0 mg/kg、約0.1至3.0 mg/kg、約0.1至0.5 mg/kg、約0.1至0.8 mg/kg、約0.1至0.6 mg/kg、約0.2至1 mg/kg、約0.2至0.6 mg/kg、約0.2至0.5 mg/kg、約0.3至1 mg/kg、約0.3至0.6 mg/kg、約0.3至0.5 mg/kg對象體重。在部分情形下，該有效量或劑量對於體重小於60 kg之對象而言係小於約500 mg （如，小於約100 mg、75 mg、50 mg、25 mg或12.5 mg)，對於體重介於60-100 kg之對象而言係小於約750 mg（如，小於約150 mg、100 mg、75 mg、37.5 mg或20 mg)，或是對於體重超過100 kg之對象而言係小於約1000 mg（如，小於約500 mg、100 mg、50 mg、25 mg或10 mg)。在該第一劑後，後續之相當劑量係以1、2、4、8、10、12、14或16週之間期投與。後續投劑之頻率可如所需進行判定。

此種突變CTLA-4-Ig融合物可與醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑共同調配，以產生適於對一對象（如，哺乳動物，包括人類）進行投藥之醫藥組合物。該融合蛋白在該組合物中之濃度可介於自約0.01 mg/ml至約300 mg/ml或自約0.01 mg/ml至約200 mg/ml，其包括，但不限於，如，自約0.1 mg/ml至約300 mg/ml、自約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約0.1 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約50 mg/ml、約1至約100 mg/ml、約1至約75 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約10至約75 mg/ml、約10至約60 mg/ml、約25至約60 mg/ml、約30至約60 mg/ml、約25至約50 mg/ml、約40至約50 mg/ml、約25 mg/ml或約50 mg/ml。亦可預期其他組合物，包括該等於上文及下文討論者。

此種治療預期可在該對象體內降低與類風濕性關節炎相關之一或多種徵兆及/或症狀，諸如，如，發炎、關節壓痛、關節腫脹、疼痛及僵硬。此種治療可在該對象體內減少該疾病之進一步進展。舉例而言，此種治療可在該對象體內見少結構損傷之進展。此種治療可改善該對象之身體機能。

抑制組織、細胞、移植物或器官移植排斥之方法

在另一態樣中，本發明提供一種抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細胞、皮膚移植物或器官移植之排斥，或是壓抑與其相關之免疫反應之方法，該方法包含對該接受者對象投與治療有效量之下列一或多者:(1) 本發明之多肽(如，突變CTLA-4-ECD多肽或是二聚體或單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白)；(2) 包含一或多個本發明多肽之多聚體(如，包含任何兩個此等多肽之二聚體，或是包含任何四個此等多肽之四聚體)；(3) 包含至少一種本發明多肽之複合物；(4) 本發明之核酸(如，編碼本發明多肽之核酸)；(5) 包含本發明核酸或是編碼本發明多肽之載體；(6) 包含本發明之多肽、核酸、複合物及/或載體之細胞或細胞種群；及/或(7) 本發明之組合物，因而抑制該接受者對象對於組織、細胞、皮膚移植物或器官移植之排斥。該捐贈者及接受者可為相同生物種或不同生物種。該捐贈者及接受者可為哺乳動物，諸如，人類、非人類靈長類(如，猴、猩猩)、羊、貓、狗、豬、牛、馬等。在部分此等方法中，該本發明之多肽、複合物、載體及/或細胞係在組織、細胞、皮膚移植物或器官移植之前、同時或之後而對該接受者對象投與。該有效量一般而言包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約200 mg/kg該對象體重。在部分此等方法中，舉例而言，該有效量包含自約0.001毫克每公斤(mg/kg)該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250或300毫克每公斤(mg/kg)該對象體重。在部分此等方法中，該有效量包含自約0.001毫克每公斤(mg/kg)該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、50或75毫克每公斤(mg/kg)該對象體重。該本發明之多肽、複合物、核酸、載體及/或細胞可在移植過程中、在其之前或是在其之後立即對該接受者對象進行投與。或者或是此外，此種本發明之分子可在移植後之一或多個小時後、在移植

後一天及/或在其後每日或是隨需要在移植後至少每週一次、至少每兩週一次或是至少每個月一次，如所需直到12, 24, 或36個月或以上或是更長時間而進行投與。該器官移植可涉及任何器官，諸如，如，腎臟、肝臟、心臟或肺。

該待對器官、組織或細胞移植之接受者對象投予以抑制移植排斥（或是壓抑與此種移植相關之免疫反應）之本發明突變CTLA-4分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體）的有效量或劑量一般而言係根據此種分子之強度、投藥途徑、移植類型（如，細胞、組織、器官）、該對象之病史及/或該移植接受者對象建議移植排斥之免疫反應症狀或徵兆的嚴重性而判定。舉例而言，該本發明突變CTLA-4二聚體（如，D3-29-IGg2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2、D3-75-IgG2二聚體等）之有效量或劑量可藉著比較此種二聚體與貝拉西普（Belatacept）二聚體之強度而判定。可用於預防或壓抑與腎臟移植相關之免疫反應的貝拉西普有效劑量係為已知。舉例而言，貝拉西普係以每個月約5 mg或10 mg每公斤該人類體重之量或劑量，在一人類自一腎臟捐贈者進行腎臟移植之後，以靜脈輸液對該人類進行投與。相較貝拉西普約為「X」倍較強之本發明突變CTLA-4-Ig二聚體可以相較該貝拉西普劑量約為「X」倍較小之量或劑量而對具有腎臟移植之人類投與（如，經靜脈內、皮下或以其他本文所述之方式），以達成約相當於貝拉西普之治療作用（如，抑制免疫反應）。如需要較大之治療作用，可輕易判定並投與比例增加之該突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體之量或劑量。

在另一態樣中，本發明提供一種用以在由捐贈者接受此種組織、細胞或器官之對象體內治療組織、細胞或器官移植排斥之方法，該方法包含對該接受者投與治療有效量之至少一種本發明之多肽、複合物、核酸、載體及/或細胞，因而抑制該接受者對象對於該捐贈者組織、細胞或器官移植之排斥。該本發明之多肽、複合物、核酸、載體及/或細胞可在細胞、組織或器官移植之前、同時或之後對該對象進行投與。

在一態樣中，本發明提供一種在需要該方法之接受者對象體內抑制對於來自捐贈者之胰島細胞移植排斥之方法，該方法包含在將胰島細胞自捐贈者之胰臟移植進入該對象體內之前、同時或之後，對該對象投與有效量或劑量之本發明突變CTLA-4分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）。該對象（如，人類）一般而言罹患糖尿病（如，IDDM），且此種方法可用於治療診斷具有或罹患糖尿病之對象。胰島移植流程係為技藝中所已知。一般而言，其係自一去世器官捐贈者之胰臟取出胰島，純化並加工，接著移植進入罹患糖尿病之接受者對象體內。在移植之後，該等胰島中之β細胞開始製造並釋出胰島素，因而降低該接受者對象對於胰島素之需求。

在此等抑制移植排斥之方法中，本發明之突變CTLA-4分子（如，突變CTLA-4-Ig）可與醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑共同調配，以產生適於對一對象（如，哺乳動物，包括人類）進行投藥之醫藥組合物。部分此等方法包含投與一醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑、載體或稀釋劑，以及具有自約0.01 mg/ml至約300 mg/ml或約0.01 mg/ml至約200 mg/ml，其包括，但不限於，如，自約0.1 mg/ml至約300 mg/ml、自約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約0.1 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約100 mg/ml、約0.5 mg/ml至約50 mg/ml、約1至約100 mg/ml、約1至約75 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約10至約75 mg/ml、約10至約60 mg/ml、約25至約60 mg/ml、約30至約60 mg/ml、約25至約50 mg/ml、約40至約50 mg/ml、約25 mg/ml或約50 mg/ml濃度之本發明CTLA-4-Ig二聚體。亦可預期其他組合物，包括該等於上文及下文討論者。

抑制免疫反應之方法

在另一態樣中，本發明包括本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或多聚體多肽）、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以在哺乳動物體內（如，人類或非人類靈長類）抑制或壓抑免疫反應之藥物的用途。可受到抑制之免疫反應包括，如，T細

胞之活化或增殖、細胞因子之合成或生成、活化標記之誘發、發炎分子之合成或生成、發炎、抗膠原Ab生成及/或T細胞相關性Ab反應。

本發明亦包括本發明之多肽（包括，如，二聚體或單體融合蛋白或多聚體多肽）、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以治療免疫系統疾病或病症之藥物的用途。該免疫系統疾病或病症可為由T細胞與CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞在哺乳動物體內之作用中介者。該免疫系統疾病或病症可為免疫系統之疾病或病症，諸如，風濕性之疾病或病症，或是自體免疫疾病或自體免疫病症。此種免疫系統疾病或病症可為或是涉及，如，但不限於，愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、貝西氏症候群（Behcet's syndrome）、伯格氏症（Berger's Disease）、大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小

板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿病、第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應。

本發明亦提供本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以抑制CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞與CD28-陽性及/或CTLA-4-陽性T細胞間作用之藥物的用途。在另一態樣中，本發明包括本發明之多肽、複合物、核酸、載體或細胞於製造用以在哺乳動物體內治療組織或器官移植排斥（如，實體器官移植排斥（如，腎臟、肺、肝臟、心臟等））之藥物的用途。

評估免疫反應

由本發明之多肽、核酸、載體、病毒、假病毒、VLP或組合物所壓抑之免疫反應可以任何適當之技術測量。可用以評估體液免疫反應之可用技術實例包括流式細胞計數、免疫印跡分析、免疫組織化學分析、免疫沈澱分析、放射免疫分析（RIA）及酶免疫分析。酶免疫分析包括酶連免疫流式分析（ELIFA）及酶連免疫吸附分析（ELISA），包括夾層ELISA及競爭性ELISA分析。亦可將HPLC及毛細電泳（CE）用於免疫分析中，以偵測抗體與目標物質之複合物。有關進行此等技術之廣泛指引及相關原則述於，如，Harlow and Lane （1988） Antibodies, A Laboratory Manual [抗體，實驗室手冊], Cold Spring Harbor Publications, New York，Hampton R et al. （1990） Serological Methods a Laboratory Manual [血清學方法實驗室手冊], APS Press, St. Paul Minn.，Stevens （1995） Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective [臨床免疫學及血清學：實驗室觀點], CRC press，Bjerrum （1988） Handbook of Immunoblotting of Proteins [蛋白免疫印跡手冊], Vol. 2，Zoa （1995） Diagnostic Immunopathology: Laboratory Practice and Clinical Application [診斷免疫病理學：實驗室操作及臨床應用], Cambridge University Press，Folds （1998） Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization [臨床診斷免疫學：品質確認及標準化之操作流程], Blackwell Science Inc.，Bryant （1992） Laboratory Immunology & Serology [實驗室免疫學及血清學] 3rd版, W B Saunders Co.，及Maddox D E et al. （1983） J. Exp. Med. 158:1211。有關ELISA技術之指引及相關原則述於，如，Reen （1994） Methods Mol. Biol. 32:461-6，Goldberg et al. （1993） Curr. Opin. Immunol. 5（2）:278-81，Voller et al. （1982） Lab. Res. Methods Biol. Med. 5:59-81，Yolken et al. （1983）Ann. NY Acad. Sci. 420:381-90，Vaughn et al.（1999）Am. J. Trop. Med. Hyg. 60（4）:693-8，及Kuno et al. （1991） J. Virol. Methods 33（1-2）:101-13。有關流式細胞計數技術之指引提供於，

如，Diamond（2000）In Living Color : Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting [彩色動畫：流式細胞計數及細胞分選操作流程], Springer Verlag，Jaroszeki （1998） Flow Cytometry Protocols [流式細胞計數操作流程], 1st Ed.，Shapiro （1995） Practical Flow Cytometry [實用流式細胞計數], 3rd 版，Rieseberg et al. （2001） Appl. Microbiol. Biotechnol. 56（3-4）:350-60，Scheffold and Kern （2000） J. Clin. Immunol. 20（6）:400-7，及McSharry （1994） Clin. Microbiol. Rev. （4）:576-604。

胞毒性及其他T細胞免疫反應亦可由任何適當之技術測量。此等技術之實例包括ELISpot分析（特別是IFN-γ ELISpot）、胞內細胞因子染色（ICC）（特別是結合FACS分析）、CD8+ T細胞四聚體染色/FACS、標準及經修飾之T細胞增殖分析、鉻釋放CTL分析、限制性稀釋分析（LDA）及CTL殺傷分析。有關T細胞增殖分析之指引及原則係述於，如，Plebanski and Burtles （1994） J. Immunol. Meth. 170:15，Sprent et al. （2000） Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 355（1395）:317-22，及Messele et al.（2000） Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(4):687-92。LDA係述於，如，Sharrock et al.（1990） Immunol. Today 11:281-286。ELISpot分析及相關之原則係述於，如， Czerinsky et al.（1988） J. Immunol. Meth. 110:29-36，Olsson et al. （1990） J. Clin. Invest. 86:981-985，Schmittel et al. （2001） J. Immunol. Meth. 247（1-2）:17-24，Ogg and McMichael （1999） Immunol. Lett. 66(1-3):77-80，Schmittel et al.（2001） J. Immunol. Meth. 247（1-2）:17-24，Kurane et al. （1989） J. Exp. Med. 170（3）:763-75，Chain et al.（1987） J. Immunol. Meth. 99(2):221-8，Czerkinsky et al. （1988） J. Immunol. Meth. 110:29-36，及美國專利第5,750,356及6,218,132號。四聚體分析係述於，如，Skinner et al.（2000） J. Immunol. 165（2）:613-7。其他T細胞分析技術則述於Hartel et al. （1999） Scand. J. Immunol. 49（6）:649-54及Parish et al. （1983） J. Immunol. Meth. 58（1-2）:225-37。

T細胞之活化亦可藉由測量CTL之活性或是活化抗原（諸如，

IL-2受體、CD69或HLA-DR分子）之表現而分析。純化T細胞之增殖可在混合淋巴細胞反應（MLR）分析中測量；此等分析係為技藝中所熟知。

ELISpot分析係測量分泌特定細胞因子之T細胞數目，該等細胞因子諸如IFN-γ或TNF-α，其可作為T細胞效應子之標記。細胞因子專一性之ELISA套組係可由市售購得者（如，IFN-γ專一性ELISpot可由R&D Systems, Minneapolis, MN取得。

其他可用以評估及測量本發明分子（如，本發明之多肽，如，本發明之可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白）壓抑或抑制T細胞活化及/或T細胞增殖之能力的方法述於下文實例段落中之實例5-8。

投藥方法

在任何本文所述之方法中，包含適當醫藥可接受性賦形劑或載體(如，PBS)以及有效量之本發明分子(諸如本發明之多肽(如，突變CTLA-4 ECD或是單體、二聚體或多聚體突變CTLA-4-Ig）或複合物）之可注射性醫藥組合物可經由腸外、肌內、腹膜內、靜脈內、真皮下、穿皮、皮下或皮內而對宿主進行投與。或者，可使用生物彈道（biolistic）蛋白傳遞技術（疫苗槍傳遞）(其實例如本文他處所討論)。亦可使用任何其他適當之技術。多肽之投與可由脂質體協助。任何此種傳遞技術皆可結合本文所述之任何治療或預防方法而用以傳遞本發明之多肽或複合物。

儘管下列之討論主要係關於核酸，咸將可明瞭，其同樣可應用於本發明之核酸載體。本發明之核酸或其組合物可以任何適當之投藥途徑而對宿主進行投與。在本發明之部份態樣中，核酸之投與係經腸外（如，皮下（s.c.)、肌內（i.m.）或皮內（i.d.))、局部或穿皮進行。該核酸可使用針或其他類似之裝置，藉由注射而直接引入組織中（諸如，肌肉)。參見，如，Nabel et al. （1990），上述文獻；Wolff et al. （1990） Science 247:1465-1468)，Robbins（1996） Gene Therapy Protocols [基因療法操作流程], Humana Press, NJ，及Joyner （1993） Gene Targeting: A Practical Approach

[基因靶向：實用方法], IRL Press, Oxford, England，及美國專利第5,580,859及5,589,466號。其他方法，諸如，「生物彈道」或顆粒中介性之轉形作用（參見，如，美國專利第4,945,050及5,036,006號，Sanford et al., J. Particulate Sci. Tech. 5:27-37 （1987），Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568-72 （1990），及Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-30 （1991））。此等方法不僅可用於在活體內將DNA引入對象體內，諸如，哺乳動物，亦可用於進行細胞之活體外修飾，以再次引入哺乳動物體內（其在本文他處進一步討論）。

就標準之基因槍投藥而言，其係使該目標載體或核酸沈澱於顯微金屬珠之表面。該等微粒經由衝擊波或膨脹之氦氣加速，並穿透組織至數個細胞層之深度。舉例而言，由Agacetus, Inc. Middleton WI所製造之Accel™基因傳遞裝置可適用於此具體實例中。該核酸或載體可以此等技術而經由，如，肌內、穿皮、真皮下、皮下及/或腹膜內進行投與。有關生物彈道傳遞之其他裝置及技術述於國際專利申請公開案WO 99/2796、WO 99/08689、WO 99/04009及WO 98/10750，以及美國專利第5,525,510、5,630,796、5,865,796及6,010,478號。

該核酸可結合轉染協助劑而投與，其實例於上文討論。該核酸可局部及/或藉由液態顆粒傳遞（相對於固態顆粒生物彈道傳遞）而進行投與。可適用作為本發明核酸傳遞載劑之此等核酸傳遞技術、組合物及其他建構物的實例提供於美國專利第5,591,601、5,593,972、5,679,647、5,697,901、5,698,436、5,739,118、5,770,580、5,792,751、5,804,566、5,811,406、5,817,637、5,830,876、5,830,877、5,846,949、5,849,719、5,880,103、5,922,687、5,981,505、6,087,341、6,107,095、6,110,898號，以及國際專利申請公開案WO 98/06863、WO 98/55495及WO 99/57275。

或者，該核酸可藉由脂質體基礎性基因傳遞之方式而對該宿主進行投與。有關於脂質體基礎性基因傳遞之例示性技術及原則提供於，如，Debs and Zhu （1993） WO 93/24640；Mannino and

Gould-Fogerite （1988） BioTechniques 6（7）:682-691；Rose U.S. Pat No. 5,279,833；Brigham （1991） WO 91/06309；Brigham et al.（1989）Am. J. Med. Sci. 298:278-281；Nabel et al.（1990）Science 249:1285-1288；Hazinski et al. （1991） Am. J. Resp. Cell Molec. Biol. 4:206-209；及Wang and Huang （1987） Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855），及Felgner et al. （1987） Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:7413-7414）。可用於傳遞核酸之適當脂質體醫藥可接受性組合物進一步述於本文他處。

可將任何量之本發明核酸用於本發明之方法中。舉例而言，可使足夠之核酸調配於醫藥可接受之賦形劑或載體中，並對一對象進行投與，以使該經編碼之多肽或複合物可以咸信可有效，例如，抑制該對象體內之免疫反應、抑制內源性B7-陽性及胞與CD28-陽性細胞在該對象體內之作用或是抑制組織、細胞、器官或移植物移植排斥的量而在該對象體內生成。在其中一種形式中，當該核酸係以注射投與時，其係投與約50微克（μg）至100 mg之核酸。在一例示性之應用中，為壓抑免疫反應，其以注射或電穿孔或其他適當之傳遞方法（如，基因槍、經由皮膚壓印及脂質轉染（lipofection）），將包含PBS以及編碼有效量突變CTLA-4多肽之DNA載體量的醫藥組合物，對需要治療之對象（如，罹患其中需要免疫抑制治療之免疫系統疾病或病症之對象）進行投與。其中一種例示性之載體示於圖1。

在經由基因槍而投與時，用於本發明方法中之DNA質體量係，如，自約100至約1000倍低於直接注射（如，經由標準之針注射）所用之量。儘管具有此種敏感性，可在此種生物彈道傳遞技術中使用至少約1 μg之核酸。

RNA或DNA病毒載體系統可用於傳遞編碼本發明多肽之核酸。病毒載體可在活體中直接對一對象進行投與，或者其可在試管中用於治療細胞，並以活體外之形式將該等經修飾之細胞對該對象進行投與。可用之病毒載體包括該等於上文討論者，諸如，腺相關病毒、腺病毒、逆轉錄病毒、慢病毒及單純皰疹病毒載體。

使用此等病毒載體，本發明之核酸可輕易轉移進入該對象之目標細胞及組織中。此外，使用逆轉錄病毒、慢病毒及腺相關病毒基因轉移法，其可能將本發明之核酸納入該宿主之基因組中，因而造成該經插入核酸之持續表現。

包含至少一種本發明核酸之本發明病毒載體的傳遞咸信可在該載體所投與之對象體內壓抑免疫反應。視情況者，部份本發明之預防及/或治療方法係以足以抑制可偵測性免疫反應的適當病毒載體劑量而實施。可使用任何適當濃度之包含本發明核酸的任何適當病毒載體而壓抑該免疫反應。舉例而言，可對該對象宿主投與一種群之逆轉錄病毒載體（其實例述於，如，Buchscher et al.（1992）J. Virol. 66(5) 2731-2739，Johann et al.（1992）J. Virol. 66 (5):1635-1640 (1992)，Sommerfelt et al.,（1990） Virol. 176:58-59，Wilson et al.（1989） J. Virol. 63:2374-2378，Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991)， Wong-Staal et al., PCT/US94/05700，Rosenburg and Fauci （1993） in Fundamental Immunology, Third Edition [基礎免疫學，第三版] Paul （ed.） Raven Press, Ltd., New York及其中之參考文獻），AAV載體（如述於，如，West et al.（1987） Virology 160:38-47，Kotin （1994） Human Gene Therapy 5:793-801，Muzyczka（1994） J. Clin. Invest. 94:1351，Tratschin et al.（1985） Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260，美國專利第4,797,368及5,173,414號，及國際專利申請公開案WO 93/24641），或是腺病毒載體 （如述於，如，Berns et al.（1995） Ann. NY Acad. Sci. 772:95-104; Ali et al.（1994） Gene Ther. 1:367-384; and Haddada et al.（1995） Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3) :297-306)，以使其產生該載體中所包含核酸之免疫抑制含量表現，因而造成所欲之免疫抑制反應。其他適當類型之病毒載體述於本文他處（包括適當逆轉錄病毒、AAV及腺病毒載體之替代實例）。

此等及其他類型病毒載體顆粒之適當感染條件述於，如，Bachrach et al., J. Virol., 74(18), 8480-6 (2000)，Mackay et al., J.

Virol., 19（2）, 620-36 （1976），及Fields Virology [病毒學], 上述文獻。可用於製備及應用病毒載體之其他技術提供於，如，"Practical Molecular Virology: Viral Vectors for Gene Expression [實用分子病毒學：用於基因表現之病毒載體]"於 Methods in Molecular Biology [分子生物學方法], vol. 8, Collins, M. Ed.,（Humana Press 1991），Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy [病毒載體：基礎科學及基因療法], 1st Ed.（Cid-Arregui et al., Eds.） （Eaton Publishing 2000），"Viral Expression Vectors [病毒表現載體]," 於Current Topics in Microbiology and Immunology [微生物學及免疫學之當前主題], Oldstone et al., Eds.（Springer-Verlag, NY, 1992），及"Viral Vectors [病毒載體]"於 Current Communications in Biotechnology [生物技術之當前通訊], Gluzman and Hughes, eds.（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988）。

包括一或多種本發明分子之載體或病毒之毒性及治療功效係使用標準之醫藥流程而在細胞培養物或實驗動物中進行測定。咸可使用本文所提出之流程及該等其他在技藝中已知者，測定MLD_{50}（對於50%之種群具致命性之最小劑量）及/或ED_{50}（對於50%之種群具治療有效性之劑量）。關於已知病毒疫苗之建議劑量，亦參見S. Plotkin and W. Orenstein, Vaccines [疫苗]（W. B. Saunders Co. 1999 3d ed.）。本發明之核酸、多肽、蛋白、融合蛋白、經轉導細胞及其他調配物可以，如，由該調配物之MLD_{50}，以及其在應用於該病患之質量及整體健康情形下之各種濃度的副作用所判定之量而進行投藥。因此，舉例而言，本發明提供一種誘發免疫反應之方法，其係藉由投與等於或大於一醫藥可接受性組合物之ED_{50}的劑量而進行，該組合物包含一種群之似病毒顆粒或病毒（如，減毒或複製缺陷病毒），其包含本發明之多肽或核酸。投藥可經由單劑或分劑（其係藉由共投藥、系列投藥或其組合進行）而完成。投藥之技術及操作流程述於，如，Plotkin （Vaccines [疫苗]）上述文獻以及其他本文所引述之參考文獻。在相關之概念中，

用以評估可有效誘發免疫力之核酸、多肽、載體及細胞組合物劑量之技術述於，如，歐洲專利申請案第1 156 333號及其中所引述之參考文獻。

該病毒載體可靶向一對象（如，哺乳動物）之特定組織、細胞及/或器官。此等載體之實例述於上文。舉例而言，該病毒載體或核酸載體可用以將本發明之核酸序列選擇性地傳遞至單核細胞、樹狀細胞、與樹狀細胞相連之細胞(如，與郎格罕(Langerhans)細胞相連之角質細胞)、T細胞及/或B細胞。該病毒載體可為複製缺陷型病毒載體。該病毒載體顆粒亦可經修飾以減少對於該病毒載體之宿主免疫反應，因而達成持續之基因表現。此等「隱蔽（stealth）」載體述於Martin, Exp. Mol. Pathol. 66(1):3-7 (1999), Croyle et al., J. Virol. 75(10):4792-801 (2001), Rollins et al., Hum. Gene Ther. 7 (5) :619-26 (1996), Ikeda et al., J. Virol. 74 (10) :4765-75 (2000), Halbert et al., J. Virol. 74 (3) :1524-32 (2000)，及國際專利申請公開案WO 98/40509。或者或是此外，該病毒載體顆粒可以經選擇之策略進行投與以減少對於該病毒載體之宿主免疫反應。用以在對宿主進行投與時減少對於該病毒載體之免疫反應的策略提供於，如，Maione et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (11) :5986-91 (2001), Morral et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22) :2816-21 (1999), Pastore et al., Hum. Gene Ther. 10 (11) :1773-81 (1999), Morsy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (14) :7866-71 (1998), Joos et al., Hum. Gene Ther. 7 (13) :1555-66 (1996), Kass-Eisler et al., Gene Ther. 3 (2) :154-62 (1996)，美國專利第6,093,699、6,211,160、6,225,113號，美國專利申請公開案第2001-0066947A1號。

皮膚及肌肉一般而言係本發明多肽、複合物、核酸及載體之較佳投藥目標，以任何適當之技術進行。因此，本發明多肽、複合物、核酸及載體進入或通過對象（如，哺乳動物）皮膚之傳遞係本發明之特徵之一。此等本發明之分子可以醫藥可接受之可注射性溶液形式而進入或通過皮膚投與，如，經由肌內或是腹膜內。

投藥亦可以穿皮裝置完成，或者，更典型者，以生物彈道傳遞完成，將該多肽、複合物、核酸及/或載體送至、進入或通過該對象之皮膚，或是進入該對象之暴露肌肉中。舉例而言，可使本發明所提供之穿皮裝置（其述於本文他處）應用於宿主之皮膚一段適當期間，以產生聚核苷酸及/或載體至該對象之足夠傳遞，因而壓抑該對象體內之免疫反應，或是抑制移植物、細胞或組織移植排斥。肌肉之投藥更典型者係以包含本發明多肽、聚核苷酸或載體之液體溶液的注射而協助進行。可經靶向之特定細胞包括樹狀細胞、其他APCs、B細胞、單核細胞、T細胞（包括T輔助細胞）及與此等免疫系統細胞相連之細胞（如，與郎格罕細胞相連之角質細胞或其他皮膚細胞）。本發明載體及核酸之靶向述於本文他處。此等靶向投藥可以包含以可操作之方式連結細胞及/或組織專一性啟動子之核酸的核酸或載體而進行，該等啟動子之實例係為技藝中所已知。

本發明之聚核苷酸可以任何適當之傳遞系統投與，以使該宿主中產生重組多肽之表現，因而造成免疫反應之抑制、B7-陽性劑胞與CD28-陽性細胞間作用之抑制或是組織、細胞、器官或移植物移植排斥之抑制。舉例而言，可對一對象投與有效量之包含本發明核酸的細菌細胞種群，造成本發明重組突變CTLA-4多肽之表現，以及該對象體內免疫反應之抑制。經研發以進行哺乳動物基因傳遞之細菌細胞係為技藝中所已知。

本發明聚核苷酸或載體對於對象之投與可藉著對有效數目之細胞或有效之組織目標進行電穿孔而協助進行，以使該核酸及/或載體由該等細胞攝入，並在其中表現，因而造成本發明重組多肽在其中之製備，並後續在該對象體內抑制免疫反應。

製備及純化方法

本發明進一步提供製備及純化本發明多肽、核酸、載體及細胞之方法。在一態樣中，本發明提供一種製備本發明重組多肽之方法，其係藉著將本發明之核酸引入培養基中之一細胞種群，在

該培養基中培養該等細胞（其持續時間及所用條件適用於所欲之基因表現量）以產生該多肽，再自該等細胞、培養基或兩者中分離該多肽。該核酸一般而言係以可操作之方式連結可有效表現該核酸所編碼多肽之調控序列。

該多肽可自細胞裂解物、細胞上清液及/或細胞培養基中，以各種技藝中已知之適當方法進行分離，包括，如，細胞裂解物及/或細胞上清液之各種層析。舉例而言，該多肽可首先藉著使用離心濾器（Amicon）濃縮該培養基或是藉著以硫酸銨或聚乙二醇沈澱該等多肽，再接著使該等多肽重新懸浮於PBS或其他適當之緩衝液中，而自細胞裂解物及/或細胞培養基中分離。該多肽接著可在Sephacryl S-400管柱（Amersham Biosciences）上進行尺寸排除層析（如述於，如，Hjorth, R. and J. Moreno-Lopez, J. Virol. Methods 5:151-158 （1982））或是另一親和層析，或是通過20-60%之蔗糖梯度進行離心（如述於，如，Konish et al., Virology 188:714-720 （1992））而進行純化。含有所欲多肽之級份可以ELISA或SDS-PAGE接續蛋白銀染或免疫印跡而辨識。收集該等所欲之級份並進一步進行濃縮。梯度離心級份中之蔗糖可使用PD-10管柱（Amersham Biosciences）凝膠過濾而除去。其他純化技術包括該等述於下文實例中者，以及疏水作用層析（Diogo, M. M, et al., J. Gene Med. 3:577-584 （2001）），以及任何其他技藝中已知之適當技術。

亦可使用技藝中已知之任何適當純化技術。技藝中已知之多肽純化方法包括該等述於，如，Sandana （1997） Bioseparation of Proteins [蛋白之生物分離], Academic Press, Inc.，Bollag et al. （1996） Protein Methods [蛋白方法], 2nd版 Wiley-Liss, NY，Walker （1996） The Protein Protocols Handbook [蛋白操作流程手冊] Humana Press, NJ，Harris and Angal （1990） Protein Purification Applications: A Practical Approach [蛋白純化應用：實用方法] IRL Press at Oxford, Oxford, England，Scopes （1993） Protein Purification: Principles and Practice [蛋白純化：原則及實施] 3rd版

Springer Verlag, NY，Janson and Ryden（1998）Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications [蛋白純化：原則、高解析度方法及應用], 第二版 Wiley-VCH, NY；及Walker（1998） Protein Protocols on CD-ROM [光碟版蛋白操作流程] Humana Press, NJ中者。適於進行蛋白製備之細胞係為技藝中所已知，且於本文他處討論（如，Vero細胞、293細胞、BHK、CHO（如，CHO-K1）及COS細胞可為適用）。細胞可以任何適當之技術進行裂解，包括，如，音波處理、微射流（microfluidization）、物理剪切、法式細胞壓碎（French press）裂解或清潔劑基礎性裂解。

在一態樣中，本發明提供一種純化本發明多肽之方法，其包含以本發明之核酸（如，重組核酸，其編碼包含SEQ ID NO:1多肽序列之重組多肽）轉形適當之宿主細胞，在該宿主細胞（如，CHO細胞或293細胞）中，以適當之裂解技術裂解該細胞（如，音波處理、清潔劑裂解或其他適當技術），再對該裂解物進行親和純化（使用包含樹脂之層析管柱，該樹脂包括至少一種本發明之新穎抗體（通常係本發明之單株抗體）或其抗原結合片段），以使該裂解物富含該所欲多肽（如，包含SEQ ID NO:1多肽序列之多肽）。

在另一態樣中，本發明提供一種純化此等目標多肽之方法，該方法與上述之方法不同在於其係使用一核酸，該核酸包含編碼包含本發明多肽（如，SEQ ID NO:1）之融合蛋白與適當標記（如，e-抗原表位/his標記）之核苷酸序列，且其係以免疫親和、扁豆凝集素親和管柱層析、固定化金屬離子親和層析（IMAC）或金屬螯合親和層析（MCAC）富集技術純化該多肽。其他純化方法揭示於本文他處。

在另一態樣中，本發明提供一種製備本發明多肽之方法，該方法包含將包含本發明核酸之重組表現載體引入一細胞種群中，在足以自該載體表現該核酸並製備由該核酸所編碼多肽之適當條件下於培養基中培養該等細胞，再自該等細胞、培養基或兩者中分離該多肽。該等所選細胞係根據該多肽之所欲加工，並根據該適當載體（如，大腸桿菌細胞係細菌質體之較佳者，而293細胞係

哺乳動物穿梭質體及/或腺病毒（特別係E1-缺失腺病毒）之較佳者）。

在又另一態樣中，本發明包括一種製備多肽之方法，該方法包含：(a) 將包含至少一種編碼本發明多肽之本發明核酸的重組表現載體引入一細胞種群中；(b) 將該表現載體投與至哺乳動物體內；及（c） 自該哺乳動物或自該哺乳動物之副產品分離該多肽。

本發明之多肽亦可藉著在足以表現該多肽之條件下培養本發明之細胞或細胞種群（其，如，已經編碼此種多肽之本發明核酸轉形），再回收在該細胞中或是由該細胞表現之該多肽，使用技藝中已知之標準技術進行。

在另一態樣中，本發明提供一種製備本發明多肽之方法，其包含（a） 將本發明之核酸引入一細胞種群中，其中該核酸係以可操作之方式連結可有效製備該核酸所編碼多肽之調控序列；(b) 在培養基中培養該等細胞以製備該多肽；及（c） 自該等細胞或培養基中分離該多肽。亦包括一種經培養之細胞，該細胞中已引入本發明之載體（如，本發明之表現載體）。

亦包括一種製備本發明多肽之方法，其包含將編碼該多肽之核酸引入培養基中之一細胞種群中（該等細胞可容許表現該核酸），將該等細胞維持在其中可表現該核酸之條件下，再在之後自該培養基中分離該多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種製備融合蛋白之方法。該方法包含：(1) 在培養基中培養經核酸轉形之宿主細胞，其中該核酸包含：(i) 第一核苷酸序列，編碼多肽，其選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，其中該多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是CD86或CD80之胞外域；以及（ii） 第二核苷酸序列，編碼Ig Fc多肽，其包含鉸鏈區、CH2域及CH3域，因而表現該核酸並製備融合蛋白；以及（2） 回收該融合蛋白。可使用任何該Ig Fc多肽，包括，如，IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG4 Fc或是突變Ig Fc多肽。在部分此等方法中，該核酸尚包

含第三核苷酸序列，編碼一分泌或信號肽，以可操作之方式連結該融合蛋白，且該融合蛋白係以包含相同第一及第二融合蛋白之雙硫鍵結融合蛋白二聚體形式而自該宿主細胞分泌，且其自該培養基中回收該雙硫鍵結融合蛋白二聚體。在部分此等方法中，該雙硫鍵結融合蛋白二聚體係經由該第一融合蛋白之半胱胺酸殘基與該第二融合蛋白之半胱胺酸殘基間的共價雙硫鍵而形成。在部分此等方法中，其係自該培養基、宿主細胞或宿主細胞周質而回收該融合蛋白。

在另一態樣中，本發明提供一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，編碼（i） 第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該第多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及（ii） 第二多肽，其包含IgG多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。該第二多肽可包含本文他處所討論之任何適當Ig多肽，其包括，如，包含多肽序列SEQ ID NO:184或SEQ ID NO:218者。

在另一態樣中，本發明提供一種製備可溶性融合蛋白二聚體之方法。該方法包含培養經表現載體轉形之宿主細胞，該表現載體包含編碼本發明可溶性融合蛋白二聚體之核苷酸序列。例示性之融合蛋白包括該等包含SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任多肽序列者。該載體包括可協助該融合蛋白表現之核苷酸序列（如，編碼信號肽之核苷酸序列）。該融合蛋白係以包含兩相同融合蛋白之雙硫鍵結融合蛋白二聚體形式而自該宿主細胞分泌，且其自該培養基中回收該雙硫鍵結融合蛋白二聚體。在部分此等方法中，該雙硫鍵結融合蛋白二聚體係經由各個融合蛋白上之半胱胺酸殘基間的共價雙硫鍵而形成。該融合蛋白二聚體一般而言係自該培養基、宿主細胞或宿主細胞周質回收。實例12提供一種例示性之流程，創造表現本發明突變CTLA4-Ig融合蛋白之穩定轉染細胞，產生該突變CTLA4-Ig融合蛋白，並自培養物中純化該突變融合蛋白。

除重組製備之外，本發明之多肽尚可使用固相技術而以直接之肽合成製備（參見，如，Stewart et al.（1969）Solid-Phase Peptide Synthesis [固相肽合成], W.H. Freeman Co, San Francisco及Merrifield J.（1963）J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154）。肽合成可使用手動技術或自動進行。自動性之合成可，例如，使用Applied Biosystems 431A肽合成儀（Perkin Elmer, Foster City, Calif.），根據製造商所提供之指示而達成。舉例而言，可分別以化學合成亞序列，並使用化學方法結合，以產生本發明之多肽或其片段。或者，可自任何專門生產多肽之公司訂購合成多肽。最常見者，本發明之多肽係藉著表現編碼核酸並回收多肽而製備，如，如上所述。

本發明包括一種製備本發明多肽之方法，其包含將本發明之核酸、本發明之載體或其組合引入動物體內，諸如，哺乳動物（其包括，如，大鼠、非人類靈長類、蝙蝠、猢猻、豬或雞），以使本發明之多肽在該動物體內表現，再自該動物或自該動物之副產物分離該多肽。自該動物或動物副產物之多肽分離可以任何適當技術進行，根據該動物及所欲之回收策略而定。舉例而言，該多肽可自表現本發明動物之小鼠、猴或豬之血清而回收。本發明提供包含至少一種本發明核酸之轉基因動物（包括前述之哺乳動物）。該轉基因動物可具有整合進入其宿主基因組中之該核酸（如，藉由AAV載體、慢病毒載體、以整合促進序列所進行之生物彈道技術等），或是可具有維持在染色體外之該核酸（如，在一非整合性質體載體中，或是藉著插入非整合性病毒載體中）。可對染色體外之載體進行工程處理，以進行較整合性載體更為瞬時之基因表現。RNA基礎性載體可在此態樣中提供特別之優勢。

組合物

本發明進一步提供新穎及有用之組合物，其包含至少一種本發明之組成份，諸如，如，至少一種本發明之多肽（其包括，如，融合蛋白及多聚體多肽）、複合物、核酸、載體、病毒、似病毒顆粒（VLP）及/或細胞，或是其任何組合，以及載體、賦形劑或稀

釋劑。該載體、賦形劑或稀釋劑可為醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑。此種組合物可包含任何適當量之任何適當數目之本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLPs及/或細胞。其亦提供醫藥組合物，其包含至少一種該多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞，或是其任何組合，以及醫藥可接受之載體、賦形劑或稀釋劑。此等組合物可用於本文所述之本發明方法中，其包括，如，抑制免疫反應之方法。

舉例而言，在一非限制性之具體實例中，本發明提供一種組合物，其包含賦形劑、稀釋及及載體，以及至少一種此等本發明之多肽（如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種或以上之多肽），諸如，突變CTLA-4 ECD多肽（如，SEQ ID NOS:1-73中之任一者）或突變CTLA-4-Ig融合蛋白（如，SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中之任一者），其中至少一種多肽係以足以在投與該組合物之對象體內抑制免疫反應（包括，如，涉及移植排斥及/或自體免疫之免疫反應）、抑制對於經捐贈之組織、細胞或器官移植之排斥或是抑制內源性B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞間作用之量而存在於該組合物中。

其亦包括一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體，以及有效量之一或多種此等本發明之組成份。該有效量可為用於本文他處所述之治療或預防方法中之治療或預防有效量或劑量，諸如，治療自體免疫疾病之方法，或是抑制接受者對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或器官移植排斥之方法。

該組合物（或醫藥組合物）可為任何無毒性之組合物，其不會干擾其中所包括之本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞之免疫抑制特性。該組合物可包含一或多種賦形劑、稀釋劑或載體，且該醫藥組合物可包含一或多種醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。技藝中已知廣泛多種之可接受性載體、稀釋劑及賦形劑，且其可被包括在本發明之組合物及醫藥組合物中。舉例而言，可使用各種水性載體，如，蒸餾或純化水，無菌鹽水、緩衝鹽水（諸如，磷酸緩衝鹽水（PBS））及其類似者，其

可在本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞之可注射性調配物中為有利者。技藝中已知諸多可用以投與治療性蛋白之適當賦形劑、載體及稀釋劑。此等溶液較佳係無菌者，且一般而言不含非所欲之物質。組合物可以習知、既為熟知之滅菌技術而經滅菌。 本發明之組合物可如所需而包含醫藥可接受之輔助物質以接近生理條件。此等物質包括，如，pH調節劑、緩衝劑及滲透壓調節劑，其包括，如，醋酸鈉、抗壞血酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及其類似者。本發明之組合物，包括醫藥組合物，亦可包括一或多種適用於包括在醫藥組合物中之組成份，諸如，稀釋劑、充填劑、鹽、緩衝劑、界面活性劑、乳化劑、清潔劑（如，非離子性清潔劑或乳化劑，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80、pluronic F-68及其類似者）、防腐劑、組織固定劑、增溶劑及/或其他物質。

可用於醫藥組合物中之適當組成份實例述於，如，Berge et al., J. Pharm. Sci. 66(1):1-19 (1977)，Wang and Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech. 42:S4-S6 (1988)，美國專利第6,165,779及6,225,289號，以及本文他處。醫藥組合物亦可包括防腐劑（諸如，苯甲醇、疊氮化鈉、間-甲酚等）、抗氧化劑、金屬螯合劑（諸如，甲硫胺酸、ECTA等）及/或其他熟習技藝者所知之添加物。用於醫藥組合物之適當醫藥可接受性載體實例述於，如，Urquhart et al., Lancet 16:367 (1980)，Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms - Disperse Systems [醫藥劑形- 分散系統] (2nd ed., Vol. 3, 1998)，Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms & Drug Delivery Systems [醫藥劑形及藥物傳遞系統] (7th ed. 2000)，Martindale, The Extra Pharmacopeia [馬丁代爾大藥典] (31st版)，Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓醫藥科學] (16th-20th版)，The Pharmacological Basis of Therapeutics [療劑之藥學基礎], Goodman and Gilman, Eds. (9th ed. - 1996)，Wilson and Gisvolds Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry [威爾森及吉佛得有機醫學及醫藥化學教科書], Delgado and Remers, Eds. (10th ed. -

1998），及美國專利第5,708,025及5,994,106號。調配醫藥可接受性組合物之原則述於，如，Platt, Clin. Lab Med. 7:289-99 （1987），Aulton, Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design [藥物：劑形設計科學], Churchill Livingstone （New York） （1988），Extemporaneous Oral Liquid Dosage Preparations [即興口服液劑製備], CSHP （1998），以及"Drug Dosage [藥物劑量]," J. Kans. Med. Soc. 70（1）:30-32 （1969）。其他特別適用於投與載體之醫藥可接受性載體述於，如，國際專利申請公開案WO 98/32859。

本發明之組合物，包括醫藥組合物，可包括一或多種水性載體或賦形劑（包括，如，醫藥可接受之載體或賦形劑），以及一或多種組成份，諸如，一或多種緩衝劑、一或多種鹽類、一或多種清潔劑或乳化劑及/或一或多種糖類。緩衝系統一般而言係適用於使該組合物之pH維持在一範圍中，該範圍係有助於該組合物中所存在本發明分子（如，突變CTLA-4-Ig）之安定性。可用於該組合物中之例示性緩衝劑包括，但不限於，如，N-2-羥乙基哌嗪-N'-2-胺基乙烷磺酸（HEPES）緩衝劑、檸檬酸緩衝劑（如，檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉混合物）、磷酸鈉緩衝劑（如，磷酸二鈉-磷酸三鈉混合物（Na_2HPO_4/Na_3PO_4）、磷酸氫二鈉-磷酸二氫鈉混合物）、醋酸緩衝劑（如，醋酸-醋酸鈉混合物、醋酸-氫氧化鈉混合物）、組胺酸緩衝劑、Tris緩衝劑、Tris-順丁烯二酸緩衝劑、琥珀酸緩衝劑（如，琥珀酸-氫氧化鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸一鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸二鈉混合物、琥珀酸一鈉混合物-琥珀酸二鈉混合物）、順丁烯二酸緩衝劑、咪唑緩衝劑、酒石酸緩衝劑、反丁烯二酸緩衝劑、葡糖酸緩衝劑、草酸緩衝劑、乳酸緩衝劑、醋酸緩衝劑及其類似者，或是其任何之組合（如，檸檬酸及醋酸緩衝劑之混合物等）。緩衝劑在組合物中之濃度可為任何適用於包括於該組合物溶液中之該（等）本發明分子者（如，突變CTLA-4-Ig），諸如，但不限於，在約1 mM至約100 mM、約1 mM至約50 mM、約5 mM至約50 mM或約5 mM至約25 mM之範圍內，其包括，如，1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、40 mM、50 mM

（諸如，如，20 mM HEPES緩衝劑、20 mM檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉緩衝劑、20 mM琥珀酸緩衝劑等）。

可用於該組合物之例示性鹽類包括，但不限於，如，水溶性鹽類，包括有機鹽或無機鹽（如，水溶性無機鹽），諸如，氯化鈉、氯化鎂、碳酸氫鈉、氯化鉀、氯化鈣及氯化銨及其類似者，或是任何醫藥可接受性或生理相容性之鹽。鹽在該組合物溶液中之例示性濃度包括，但不限於，如，在約1 mM至約150 mM、約10 mM至約125 mM、or 約75 mM至約125 mM之範圍內，包括，如，10 mM、50 mM、75mM、100 mM、125 mM、150 mM （諸如，如，100 mM NaCl）。

可用於該組合物之例示性糖類或碳水化合物包括，但不限於，如，蔗糖、麥芽糖、海藻糖、葡萄糖、甘露糖、棉子糖、乳糖、麥芽糊精、葡聚糖、蔗糖等，其濃度範圍包括，但不限於，如，根據該組合物之以重量計自約0.1%至約10%之糖、以重量計約1%至約5%之糖或以重量計約1%至約3%之糖，包括，如，以重量計0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%之糖（如，以重量計2%之蔗糖、以重量計2%之海藻糖或以重量計2%之甘露糖）。可用於該組合物之例示性糖醇包括，但不限於，如，甘露糖醇、山梨糖醇、乙二醇、甘油、阿拉伯糖醇、赤藻糖醇、木糖醇、核糖醇、乳糖醇及其類似者，其濃度範圍包括，但不限於，如，根據該組合物之以重量計自約0.1%至約10%之糖醇、約1-5%、約1-3%，包括，如，以重量計0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%之糖醇。

本發明組合物（包括醫藥組合物）之滲透壓一般而言係類似血液之血清滲透壓，其範圍係自約250至約350滲透壓毫克分子每公斤（mOSm/kg）水。鹽在該組合物中之濃度一般而言係小於125 mM。該鹽及糖之濃度可經調整或變化，以使該組合物之滲透壓為自約250-350 mOSm/kg水。

可用於該組合物之例示性清潔劑包括，但不限於，如，聚山

梨醇酯，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68，其範圍包括，但不限於，如，根據該組合物之以重量計自約0.001%至約0.2%之清潔劑或乳化劑，包括，如，根據該組合物之以重量計0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.075%及0.1%之清潔劑或乳化劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68）

本發明之組合物，包括醫藥組合物，可包含一聚合物，諸如，PEG分子，其濃度足以降低或抑制二或多個本發明分子間（諸如，如，二或多個本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體）之非所欲性連結。該組合物可包含二或多種不同之聚合物（如，PEGs）。該聚合物（如，PEG分子）一般而言具有自約200 Da至約8000 Da之分子量（如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da，可自Dow Chemical取得）。在該組合物中添加聚合物（如，PEG分子）咸信可降低非所欲性凝聚物之形成，特別是二或多個本發明融合蛋白二聚體之非所欲性凝聚物。

本發明之組合物，包括醫藥組合物，可包括一環狀寡糖，諸如，環糊精（如，Captisol® （Cydex））。在一態樣中，該組合物包含二或多種不同之環狀寡糖。在該組合物中添加環狀寡糖可改良活性醫藥成分（如，突變CTLA-4分子）之溶解度、安定性、生物可利用性及/或投劑。

本發明組合物（包括醫藥組合物）之pH可介於自約pH 3至約pH 10、自約pH 4至約pH 10、自約pH 5至約pH 9、自約pH 6至約pH 9、自約pH 5.5至約pH 8.5、自約pH 6.0至約pH 6.7、自約pH 6.0至約pH 6.5、自約pH 6.2至約pH 8.7、自約pH 6.5至約pH 8.5、自約pH 6.5至約pH 7.5、自約pH 6.2至約pH 7.0、自約pH 6.3至約pH 6.8、自約pH 6.4至約pH 6.8、自約pH 7.0至約pH 8.0及約pH 7.0至約pH 7.4。在一態樣中，包含本發明分子（諸如，如，突變CTLA-4-IgG2）之組合物具有pH 5.0、pH 5.1、pH 5.2、pH 5.3、pH 5.4、5.5、pH 5.6、pH 5.7、pH 5.8、pH 5.9、pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4、

pH 6.5、pH 6.6、pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9、pH 8.0、pH 8.1、pH 8.2、pH 8.3、pH 8.4、pH 8.5、pH 8.6、pH 8.7、pH 8.8、pH 8.9、pH 9.0、pH 9.1、pH 9.2、pH 9.3、pH 9.4、pH 9.5、pH 9.6、pH 9.7、pH 9.8、pH、9.9或pH 10.0之pH值。

在一態樣中，本發明提供一種本發明之組合物，其包含賦形劑或載體（包括，如，醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑或載體），以及有效量之任何述於全文及本文中之本發明CTLA-4多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，並尚包含可使該組合物之pH維持在介於約pH 3至約pH 10之緩衝劑、水、視情況之非離子性清潔劑、視情況之鹽及視情況之糖醇、單醣、雙醣或多醣。部分此等組合物係在生理pH下。部分此等組合物具有自約4至約7.5、約5.0至約7.5或自約6.4至約6.6，包括，如，約pH 6.5、約pH 7.4或pH 7.5之pH值。部分此等組合物包含濃度自約1 mM至約100 mM、約1 mM至約50 mM、約5 mM至約35 mM、約10 mM至約25 mM，包括，如，約20 mM、25mM或30 mM之緩衝劑。部分此等組合物包含選自由HEPES緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、琥珀酸緩衝劑、乙酸緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、順丁烯二酸緩衝劑、磷酸緩衝劑及Tris緩衝劑所組成之群的緩衝劑。部分此等組合物包含選自由HEPES緩衝劑、檸檬酸鈉緩衝劑及琥珀酸鈉緩衝劑所組成之群的緩衝劑。就部分此等組合物而言，其pH係自約6.0至約6.7，且該緩衝劑係琥珀酸鈉或檸檬酸鈉。就部分此等組合物而言，其pH係自約7.0至約7.7，且該緩衝劑係HEPES。部分此等組合物尚包含糖醇或醣類，其中該醣類係單醣、雙醣（如，蔗糖或海藻糖）或多醣。部分此等組合物包含以約1 mM至約50 mM，包括，如，約20 mM、25 mM或30 mM之濃度存在之鹽。部分此等組合物包含非離子性清潔劑，諸如，如，選自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-40、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群的非離子性清潔劑。

在部分此等上段所述之組合物（包括醫藥組合物），該多肽、

多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約1 mg/ml（重量/體積或w/v）至約200 mg/ml（w/v）、約25 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）、約50 mg/ml至約300 mg/ml之濃度存在，視情形約在介於約50 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）之範圍。部分此等組合物包含自約0.1 mg/kg至約15 mg/kg之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係對哺乳動物（如，人類）進行投與。部分此等組合物包含自約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係經由腸外進行投與。部分此等組合物包含自約0.5 mg/kg至約5 mg/kg（且視情形為約0.5 mg/kg）之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係經由皮下進行投與。部分此等組合物包含自約5 mg/kg至約15 mg/kg（視情形為約10 mg/kg）之有效量的該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體，且該組合物係經由靜脈內進行投與。就部分此等組合物而言，該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。就部分此等組合物而言，該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。部分此等組合物係無菌及/或與血液等滲透壓者。部分此等組合物係液體組合物。部分此等組合物係為液體或乾燥形式，其中該乾燥形式係選自由凍乾形式、風乾形式及噴霧乾燥形式所組成之群。

在一例示性態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：(i)本發明之CTLA-4-Ig融合蛋白，其具有自約1 mg/ml至約300 mg/ml（如，約1 mg/ml至約100 mg/ml、約50 mg/ml 或約100 mg/ml等）之濃度（視情形為二聚體融合蛋白）；(ii) 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 9.0間之緩衝能力，濃度為約5 mM至約50 mM；

（iii） 醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；（iv）糖，其濃度係根據該組合物以重量計約0.5%至約10%之糖；（v）鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；（vi） 視情形之非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml；以及（vii） 視情形之環狀寡糖（如，環糊精（Captisol®）），其中該組合物之pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍。例示性之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白包括該等包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群（視情形為，如，選自由SEQ ID NOS:197、199、211及213所組成之群）的多肽序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性之多肽序列者，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此等融合蛋白可為單體或二聚體形式。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：（i） 包含本發明之CTLA-4-Ig融合蛋白（視情形為二聚體融合蛋白）與共價連附該融合蛋白之非多肽分子部分之複合物，該複合物具有自約1 mg/ml至約300 mg/ml （如，約1 mg/ml至約100 mg/ml、約50 mg/ml 或約100 mg/ml等）之濃度；（ii） 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 8.0間之緩衝能力，濃度為約5 mM至約50 mM；（iii）醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；（iv） 糖，其濃度係根據該組合物以重量計約0.5%至約10%之糖；（v） 鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；及（vi） 視情形之非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml；其中該組合物之pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍。該複合物可包含一、二、三、四個或以上之非多肽分子部分。各個非多肽分子部分可包含聚合物（如，PEG或PAO）或糖類分子部分。在部分情形下，該非多肽分子部分係聚合物分子，諸如，PEG分子。該聚合物分子可具有任何所欲之分子量，取決

於該所欲之功能效應（如，增加之半生期、融合蛋白分子間之較低連結）。在部分情形下，如，該聚合物係具有約1 kDa至約100 kDa Da （如，1、2、2.5、3、5、8、10、12、20、25、30、40、60 kDa, 等）之分子量的PEG。該非多肽分子部分（如，糖類分子部分或聚合物分子部分）係使用如上所述之標準流程而共價連附於該融合蛋白胺基酸殘基之連附基團。例示性之CTLA-4-Ig融合蛋白包括該等包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群（視情形為，如，選自由SEQ ID NOS:197、199、211及213所組成之群）的多肽序列具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列相同性之多肽序列者，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此等融合蛋白可為單體或二聚體形式。

在另一態樣，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，其包含多肽序列，與選自SEQ ID NOS:1-73之群的多肽序列（諸如，如，SEQ ID NOS:36及50）具有至少約94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之相同性，其中該多肽係以介於約1至約200 mg/ml （w/v）範圍之濃度存在；（b） 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 8.0間之緩衝能力，濃度為介於約5 mM至約50 mM之範圍；（c） 醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；（d） 糖，其濃度係以重量計約0.5%至約10%；（e） 鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；及（f） 視情形之清潔劑；其中該pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍。在部分此等醫藥組合物中，（a）該多肽包含SEQ ID NO:36之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；（b） 該緩衝劑係HEPES緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；（c） 該醫藥可接受之稀釋劑係水；（d） 該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；（e） 該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM；及（f） 其視情況自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-40、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群選擇清潔劑，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml，其中該組合物之pH係約7.4。在

另一此等醫藥組合物中，(a) 該多肽包含SEQ ID NO:50之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；(b) 該緩衝劑係檸檬酸鈉緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；(c) 該醫藥可接受之稀釋劑係水；(d) 該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；(e) 該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM；及 (f) 其視情況自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-40、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群選擇清潔劑，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml，其中該組合物之pH係約6.5。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) HEPES或檸檬酸鈉緩衝劑（如，檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸鈉-檸檬酸混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸一鈉-檸檬酸二鈉混合物或檸檬酸-檸檬酸一鈉混合物）。

其亦提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) 醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約7至約8之pH值。部分此等醫藥組合物具有約7.4或7.5之pH值。部分此等醫藥組合物包含HEPES或檸檬酸鈉緩衝劑。

其亦提供一種醫藥組合物，其包含 (a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) 檸檬酸鈉緩衝劑（如，檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸鈉-檸檬酸混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸一鈉-檸檬酸二鈉混合物或檸檬酸-檸檬酸一鈉混合物）。

其亦提供一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及 (b) 醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約6至約7之pH值。部分

此等醫藥組合物具有約6.5之pH值。部分此等醫藥組合物包含檸檬酸鈉緩衝劑。

在一例示性之範疇中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含自約1 mg/ml至約300 mg/ml之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-54-IgG2）（如，約1 mg/ml至約100 mg/ml，如，約50 mg/ml或約100 mg/ml），其一般而言係以二聚體融合蛋白之形式表現，包含在下列之中：20 mM HEPES緩衝劑於水中，100 mM NaCl，根據該組合物以重量計2%之蔗糖，pH 7.4，視情況包括非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml ，並視情況包括聚乙二醇（PEG），諸如，具有自約200道耳吞（Da）至約8000 Da （如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da，可自Dow Chemical取得）分子量之PEG分子。在另一例示性之範疇中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含自約1 mg/ml至約300 mg/ml之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白（如，D3-69-IgG2），其一般而言係以二聚體融合蛋白之形式表現，包含在下列之中：20 mM檸檬酸鈉緩衝劑於水中，100 mM NaCl，根據該組合物以重量計2%之蔗糖，pH 6.5，視情況包括非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml ，並視情況包括PEG分子，諸如，具有自約200 Da至約8000 Da （如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da，可自Dow Chemical取得）分子量之PEG分子。

本發明包括用以包含本發明組合物之容器，該組合物包含本發明之分子（如，突變CTLA-4分子，諸如，突變CTLA-4-Ig），以及賦形劑、稀釋劑或載體。該組合物可為醫藥組合物，其包含本發明之分子，以及醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。容器包括，但不限於，如，小瓶（如，玻璃小瓶，諸如，第I型玻璃小瓶）、自動注射器、筆形注射器（固定劑量或可變劑量）或預裝填針筒，

或是其他適當之容器。如需要，容器可含有一或多份可如本文他處所述而有效抑制免疫反應或是治療免疫系統疾病或病症之預定劑量之本發明分子。部分此等容器可用於對罹患免疫疾病或病症之對象投與其中所含之組合物（如，自動注射器、筆形注射器、預裝填針筒等）。部分此等容器可容許該對象自行投與該組合物（如，筆形注射器、自動注射器、預裝填針筒等）。

其亦提供本發明分子（如，突變CTLA-4 ECD或突變CTLA-4-Ig）之安定組合物或調配物，其包括本發明分子之醫藥可接受性組合物，以及醫藥可接受之載體。在另一態樣中，本發明包括冷凍乾燥或凍乾之組合物或調配物。名辭「冷凍乾燥」或「凍乾」一般而言係指一物質之狀態，該物質已經諸如冷凍乾燥或凍乾之乾燥流程處理，其中已除去至少50%之水分。預凍乾及凍乾流程係為技藝中所熟知（參見，如，Lyophilization of Biopharmaceuticals [生物醫藥之凍乾], Vol. 2 of Biotechnology: Pharmaceutical Aspects [生物技術：醫藥範疇 第2冊]（Henry R. Costantino et al. eds., 2004），U.S. 6,436,897，WO 06/104852），且可為熟習技藝者輕易明瞭。熟習技藝者可使用或隨需要修飾任何適當之凍乾流程，以製備本發明之凍乾組合物。冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾之組合物通常係自液體製備，諸如，溶液、懸浮液、乳液等。該待進行冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾之液體一般而言包括欲存在於該終重構液體組合物中之所有組成份（除外該液體，如，水）。以此方式，該經冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾之組合物再重構時將會具有所欲之液體組合物（如，醫藥組合物）。包含本發明分子（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，諸如，如，SEQ ID NO:197、199、211或213）之例示性組合物（包括醫藥組合物），其述於本申請案之全文，可藉著使用技藝中已知之標準流程而冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾，以分別產生安定之冷凍乾燥、風乾、噴霧乾燥或凍乾組合物。參見，如，述於Lyophilization of Biopharmaceuticals [生物醫藥之凍乾], 上述文獻之例示性流程。

舉例而言，含有本發明分子（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，諸如，如，SEQ ID NO:197、199、211或213）之液體組合物的容器（如，小瓶，諸如，玻璃小瓶）可使用一般熟習技藝者所知之標準流程而進行凍乾。參見，如，述於Lyophilization of Biopharmaceuticals [生物醫藥之凍乾], 上述文獻。該經凍乾之本發明分子（如，本發明之突變CTLA-4-Ig）接著可以液體重構，以產生重構之液體組合物。凍乾調配物一般而言係藉由加入水溶液溶解該凍乾調配物而進行重構。可使用任何適當之水性液體或溶液而重構凍乾調配物。凍乾調配物通常係使用無菌或蒸餾水而重構，但包含載體、賦形劑、稀釋劑、緩衝劑及/或其他組成份（包括全文所述者）之溶液亦可用於進行重構。

在一態樣中，本發明提供一種凍乾形式之醫藥組合物，其中該組合物包含自約1 mg/ml至約300 mg/ml之本發明CTLA-4-Ig融合蛋白，其通常係以二聚體融合蛋白形式表現，包含在下列之中：水中之適當緩衝劑（如，HEPES、檸檬酸二鈉-檸檬酸三鈉等），其濃度可維持所欲之pH值（如，pH 6.0至約pH 7.5），鹽（如，50 mM NaCl），糖（如，根據該組合物以重量計4-6%之蔗糖），並視情況包括非離子性清潔劑（如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68），其濃度為約0.01 mg/ml至約0.5 mg/ml，如，約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml （如，Tween®-20、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68）。相較於未凍乾之液體組合物，凍乾形式之醫藥一般而言包括較低之鹽濃度及較高之糖濃度。

在一特定態樣中，本發明提供一種用於在以無菌水重構時進行治療性投藥之安定凍乾組合物，其包含治療有效量之本發明分子以及視情況之一或多種下列醫藥可接受之組成份：（a） 糖或醣，諸如，蔗糖、甘露糖、葡萄糖或海藻糖，其量係自以重量計約1%至以重量計約10%；（b） 清潔劑或乳化劑，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68；（c） 等滲劑或鹽，諸如，無機鹽（如，氯化鈉），其濃度為自0 mM

至約50 mM（包括，如，述於上文之濃度）；(d) 適當之緩衝劑，以使該組合物之pH維持在有助於該分子之安定性的範圍中；(e) 分散劑（如，其量足以進行本發明分子之長期分散，諸如，如，自0.001 w/v%至約1.0 w/v%）（如，聚山梨醇酯，諸如，Tween®-20、Tween®-40、Tween®-60、Tween®-80或pluronic F-68。）；及(f) 安定劑，如，醣類、葡聚糖、低分子量（MW）PEG基團（諸如，具有自約200 Da至約8000 Da（如，約200、300、400、600、900、1000、1450、3350、4500或8000 Da）MW之PEG）或防腐劑。在部分此等安定凍乾組合物中，本發明之分子係重組或分離之本發明融合蛋白，諸如包含與至少一種選自由SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222所組成之群（視情形為，如，選自由SEQ ID NOS:197、199、211及213所組成之群）的多肽序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列相同性之多肽序列的融合蛋白，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，以及/或是可抑制免疫反應。此等融合蛋白可為單體或二聚體形式。

各個此等組成份在該凍乾組合物中之例示性含量包括該等述於上文及本文者。在一態樣中，該緩衝劑係經選擇，以使該組合物之pH維持在介於自約pH 3至約pH 8、自約pH 至約pH 7.5之範圍中。包含本發明重組突變CTLA-4-Ig融合蛋白之凍乾組合物一般而言係在-80°至+40°C為安定，以及/或是在貯存於室溫下（如，約22°C至約30°C）時可實質上維持其生物活性至少一週、一或多個月（如，六個月）、一年、兩年、三年、四年或以上。在以液體（如，注射用無菌水（WFI））重構時，該凍乾組合物即適於對一對象（如，人類）進行投藥（如，i.v.、s.c.、腸外、i.m.、i.d.、i.p.等）。

本發明亦提供套組，其在第一容器（如，小瓶，諸如，玻璃小瓶）中包含一凍乾或冷凍乾燥之組合物，該組合物包含凍乾或冷凍乾燥之本發明分子（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白，諸如，如，SEQ ID NO:197、199、211或213），以及關於使用液體（如，無菌水、WFI或緩衝液）重構該冷凍乾燥或凍乾組合物之指示。視情況

者，該套組包含第二容器（如，小瓶，諸如，玻璃小瓶），其含有用以使該凍乾或冷凍乾燥組合物重構成為液體組合物之足量液體（如，無菌水、WFI或緩衝液）。在此情形下，重構係藉著使用針筒自該第二容器取出所欲體積之水，並將該水引入該第一容器中。接著溫和震盪該第一容器，以使該本發明之分子（如，融合蛋白）成為溶液。該套組可包括用以重構該凍乾或冷凍乾燥組合物及/或投藥該重構液體組合物之裝置。例示性之裝置包括，但不限於，如，雙組份混合針筒、雙腔針筒及雙腔自動注射器。其中一個組份或腔含有該凍乾組合物，且該第二組份或腔含有該用以進行重構之液體。使用此等裝置，重構一般而言係在投藥之前即時進行，且該重構組合物通常係經常外投與（如，s.c.、i.v.、i.m.、i.d.注射）。

本發明之組合物或醫藥組合物可包含脂質體或可為脂質體之形式。脂質體調配物用之適當脂質包括，但不限於，單酸甘油脂、雙酸甘油脂、硫脂、溶血卵磷脂、磷脂、皂苷、膽酸及其類似者。此等脂質體調配物之製備述於，如，美國專利第4,837,028及4,737,323號。

該等組合物或醫藥組合物之形式可（至少部分）由該目標多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP或細胞之投與途徑指定。由於諸多投與途徑皆係可能，該醫藥組合物之形式及其組成份可各有不同。舉例而言，在穿黏膜或穿皮投與中，可將適於該待滲透屏障之滲透劑包括在該組合物中。此等滲透劑係技藝中廣泛已知者，且其包括，例如，就穿黏膜之投與而言，清潔劑、膽酸及梭鏈孢酸衍生物。相對的，穿黏膜之投與可經由使用鼻噴劑或栓劑而協助進行。

本發明組合物（包括醫藥組合物）之常用投與形式係藉由注射進行。可注射之醫藥可接受性組合物一般而言包含一或多種適當之液體載體，諸如，水、石油、生理鹽水、制菌水、Cremophor ELTM （BASF, Parsippany, NJ）、PBS或油。液體醫藥組合物可進一步包括生理鹽水溶液、葡萄糖（或其他醣溶液）、醇（如，乙醇）、

多元醇（多元醇，諸如，甘露糖醇、山梨糖醇等）或二醇（諸如，乙二醇、丙二醇、PEG分子）、可促進適當流動性之塗覆劑（諸如，卵磷脂）、等滲劑（諸如，甘露糖醇或山梨糖醇）、有機酯（諸如，油酸乙酯）、以及吸收延遲劑（諸如，單硬脂酸鋁及明膠）。該可注射組合物可為無致熱原安定水溶液之形式。可注射之水溶液可包含等滲載劑，諸如，氯化鈉、林格氏（Ringer's）注射溶液、葡萄糖、乳酸化林格氏注射溶液或是相當之遞載劑（如，氯化鈉/葡萄糖注射溶液）。適於以動脈內、靜脈內、肌內、皮內、真皮下、腹膜內及皮下途徑進行注射之調配物包括水性及非水性之等滲無菌注射溶液，其可包括溶劑、共溶劑、抗氧化劑、還原劑、螯合劑、緩衝劑、制菌劑、抗微生物防腐劑及可使該調配物與該目標接受者之血液等滲之溶質（如，PBS及/或鹽水溶液，諸如，0.1 M NaCl），以及水性及非水性之無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、乳化劑、安定劑及防腐劑。

本發明多肽、複合物、核酸、載體、病毒、假病毒、VLP或細胞（或是包含任何此等組成份之組合物）之投與可以由任何適當材料所形成之傳遞裝置進行。用以製備非生物可降解性投與裝置之適當基質材料包括羥基磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽或其他陶瓷。在部分應用中，可使用鉗合劑（諸如，羧甲基纖維素（CMC）、甲基纖維素或羥丙基甲基纖維素（HPMC））以使該特定組成份結合該裝置而進行定位傳遞。

本發明之核酸或載體可與一或多種泊洛沙姆（poloxamer）、聚氧乙烯/聚氧丙烯嵌段共聚物或是其他界面活性劑或似皂親脂性物質共同調配，以用於將該核酸或載體傳遞至對象之細胞種群或組織或皮膚。參見，如，美國專利第6,149,922、6,086,899及5,990,241號。

本發明之核酸或載體可連結一或多種轉染增進劑。在部分具體實例中，本發明之核酸及/或核酸載體一般而言係連結一或多種可協助轉染之安定促進性鹽類、載體（如，PEG）及/或調配物（如，磷酸鈉鹽、葡聚糖載體、氧化鐵載體或生物彈道傳遞（「基因槍」）

載體，諸如，金珠或粉末載體）。參見，如，美國專利第4,945,050號。其他轉染增進劑包括可複合該核酸或核酸載體之病毒顆粒、磷酸鈣沈澱劑、蛋白酶、脂酶、bipuvicaine溶液、皂苷、脂質（如，帶電荷脂質）、脂質體（如，陽離子脂質體）、轉染協助肽或蛋白複合物（如，聚（乙烯亞胺）、聚離胺酸或病毒蛋白-核酸複合物）、病毒脂質體（virosome）或經修飾之細胞或似細胞結構（如，融合細胞）。

本發明之核酸或載體亦可以活體內或活體外之電穿孔法傳遞，包括，如，該等述於美國專利第6,110,161及6,261,281號以及Widera et al., J. of Immunol. 164:4635-4640 （2000）者。

本發明組成份（如，本發明之多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞）之穿皮投與可以穿皮貼布協助進行，該貼布包含任何適當形式之任何適當組合之此等組成份。本發明提供此等穿皮貼布裝置。舉例而言，此種組成份可包含在藥物貯存貼布裝置中之液態貯物中，或是，替代言之，該組成份可分散在適於納入簡單單片穿皮貼布裝置中之材料中。一般而言，該貼布包含免疫抑制量之至少一種此等組成份—諸如可有效在接觸該貼布之對象體內抑制免疫反應之量。此等貼布裝置之實例係為技藝中所已知。該貼布裝置可為被動裝置或是可使至少一種此等組成份以離子導入傳遞至該對象之皮膚或組織之裝置。

組合物（特別係醫藥組合物）可包含任何足以在投藥之後在該對象體內達成所欲免疫抑制反應之適當劑量的至少一種本發明之此等組成份（如，多肽、複合物、核酸、載體、病毒、VLP及/或細胞）。適當之劑量可以任何適當技術判定，且用以判定適當者之考量係為技藝中所已知。在一簡單之劑量試驗療程中，其係將低劑量之該組合物投與至試驗對象或系統中（如，動物模式、無細胞系統或全細胞分析系統）。劑量常以該待投與特定組成份之功效、該對象之病況、該對象之體重及/或該待治療對象之目標區域而判定。該投劑之大小亦可以特定對象體內伴隨任何此等特定組成份投與之任何負面副作用之存在、性質及程度而判定。有關治

療及預防劑之劑量的原則提供於，如，Platt, Clin. Lab Med. 7:289-99（1987），“Drug Dosage [藥物劑量],” J. Kans. Med. Soc. 70（1）:30-32 （1969），以及其他本文所述之參考文獻（如，Remington's, 上述文獻）。

舉例而言，用於作為治療自體免疫疾病起始投劑之本發明多肽之治療有效量可包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約100 mg/kg body該對象體重，諸如，如，自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至約100 毫克每公斤（mg/kg）該對象體重，或是，如，自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90或100 mg/kg該對象體重。此等投劑可以任何適當操作流程進行，如，諸如，每日、每週或每雙週投與，或其任何組合（如，間隔約0、1、2、4、5、6及7天，在其後每週，或是間隔約0、1、2、4及6週），接續1-、2-、3-個月之間期，且可以任何適當之傳遞方法進行，諸如，如，以電穿孔或是皮下（s.c.）、肌內（i.m.）、靜脈內（i.v.）或腹膜內（i.p.）、真皮下、穿皮、腸外或皮內（i.d.）注射進行。在部分情形下，本發明之多肽一般而言係以可溶性多肽之形式投與，諸如，如，包含共價連結Ig Fc多肽之本發明突變CTLA-4 ECD多肽的融合蛋白。舉例而言，包含醫藥可接受之載體、稀釋劑或賦形劑中之本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白的醫藥組合物可以任何適當之途徑（如，經由皮內、靜脈內或皮下），以根據該待治療自體免疫疾病（如，類風濕性關節炎）或病況（如，為抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或實體器官移植之排斥）而決定之有效量進行投與。

在一例示性之態樣中，本發明提供一種在需要該方法之對象體內抑制免疫反應之方法，其包含對該對象投與一醫藥組合物，該醫藥組合物包含，如，自約1 mg/ml至約300 mg/ml ，包括自約25 mg/ml至約150 mg/ml （如，50或100 mg/ml）之D3-54-IgG2融合蛋白，包含在下列之中：20 mM HEPES緩衝劑於水中，100 mM

NaCl，以重量計2%之蔗糖，pH 7.4，其中該對象罹患自體免疫疾病（如，類風濕性關節炎）。在另一例示性之態樣中，本發明提供一種在接受者對象體內抑制對於來自捐贈者之組織、細胞、移植物或實體器官移植之排斥的方法，其包含對該接受者對象投與一醫藥組合物，該醫藥組合物包含，如，自約25 mg/ml至約100 mg/ml（如，50或100 mg/ml）之D3-69-IgG2融合蛋白，包含在下列之中：20 mM檸檬酸鈉緩衝劑於水中，100 mM NaCl，以重量計2%之蔗糖，pH 6.5。

其亦提供一種病毒載體組合物，其包含載體或賦形劑，以及本發明之病毒載體。其亦提供包含醫藥可接受之載體或賦形劑以及病毒載體之醫藥組合物。病毒載體顆粒或病毒載體顆粒編碼性核酸之量或劑量取決於：(1) 就載體來源而言之病毒載體顆粒類型，其包括，但不限於，如，該載體係α病毒載體、Semliki-Forest病毒載體、腺病毒載體、腺相關（AAV）病毒載體、黃病毒載體、乳頭狀瘤病毒載體及/或單純皰疹病毒（HSV）載體，(2) 該載體係轉基因表現性載體或重組肽展示性載體，(3) 該宿主，及 (4) 其他如上所論之考量。一般而言，就基因轉移載體而言，該醫藥可接受之組合物在約1 ml之體積內包含至少約1 x 10^2個病毒載體顆粒（如，在約1 ml之內至少約1 x 10^2至1 x 10^8個顆粒）。較高之劑量亦可為適用（如，至少約1 x 10^6、約1 x 10^8、約1 x 10^9、約1 x 10^{10}個顆粒/ml）。

本發明亦提供一種組合物（包括醫藥組合物），其包含二或多個本發明之多肽或複合物之凝聚物。同時，本發明提供一種組合物（包括醫藥組合物），其包含一群之一或多個本發明之多聚體多肽或多聚體複合物。如上所註記，醫藥組合物包括醫藥可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。

套組

本發明亦提供套組，其包括一、二、三種或以上之本發明多肽（如，突變CTLA-4 ECD多肽、突變CTLA-4-Ig融合蛋白，包括

二聚體融合蛋白）、複合物、核酸、載體、細胞及/或組合物。本發明之套組視情況包含：（1） 至少一種本發明之多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體、VLP、細胞及/或組合物；（2） 視情況之至少一種第二免疫抑制劑（如，非類固醇抗炎劑、胺甲蝶呤、類固醇、TNFα拮抗劑等）；（3） 用以實施任何本文所述方法之指示，包括治療或預防方法，以及用以使用任何在（1）或（2）中所辨識組成份之指示；（4） 用以容納至少一種該等在（1）或（2）中所辨識組成份之容器；及/或（5） 包裝材料。可將一或多種本發明之多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體、VLPs、細胞及/或組合物，視情況結合一或多種第二免疫抑制劑，包裝在包裝組、分配裝置及套組中，以對一對象進行投與，諸如，哺乳動物，包括人類。其指定用於該所指定治療或預防方法之各個此等本發明之多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體、VLP、細胞及/或組合物或是該視情況之第二免疫抑制劑的有效量（如，劑量），並提供一或多份此等劑量。該一或多種多肽（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）、複合物、核酸、載體及/或細胞組合物以及（如需要）該視情況之第二免疫抑制劑可以粉末（如，凍乾）或液體形式提供，且其可結合賦形劑或載體而調配（包括，如，醫藥可接受之賦形劑或載體），因而形成組合物（包括，如，醫藥組合物）。其提供包含一或多份單元劑形之包裝組或分配裝置。一般而言，用以投與此等組成份之指示係與該包裝一同提供，同時在標籤上提供適當之標示，說明該化合物適於治療該所指定之病況。

實例

下述之實例進一步說明本發明，但不應以任何方式視為限制其範圍。

實例1

此實例提供用以創造LEA29Y-Ig融合蛋白之方法的敘述，該多肽係在Biacore™結合分析及細胞基礎性活性分析中作為控制組及

用於比較目的。

創造編碼LEA29Y-Ig融合蛋白之DNA質體載體

此實例敘述編碼LEA29Y-Ig融合蛋白之DNA質體載體的製備。LEA29Y-Ig包含一種特定之已知突變CTLA-4 ECD多肽，稱為"LEA29Y"（或"LEA"或"L104EA29Y"或"A29YL104E"），其在其C-端共價連結一種特定突變人類IgG1 Fc多肽之N-端。該LEA29Y多肽係一種突變CTLA-4 ECD多肽，其包含與人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有兩個突變之差異的多肽序列—A29Y取代及L104E取代—其中位置29及104係參照該人類CTLA-4 ECD多肽之多肽序列而編號，以人類CTLA-4之第一胺基酸殘基指定為胺基酸殘基位置1。參見U.S. 7,094,874。創造質體載體pCDNA3.1-LEA（其包括編碼LEA29Y-Ig之核苷酸序列）以製備此融合蛋白。

使用根據其與示於SEQ ID NO:167之編碼LEA29Y-Ig之核苷酸序列間的同源性而設計之重疊寡核苷酸，以PCR組合創造編碼LEA29Y-Ig之DNA。該等寡核苷酸係以一般熟習技藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。參見，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。

該等寡核苷酸係在100 µl之PCR反應中，以1 µM寡核苷酸、1x Taq 緩衝液（Qiagen; #201225）及200 µM dNTPs，進行30個擴增循環（94°C，30 s；60°C，30 s；72°C，60 s）而組合。將經擴增之DNA以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen, Cat. #28104）純化，並以限制酶*NheI*及*SacII*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議進行純化，並將其接合進入經類似酶切消化之質體pCDNA 3.1（+）（Invitrogen, Cat. #V790-20）中。根據製造商之建議，使接合物轉形進入TOP10大腸桿菌細胞（Qiagen, Cat. #C4040-10）中。使該等所得之細胞，在含有50 µg/ml羧苄青黴素之LB培養基中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接

著以其製備質體DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液（其在後文中稱為質體載體pCDNA3.1-LEA）。

該質體載體pCDNA3.1-LEA係與示於圖1之質體載體pCDNA突變CTLA-4-IgG2載體相同，除外該編碼突變CTLA-4-IgG2多肽之核酸序列已經編碼LEA29Y-Ig融合蛋白之核酸序列置換。其包括編碼人類CTLA-4信號肽之核酸作為信號肽編碼性核苷酸序列。

編碼該預測LEA29Y-Ig融合蛋白之核酸序列示於SEQ ID NO:167。SEQ ID NO:167包括編碼信號肽之核苷酸序列（如，SEQ ID NO:165之胺基酸殘基1-37）。該預測LEA29Y-Ig及成熟LEA29Y-Ig融合蛋白（無該信號肽）之多肽序列分別示於SEQ ID NOS:165及166。如圖2C所指出，LEA29Y-Ig之預測胺基酸序列包括下列節段：預測之信號肽（胺基酸殘基1-37）、LEA29Y ECD多肽（胺基酸殘基38-161）、連接子（胺基酸殘基162）及人類IgG1多肽之突變（經修飾） Fc域（胺基酸殘基163-394）。位在此等不同節段間接合處之胺基酸殘基亦示於圖2C。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該LEA29Y ECD之首五個及末五個胺基酸殘基、該單一連接子胺基酸殘基（Q）及該突變IgG1 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。

該信號肽一般而言會在加工過程中受到切除，並因此該LEA29Y-Ig之分泌融合蛋白（亦即，成熟融合蛋白）通常並不含有該信號肽序列。該LEA29Y-Ig之成熟/分泌形式（其具有總共357個胺基酸）包含示於SEQ ID NO:165之預測序列之胺基酸殘基38-394（無該信號肽之全長序列），並係以胺基酸序列：甲硫胺酸-組胺酸-纈胺酸-丙胺酸起始。SEQ ID NO:165在其N-端包括該信號肽（如，殘基1-37）；該一般而言會受到切除以形成示於SEQ ID NO:166之成熟蛋白。如需要，該成熟形式之胺基酸可以該Met-His-Val-Ala序列之Met起始編號，將Met指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-124之胺基酸殘基），如在該具有示於SEQ ID NO:166之序列的成熟LEA29Y-Ig融合蛋白中者。在一態樣中，SEQ ID NO:165或166之序列並不包括該C-端離胺酸殘基；此殘基

可在加工過程或在分泌之前受到切除。

LEA29Y-Ig融合蛋白之蛋白序列述於U.S. 7,094,874。具體言之，U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:4顯示編碼非成熟形式單體LEA29Y-Ig之蛋白序列。在U.S. 7,094,874中，該LEA29Y-Ig融合蛋白係稱為"L104EA29YIg"。該包含示於本文所述SEQ ID NO:166之序列的成熟LEA29Y-Ig融合蛋白與示於U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:4的融合蛋白序列不同，因U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:4包括信號肽（亦即，SEQ ID NO:4之殘基1-26）。此一信號肽一般而言會在加工過程中受到切除，並因此該成熟(分泌)形式之LEA29Y-Ig融合蛋白通常並不包括該信號肽序列。U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:3提出編碼該L104EA29YIg融合蛋白（亦即，LEA29Y-Ig）之核酸序列。

LEA29Y-Ig一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟LEA29Y-Ig融合蛋白包含一LEA29Y ECD （SEQ ID NO:168）多肽，其以其C-端融合突變IgG1 Fc （SEQ ID NO:186）之N-端。該兩個LEA29Y-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該LEA29Y-Ig二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白形式。

創造表現LEA29Y-Ig融合蛋白之穩定CHO-K1細胞系

其創造一穩定之細胞系，以產生多毫克量之上述LEA29Y-Ig融合蛋白。

CHO-K1細胞之轉染

將CHO-K1細胞以1 x 10^6細胞/ml之密度，播種於含有40 ml生長培養基（添加10%胎牛血清（FBS）（Hyclone, #SV30014.03）及1x PS（青黴素+鏈黴素）(Invitrogen, #15140-122)之DMEM/F12培養基（Invitrogen, #10565-018））之T-175燒瓶（BD Falcon,

#353112）中。在37°C下培育細胞24小時（hrs），再接著以混合60 µl Fugene 6（Roche, #11814443001）之10 µg Maxiprep質體DNA（如，如上所述編碼LEA29Y-Ig之質體載體），根據製造商之建議條件而進行轉染。在37°C下於生長培養基中培育細胞2天（d），再接著於選擇培養基（含有300 µg/ml遺傳黴素（Geneticin）（Invitrogen, #10131-027）之生長培養基）中培育10 d，每2 d更換培養基。除去培養基，並藉著加入3 ml之0.05%胰蛋白酶（Invitrogen, Cat. #25300-054）而分散細胞，再在37°C下共置3 min。將經分散之細胞稀釋進入10 ml之生長培養基中，並在室溫（RT）下，於GH-3.8轉子（Beckman Coulter, #360581）中，以1000 rpm離心5 min而進行收集。在除去上清液後，使細胞懸浮於1 ml之生長培養基中，通過40 µm濾膜（BD Falcon, #352340）進行過濾，並調整至1 x 10^6細胞/ml之密度。

獨特純系之分離

使用細胞分選器（Dako, MoFlo），將活細胞個別分散進入96孔培養盤（Sigma-Aldrich, #CLS-3596）中，該盤含有200 µl/孔之含有25%條件培養基（先前自未經轉染（或天然）細胞培養物所收集之生長培養基）之生長培養基。在37°C下培育10-14 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有200 µl/孔之生長培養基的新培養盤中。在37°C下於生長培養基中培育細胞，直到細胞密度達到70%鋪滿為止（約14 d，每7 d更換培養基）。

所欲純系之辨識

以點漬及西方分析辨識表現高含量重組LEA29Y-Ig融合蛋白之純系。就點漬分析而言，自該96孔培養盤之各孔收集100 µl之培養基，並根據製造商之建議而使其轉移至硝基纖維素膜（Whatman, #10439388）。在室溫（RT）下以200 ml之PBST（PBST係磷酸緩衝鹽水（PBS）+0.05% Tween®-20）清洗膜10分鐘共兩次，接著在RT下與含有5% 脫脂奶粉（EMD, #1.15363.0500）之PBST共置1

小時（hr）。如上所述清洗膜，再在RT下於含有稀釋至1:4000之辣根過氧化酶（HRP）-複合性山羊抗人類Ig抗體（Vector Labs, #BA-3000）之20 ml PBST中共置1 hr。如上所述清洗膜，再在RT下與含有稀釋至1:2000之鏈黴親和素-HRP試劑（BD Biosciences, #554066）之PBST共置1 hr。如上所述清洗膜，再使用ECL西方點漬偵測試劑（Amersham, Cat. #RPN2132），根據製造商之建議條件而偵測信號。將由高信號強度（亦即，表現高含量之融合蛋白）所辨識之陽性純系以胰蛋白酶水解而進行分散，再將其移至含有2 ml/孔之生長培養基的6孔培養盤（BD Falcon, Cat. #353046）中。在37°C下培育3-4 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有20 ml生長培養基之T-75燒瓶（BD Falcon, Cat. #353136）中。在37°C下培育2 d後，收集100 μl之培養基，並以西方分析進行蛋白表現量之分析。就西方分析而言，根據製造商之建議條件，使取自各個細胞培養物之等量（15 μl）培養基，通過MES （MES係2-（N-嗎啉基）乙烷磺酸，pH 7.3）移動緩衝液（Invitrogen, #NP0002）中之4-12% Bis-Tris NuPAGE凝膠（Invitrogen, #NP0322BOX）進行移動。根據製造商之建議條件，以電轉移使蛋白自凝膠轉移至硝基纖維素膜（Invitrogen, Cat. #LC2001）。如上點漬分析所述處理膜，並以信號強度及表觀分子量辨識陽性純系（表現目標融合蛋白）。如上所述以胰蛋白酶水解而分散陽性純系，並在含有40 ml生長培養基之T-175燒瓶中進行繁殖。

製備及純化LEA29Y-Ig融合蛋白

滾瓶培養物之繁殖

使已如上所述經由編碼目標融合蛋白之核酸轉染的穩定CHO-K1細胞系在含有40 ml生長培養基（添加10%胎牛血清（FBS）（Hyclone, #SV30014.03）及1x PS （Invitrogen, #15140-122）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, #10565-018））之T-175燒瓶中生長至鋪滿。藉著在37°C下於3 ml之0.05%胰蛋白酶（Invitrogen, Cat. #25300-054）中共置3 min而收集細胞，將其稀釋至12 ml之生長培

養基中，再接著將其移至含有250 ml生長培養基之滾瓶（Corning, Cat. #431191）中。在37°C下於溼潤之滾動式恆溫培育箱中培育該等滾瓶培養物2 d後，除去培養基，並以250 ml之新鮮生長培養基置換。在37°C下培育該等培養物2 d後，以250 ml之UltraCHO培養基（添加1/1000 EX-CYTE （Serologicals Proteins, Cat. #81129N）及1x PS之UltraCHO培養基（BioWhittaker, Cat. #12-724））置換培養基。在37°C下培育2 d後，以250 ml之新鮮UltraCHO培養基置換培養基。在37°C下培育2 d，接著以250 ml之製備培養基（添加1/100x ITSA （Life Technologies #51300-044）, 1/1000x EX-CYTE及1x PS之DMEM/F-12培養基）置換培養基。在製備過程中，收集培養基，並每隔一天以新鮮之製備培養基置換。

蛋白純化

在RT下以2500 x g離心30 min，接著通過0.2 μM濾膜（VWR, Cat. #73520-986）進行過濾，使取自滾瓶培養物之製備培養基變為澄清。使用10 kDa MWCO濾膜（Millipore, Cat. #P3C010C00），以切向流過濾將培養基濃縮10倍，接著以其使用BioCad vision HPLC系統進行蛋白-A親和層析。使Ig-融合蛋白連結PBS緩衝液中之Poros 20 蛋白-A樹脂 （Applied Biosystems, Cat. #1-5029-01），以相同緩衝液清洗，以含有160 mM氯化鈉之80 mM檸檬酸緩衝液（pH 4.0)溶析，再接著加入2M Tris鹼而進行中和。最後使用10 kDa MWCO濾膜（Pierce, Cat. #PI66810），使該蛋白溶液對抗6升（l）之PBS進行透析。

實例2

此實例敘述用以噬菌體展示法創造並篩選CTLA-4突變分子庫之變更人類CD80及/或人類CD86結合活性之例示性方法。

人類CD80-Ig融合蛋白

在噬菌體淘選及噬菌體ELISA實驗中，使用人類CD80-Ig（"hCD80-Ig"）及人類CD86-Ig （"hCD86-Ig"）融合蛋白作為配

位體，以辨識可結合人類CD80 （“hCD80”）及/或人類CD86（“hCD86”）以及/或是其任一或兩者之胞外域的突變CTLA-4分子。人類CD80-Ig（亦稱為“hB7.1-Ig”或“hB7-1-Ig”）及人類CD86-Ig（亦稱為“hB2.1-Ig” or “hB2-1-Ig”）融合蛋白可自R&D Systems（Minneapolis, MN）取得。

編碼預測WT人類CD80-IgG1融合蛋白（其包含人類CD80信號肽、人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc）之代表性核酸序列示於SEQ ID NO:172。hCD80-IgG1融合蛋白之預測及成熟多肽序列分別示於SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171。示於SEQ ID NO:170之預測融合蛋白包含以其C-端共價融合人類IgG1 Fc多肽之N-端的WT人類CD80 ECD，並在其N-端包括信號肽。該信號肽一般而言會自示於SEQ ID NO:171之成熟CD80-Ig融合蛋白切除。

人類CD80-IgG1一般而言在本文中縮寫為hCD80-Ig。如圖2A所示，hCD80-Ig融合蛋白（亦指名為“CD80-IgG1”）之預測胺基酸序列包括下列節段：預測之信號肽（胺基酸殘基1-34）、人類CD80 ECD （胺基酸殘基35-242）、連接子（胺基酸殘基243-245）及人類IgG1 Fc多肽（胺基酸殘基246-476）。位在此等不同節段間接合處之胺基酸殘基亦示於圖2A。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該人類CD80 ECD之首五個及末五個胺基酸殘基、該連接子之胺基酸殘基（GVT）及該人類IgG1 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。在該CD80-Ig融合蛋白中，三個殘基GVT存在於該CD80 ECD之C-端（其以胺基酸殘基FPDN結束）與該IgG1 Fc多肽之N-端（其以胺基酸殘基PKSC起始）間作為選殖人造序列（或連接子）。此一GVT選殖人造序列或連接子在分別示於SEQ ID NO:170及171之預測及成熟CD80-Ig多肽序列中顯示。

該信號肽一般而言會在加工過程中受到切除，並因此該hCD80-Ig之分泌融合蛋白（亦即，成熟融合蛋白）通常並不含有該信號肽。該hCD80-Ig之成熟/分泌形式（其具有總共442個胺基酸）包含SEQ ID NO:170之胺基酸殘基35-476 （無該信號肽之全長序列），並係以胺基酸殘基序列：纈胺酸-異白胺酸-組胺酸-纈胺酸起

始。如需要，該成熟形式之胺基酸可以該Val-Ile-His-Val序列之纈胺酸（Val）起始編號，將Val指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-208之胺基酸殘基），如在該包含示於SEQ ID NO:171之多肽序列的成熟形式hCD80-Ig中者。

該hCD80-Ig融合蛋白一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體成熟hCD80-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟hCD80-Ig融合蛋白（SEQ ID NO:171）包含一人類CD80 ECD （SEQ ID NO:174），其以其C-端融合人類IgG1 Fc（SEQ ID NO:185）之N-端。該兩個hCD80-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該hCD80-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該hCD80-Ig融合蛋白二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白分子形式。

編碼該預測全長人類CD80多肽之代表性核酸示於SEQ ID NO:196。示於SEQ ID NO:196之核酸序列編碼人類CD80之信號肽、ECD、穿膜域及胞質域，並在其C-端包括TAA中止密碼子。

人類CD86-Ig融合蛋白

編碼預測人類CD86-人類IgG1 （其一般而言在本文中縮寫為"hCD86-Ig"）融合蛋白之代表性核酸序列示於SEQ ID NO:179。此核酸序列包括一編碼成熟人類CD86-人類IgG1融合蛋白信號肽之核苷酸序列。該hCD86-Ig融合蛋白之預測胺基酸序列示於SEQ ID NO:177，且編碼該預測hCD86-Ig融合蛋白之例示性核酸示於SEQ ID NO:179。

如圖2B所示，hCD86-Ig融合蛋白之預測胺基酸序列包括下列節段：預測之信號肽（胺基酸殘基1-23）、人類CD86胞外域（胺基酸殘基24-243）、連接子序列（胺基酸殘基244-246）及人類IgG1 Fc多肽（胺基酸殘基247-477）。位在此等不同節段間接合處之胺基酸殘基亦示於圖2B。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該人類CD86 ECD之首五個及末七個胺基酸殘基、該連接子之

胺基酸殘基（GVT）及該人類IgG1 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。

該CD86信號肽一般而言會在加工過程中自該預測hCD86-Ig多肽切除，並因此該分泌之人類CD86-Ig融合蛋白（亦即，成熟融合蛋白）通常並不包括該信號肽。該hCD86-Ig之成熟/分泌形式（其具有總共454個胺基酸）包含SEQ ID NO:177之胺基酸殘基24-477（無該信號肽之全長序列），並係以胺基酸殘基序列：丙胺酸-脯胺酸-白胺酸起始。如需要，該成熟融合蛋白之胺基酸可以該Ala-Pro-Leu序列之丙胺酸（Ala）起始編號，將Ala指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-218之胺基酸殘基），如在該包含示於SEQ ID NO:178之多肽序列的成熟形式hCD86-Ig中者。該成熟蛋白（SEQ ID NO:178）包含以其C-端共價融合hIgG1 Fc多肽之N-端的WT hCD86 ECD蛋白。

該hCD86-Ig融合蛋白一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體成熟hCD86-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟hCD86-Ig融合蛋白（SEQ ID NO:178）包含一人類CD86 ECD （SEQ ID NO:180），其以其C-端融合人類IgG1 Fc（SEQ ID NO:185）之N-端。該兩個hCD86-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該hCD86-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該hCD86-Ig融合蛋白二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白分子形式。

在該CD86-Ig融合蛋白中（如，預測及成熟形式），三個殘基GVT存在於該CD86 ECD之C-端與該IgG1 Fc多肽之N-端間作為選殖人造序列（或連接子）。在另一態樣爭，該WT人類CD86 ECD蛋白包含多肽序列，其包含SEQ ID NO:180之胺基酸殘基1-218 （亦即，排除最末兩個C-端胺基酸殘基（PP））。

Orencia®融合蛋白

作為額外之控制組及用於比較目的，購買稱為Orencia®融合

蛋白（Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ）之市售可得融合蛋白。Orencia®融合蛋白係由以其C-端融合特定突變IgG1 Fc多肽之N-端的WT人類CTLA-4胞外域構成。Orencia®蛋白係包含兩個相同單體融合蛋白之二聚體融合蛋白，該等單體融合蛋白係由雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體融合蛋白中所存在之半胱胺酸殘基間形成。各個成熟Orencia®融合蛋白單體之多肽序列示於SEQ ID NO:164，且其係由下列節段構成：WT人類CTLA-4胞外域（胺基酸殘基1-124）、連接子序列（胺基酸殘基125）及突變IgG1 Fc多肽（胺基酸殘基126-357）。各個Orencia®融合蛋白單體具有類似示於圖2C之LEA29Y-Ig融合蛋白單體的結構，除外該LEA29Y ECD經WT人類CTLA-4 ECD置換，且在任一Orencia®融合蛋白單體中皆不存在信號肽，因各個單體皆係分泌或成熟之融合蛋白。非成熟形式Orencia®單體（其包括信號肽）之多肽序列以及編碼該非成熟形式Orencia®融合蛋白單體之核酸序列分別示於U.S. 7,094,874之SEQ ID NO:8及SEQ ID NO:7。用以製備及使用Orencia®融合蛋白之方法亦揭示於U.S. 7,094,874。

創造編碼突變CTLA-4多肽之DNA序列

使用直接發展法而產生編碼重組突變CTLA-4胞外域多肽之重組非天然聚核苷酸庫。諸多天然哺乳動物CTLA-4同源物之蛋白及核苷酸序列係為已知。參見，如，國家生技資訊中心（NCBI）。將在各種天然存在哺乳動物CTLA-4胞外域同源物間所辨識之序列變異性用於直接發展法而產生編碼突變CTLA-4 ECD域多肽之重組聚核苷酸庫。直接發展流程包括，如，活體外之重組及誘變流程，如實質上述於；Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 （1994）；Chang et al., Nature Biotech 17:793-797（1999）；國際專利申請公開案WO 98/27230；以及美國專利第6,117,679及6,537,776號者。

創造編碼突變CTLA-4多肽之DNA序列庫

使用根據序列同源性所設計之正向及反向引子，以PCR，自組合反應物中擴增編碼重組突變CTLA-4 ECD多肽之突變DNA序列。該等引子係以一般熟習技藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。參見，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。例示性之正向及反向引子包括，但不限於，下列之正向引子（5'-ctattgctacggccgctatggccmtkcacgtcgctcaaccagccgtcgtactcgcgtcc-3' ）（SEQ ID NO:191）及反向引子（5'-gtgatggtgatggtgtgcggccgcatcaga-3'） （SEQ ID NO:192）。使用5 μl之組合反應物作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Taq 緩衝液（Qiagen; #201225）及200 μM dNTPs，進行15個擴增循環（94°C 30 s；50°C 30 s；72°C 40 s）。將編碼突變CTLA-4 ECD多肽之經擴增DNA以限制酶（*SfiI*及*NotI*）進行酶切消化，並以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議進行純化，並將其接合進入經類似酶切消化之噬菌體展示載體pSB0124中（其流程類似述於Chang et al., Nature Biotech 17:793-797 （1999）中者）。根據製造商之建議條件，以電穿孔而使該所得之庫轉形進入TOP10大腸桿菌細胞（Invitrogen, Inc; #C4040-50）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB （Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件以其製備庫DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液。

篩選具有改良人類CD80及/或人類CD86結合活性之展示突變CTLA-4多肽之噬菌體庫

產生突變CTLA-4多肽之噬菌體展示庫

根據製造商之建議條件，以電穿孔而使該所得之庫DNA（如，編碼CTLA-4 ECD突變體之DNA序列庫）轉形進入TG-1大腸桿菌細胞（Stratagene; #200123）中。在噬菌質體選擇條件下（含

有50 μg/ml羧苄青黴素之LB培養基），使該培養物生長1-2代，以M13KO7輔助噬菌體（以5-10之感染複數量）進行感染，在噬菌質體（50 μg/ml羧苄青黴素）及輔助噬菌體（70 μg/ml卡那黴素）之雙重選擇下，於37°C下並以250 rpm震盪進行隔夜培育。以離心澄清該等培養物（6000 rpm，15 min，4°C，於Sorvall 600TC轉子中），並使32 ml之培養物上清液與8 ml之PEG/NaCl溶液（20% PEG-8000; 2.5 M NaCl）在冰上共置30 min再進行離心（9500 rpm，40 min，4°C，於Sorvall 600TC轉子中），以沈澱噬菌體顆粒。使該噬菌體沈澱物懸浮於含有1% BSA （牛血清白蛋白，Sigma; #A7906）之1 ml PBS中，移至微離心管中，再以離心澄清（最大轉速，5 min，RT，於Eppendorf桌上型離心器中）。

淘選CTLA-4突變體噬菌體庫

使用標準條件，對噬菌體庫進行對抗hCD80-Ig或hCD86-Ig融合蛋白之共五輪之淘選。參見，如，Lowman, et al., Biochemistry 12;30（45）:10832-10838 （1991）; Smith, G.P. et al., Chem. Rev. 97:391-410 （1997）。各輪之淘選包括：（a） 使該噬菌體展示性突變CTLA-4 ECD多肽與hCD80-Ig或hCD86-Ig配位體結合;（b）除去未連結之噬菌體;（c） 溶析連結之噬菌體；及（d） 擴增該經溶析之噬菌體以進行下一輪之淘選。使取自各輪之一小份噬菌體轉導進入大腸桿菌細胞中，以取得個別轉導株之純系。

以噬菌體ELISA辨識具有改良人類CD80及/或人類CD86結合性之CTLA-4突變體

將取自各輪淘選之個別純系接種進入含有150 μl/孔之含有50 μg/ml羧苄青黴素之2 x YT （酵母菌-胰蛋白腺）培養基的96孔培養盤（NUNC; #243656）中，再於37°C下並以250 rpm震盪進行隔夜培育。使用該等隔夜培養物以接種含有600 μl/孔之該相同培養基之深孔塊（Scienceware; #378600001）。在37°C下並以250 rpm震盪培育該培養物2 hrs，以M13K07輔助噬菌體（感染複數量（moi）

5-10）進行感染，接著在噬菌質體及輔助噬菌體標記之雙重選擇下（50 μg/ml羧苄青黴素及70 μg/ml卡那黴素），於37°C下並以250 rpm震盪進行隔夜培育。在Beckman GH 3.8轉子中，於4°C下，以4000 rpm離心20 min而澄清該等培養物。藉著添加50 μl/孔之含有10 μg/ml hCD80-Ig或hCD86-Ig之PBS，並在4°C下隔夜共置，以塗覆ELISA盤（NUNC; #449824）。以200 μl/孔之PBST清洗該等試驗盤三次，再藉著添加200 μl/孔之含有3%脫脂奶粉之PBS，並在RT下共置1小時（hr）而進行阻斷。將25 μl/孔之取自該深孔塊之噬菌體上清液移至含有25 μl/孔之6%脫脂奶粉之ELISA盤中，並在室溫（RT）下共置該等試驗盤1 hr。以200 μl/孔之PBST清洗該等試驗盤三次，再與50 μl/孔之以含有3%脫脂奶粉之PBST稀釋1:5000之HRP-複合性抗-M13單株抗體（GE Healthcare, #27-9421-01）在RT下共置1 hr。以200 μl/孔之PBST清洗該等試驗盤三次，再使用TMB受質套組（Pierce; #34021），根據製造商之建議條件而偵測信號。將相較於人類CTLA-4對於人類CD80及/或人類CD86之結合性（如以人類CTLA-4 ECD對於hCD80-Ig及/或hCD86-Ig之結合性而測量）而言之對於人類CD80及/或人類CD86具有增加結合性（如以對於hCD80-Ig及/或hCD86-Ig之增加結合性而測量）的突變CTLA-4 ECD多肽選擇進行進一步之分析。

實例3

創造IgG2 Fc融合蛋白載體

創造一質體IgG2-Fc融合蛋白表現載體以製備包含本發明突變CTLA-4 ECD多肽及人類IgG2 Fc多肽之融合蛋白。以人類白細胞cDNA （BD Biosciences, Cat. #HL4050AH）之PCR擴增而產生編碼人類IgG2 Fc多肽之DNA，使用正向引子（5'-aagctgtcaccggtggatcgatcccgaaccctgccctgat tctgatgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcccaccgt-3'） （SEQ ID NO:189）及反向引子（5'- cagaattcattatttacccggagacagggagaggct cttctg-3'） （SEQ ID NO:190）而進行。該等引子係以一般熟習技

藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。參見，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。使用50-100ng之cDNA作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Taq緩衝液（Stratagene; #200435）及200 μM dNTPs，進行25個擴增循環（94°C，30 s；55°C，30 s；72°C，60 s）。根據製造商之建議條件，將該PCR產物以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen #28106）純化，並以限制酶*AgeI*及*EcoRI*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等PCR酶切消化片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議條件進行純化。可以*AgeI*及*EcoRI*對經修飾版本之pCDNA3.1-LEA載體（上述）（其在該CTLA-4信號序列中含有一AgeI限制位點（以沈默突變形式引入））進行酶切消化，並與上述之片段進行接合。根據製造商之建議條件，使接合物轉形進入One-shot TOP10大腸桿菌細胞（Invitrogen Cat. #C4040-03）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB（Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件，以其製備質體DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液。

該所得之質體表現載體稱為pCDNA IgG2 Fc融合蛋白表現載體。此一載體與示於圖1之pCDNA突變CTLA-4-IgG2質體載體相同，除外其移除該編碼突變CTLA-4 ECD多肽之核酸序列。在pCDNA IgG2 Fc融合載體中編碼信號肽之核酸序列（其在圖1中可為任何適當之信號肽編碼性核苷酸序列）係編碼人類CTLA-4信號肽之核酸（SEQ ID NO:181或SEQ ID NO:215）。此IgG2 Fc融合載體並不包括任何編碼本發明突變CTLA-4 ECD多肽或任何其他CTLA-4 ECD多肽之核酸序列。

將編碼突變CTLA-4多肽之核酸序列選殖進入該IgG2 Fc融合載體

為製備呈可溶性Fc融合蛋白形式之突變CTLA-4多肽，將編碼

該等由該噬菌體庫篩選辨識為具有改良人類CD80及/或人類CD86結合性（相較於人類CTLA-4 ECD對於人類CD80及/或人類CD86之結合性）之突變CTLA-4 ECD多肽的DNA序列各選殖進入該上述之IgG2 Fc融合蛋白載體中，使用，如，下列之流程進行。

首先，自該噬菌體展示載體中，以PCR擴增，使用根據其與該突變CTLA-4 ECD多肽N-及C-端處數個核苷酸殘基（如，30-60個核苷酸）之序列同源性而設計之正向及反向引子以及技藝中已知之標準流程，回收編碼具有較高hCD80及/或hCD86結合性之突變CTLA-4 ECD多肽的DNA序列。參見，如，述於，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻之流程。舉例而言，在一態樣中，編碼突變CTLA-4 ECD多肽的DNA序列係以PCR擴增而自該噬菌體展示載體回收，使用正向引子（5'-ggaataccggtttttgtaaagccatgcacgtcgctcaaccagccgtcgtactc-3'）（SEQ ID NO:191）及反向引子（5'-ggcactcagatctacgtcatcgatcccgaa-3'）（SEQ ID NO:192）進行。使用10納克（ng）之質體DNA（含有突變CTLA-4 ECD編碼核苷酸序列之噬菌體展示載體）作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Taq緩衝液（Stratagene; #200435）及200 μM dNTPs，進行25個擴增循環（94°C，30 s；55°C，30 s；72°C，60 s）。根據製造商之建議條件，將該PCR產物以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen #28106）純化，並以限制酶*AgeI*及*ClaI*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議條件進行純化，再使其接合進入經類似酶切消化之質體IgG2 Fc融合載體中。根據製造商之建議條件，使接合物轉形進入One-shot TOP10大腸桿菌細胞（Invitrogen Cat. #C4040-03）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB（Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件，以其製備質體DNA之maxiprep（Qiagen; #12362）貯液。

該所得之質體表現載體，其包含編碼本發明突變CTLA-4-IgG2

融合蛋白之核酸，稱為pCDNA突變CTLA-4 ECD IgG2 Fc質體表現載體。此載體之圖式示於圖1。此載體包括Bla啟動子；氨苄青黴素抗性基因；pUC起點；SV40聚腺苷酸（poly A）信號序列；f1起點；SV40啟動子；新黴素抗性基因；CMV啟動子，以協助表現本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（其包含，如，人類CTLA-4信號肽、突變CTLA-4 ECD多肽及人類IgG2 Fc多肽）；編碼人類CTLA-4信號肽之核酸序列（SEQ ID NO:181或SEQ ID NO:215）；編碼本發明突變CTLA-4 ECD多肽之核酸序列（其包括，但不限於，編碼SEQ ID NOS:80-152中任一者之核苷酸序列）及示於SEQ ID NO:183或SEQ ID NO:217之編碼人類IgG2 Fc多肽之例示性核酸序列；以及牛生長激素（bGH） poly A終止信號序列。SEQ ID NO:183之核酸序列編碼具有C-端離胺酸（K）殘基之hIgG2 Fc多肽（SEQ ID NO:184）；而SEQ ID NO:217之核酸序列編碼不具有C-端離胺酸殘基之hIgG2 Fc多肽（SEQ ID NO:218）。

該質體IgG2 Fc融合蛋白載體亦可用於製備人類CTLA-4-IgG2（"hCTLA-4-Ig"）融合蛋白。在此情形下，其使用類似該等上述者之標準選殖流程，將編碼人類CTLA-4 ECD之核酸序列（如，SEQ ID NO:193）取代編碼突變CTLA-4 ECD之核苷酸序列而選殖進入該質體IgG2 Fc融合蛋白載體中。該hCTLA-4-Ig融合蛋白一般而言係在溶液中以包含兩個相同單體成熟hCTLA-4-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在此情形下，各個單體成熟hCTLA-4-Ig融合蛋白包含一人類CTLA-4 ECD （SEQ ID NO:159），其以其C-端融合人類IgG2 Fc （SEQ ID NO:218或SEQ ID NO:184）之N-端。該兩個hCTLA-4-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成，因而形成該hCTLA-4-Ig融合蛋白二聚體。除非另有明示，該成熟hCTLA-4-Ig融合蛋白二聚體係用於此等實例所述分析中之融合蛋白分子形式。

咸已實驗發現，藉由轉染包含編碼hCTLA-4-Ig或突變CTLA-4-Ig融合蛋白以及SEQ ID NO:184中所示hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的表現載體而在CHO細胞中製備之人類CTLA-4-Ig融合

蛋白或突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基，如以LCMS分析所測定；因此，hCTLA-4-IgG2或突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之多肽序列一般而言並不包括該C-端離胺酸殘基。

COS細胞之瞬時轉染

在含有40 ml生長培養基(添加10%胎牛血清(FBS)（Hyclone Cat. #SV30014.03）及1x PSG （青黴素、鏈黴素及麩醯胺）（Invitrogen, Cat. #10378-016）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, Cat. #10565-018））之T-175燒瓶中，使COS-7細胞生長至80-90%鋪滿。在以質體表現載體轉染細胞之前即時除去該培養基，並以35 ml之表現培養基（含有1x PSG之OptiMem培養基（Gibco #51985））置換。使質體DNA （10 μg）（如，編碼本發明突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之pCDNA突變CTLA-4 ECD IgG2 Fc表現載體）與FuGENE6轉染試劑(Roche #11 815 075 001)以1:3之體積比混合，並加入1 ml之生長培養基中。接著將此混合物緩慢加入該T-175燒瓶中，並溫和攪拌混合。在37°C下培育3天後，收集該培養基，加入新鮮之表現培養基，再使該培養物培育另外3 d。

可使用類似之流程，製備經由編碼人類CTLA-4-IgG2之類似質體載體或是編碼LEA29Y-Ig之質體載體轉染之COS-7細胞。

蛋白之純化

在RT下以1000x g離心10 min，並過濾通過0.2 μm濾膜（Nalgene, VWR #73520-982），以澄清取自轉染培養物（如，包含經由編碼突變CTLA-4-Ig融合蛋白之pCDNA突變CTLA-4 ECD IgG2 Fc載體轉染之細胞）之上清液。使用AKTA Explorer HPLC系統（GE Healthcare），以蛋白-A親和層析純化蛋白。使突變CTLA-4-Ig融合蛋白在PBS緩衝液中連結Hitrap Protein A FF管柱（GE Healthcare, #17-5079-01），以該相同緩衝液清洗，以100 mM

檸檬酸緩衝液（pH 4.0）溶析，再接著加入1/10體積之2M Tris鹼而進行中和。最後使用10 kDa MWCO濾膜（Pierce, Cat. #PI66810），使該蛋白溶液中之緩衝液以透析交換為PBS。

可使用類似之流程，純化人類CTLA-4-IgG2或LEA29Y-Ig融合蛋白。

蛋白品質之評估

SDS/PAGE分析

在非還原條件下，以SDS/PAGE分析，測量經純化之本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之表觀分子量（MW）。在非還原條件下，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言係以包含兩個單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白之二聚體融合蛋白形式存在。在一態樣中，該二聚體係同型二聚體，包含兩個相同之突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體。在一態樣中，各個CTLA-4-Ig融合蛋白單體包含成熟/分泌之突變CTLA-4 ECD，其以其C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。該兩個突變CTLA-4-Ig單體係以雙硫鍵彼此共價連結，該等雙硫鍵係在各個單體中之半胱胺酸殘基間形成。除非另有明示，該同型二聚體係一般而言述於此等實例中之本發明突變融合蛋白分子形式。除非另有明示，示於此等實例中之數據係關於突變CTLA-4-Ig融合蛋白同型二聚體。

如下進行SDS/PAGE分析。將2 μg之純化蛋白加至20 μl之LDS樣本緩衝液（Invitrogen #NP0007）中，並根據製造商之建議條件，使其通過1x MES十二烷基硫酸鈉（SDS） /PAGE移動緩衝液（Invitrogen #NP0002）中之NuPAGE 4-12% Bis-Tris凝膠（Invitrogen #NP0321BOX）進行移動。於RT下，在50 ml SimplyBlue SafeStain （Invitrogen #LC6060）中並溫和震盪處理1 hr，以對凝膠進行染色。於RT下，以200 ml水並溫和震盪處理1 hr兩次，再根據製造商之建議條件，在染色緩衝液（Bio RAD 161-0752）中加工，以對凝膠進行脫染。

兩種例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白同型二聚體（稱為

純系D3及D4）以及Orencia®融合蛋白（其作為比較控制組）之代表性SDS/PAGE凝膠示於圖3。該D3-Ig融合蛋白二聚體包含兩個相同之D3-Ig融合蛋白單體，其以在各個D3-Ig單體中之半胱胺酸殘基間所形成之雙硫鍵共價連結。各個D3-Ig單體包含突變CTLA-4 ECD多肽（稱為"D3"），包含示於SEQ ID NO:61之多肽序列，其以其C-端直接（亦即，無「連接子」胺基酸殘基）融合示於SEQ ID NO:218之hIgG2 Fc多肽之N-端。該D4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個相同之D4-Ig單體，其以在各個D4-Ig單體中之半胱胺酸殘基間所形成之雙硫鍵共價連結。各個單體D4-IgG2融合蛋白包含突變CTLA-4 ECD多肽（稱為"D4"），包含示於SEQ ID NO:62之多肽序列，其以其C-端直接（亦即，無「連接子」胺基酸殘基）融合示於SEQ ID NO:218之hIgG2 Fc多肽之N-端。

如上所解釋，咸已實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中製備之突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基，如以LCMS分析所測定；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之多肽序列一般而言並不包括該C-端離胺酸殘基。

對所有之蛋白製備物進行SDS/PAGE分析，以確認就表觀分子量、蛋白濃度及純度而言之蛋白品質。該等SDS/PAGE分析之結果就所有之蛋白製備物而言皆為相似。由示於圖3之例示性凝膠結果可見，經純化之D3-IgG2及D4-IgG2融合蛋白二聚體具有約為80 kDa之表觀MW，其與圖10所示例示性同型二聚體突變CTLA-4-IgG2融合蛋白結構之預測MW相符（預測MW = 78-79 kDa）。（經純化之突變CTLA-4-IgG2蛋白單體一般而言具有39-40 kDa之表觀MW。）該等示於圖3凝膠中之蛋白條帶已經相等之強度染色；此可確認測量不同樣本蛋白濃度之精確性。至於蛋白純度，圖3中可觀察到一較低MW條帶位於約44 kDa之表觀MW，其與單體IgG2融合蛋白之預測MW相符。此一較低MW條帶之相對強

度亦相符為較低，且其估計為小於總蛋白量之5%。

可使用類似之SDS/PAGE分析，評估使用類似該等上述者之方法所製備之人類CTLA-4-IgG2或LEA29Y-Ig融合蛋白的純度。

內毒素分析

使用QCL-1000黛變形細胞裂解物分析套組（Cambrex #50-648U），根據製造商之建議條件，測量突變CTLA-4融合蛋白之內毒素含量。用於細胞基礎性分析中之蛋白最大內毒素含量設定為10內毒素單位（EU）/mg蛋白。

可使用類似之分析，測量人類CTLA-4-IgG2或LEA29Y-Ig蛋白製備物之內毒素含量。

尺寸排除層析（SEC）分析

使用Dionex BioLC system （Dionex），以尺寸排除層析，測量蛋白凝聚量（包括突變CTLA-4多肽及控制組多肽之凝聚量）。使用20 min之等強度移動，使蛋白（5 μg）在PBS移動緩衝液中通過Tosoh G3000Wxl管柱（Tosoh Bioscience）移動，並以214奈米（nm）之吸收值（A）進行偵測。將用於後續分析之蛋白最大凝聚量設定為10%。

對所有之蛋白製備物進行SEC分析，以確認就蛋白凝聚量而言之蛋白品質。該等結果就所有之蛋白製備物而言皆為相似，且突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（D3-Ig）之代表性SEC分析溶析內容示於圖4。其y軸顯示毫吸收單位（mAU）；x軸顯示以分鐘計之溶析時間。該D3-Ig二聚體之結構解釋於上文之「SDS/PAGE分析」章節中。此一經純化之突變CTLA-4-Ig二聚體在尺寸上大多勻質，且並不含有高量之凝聚分子種。其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白亦進行類似分析並顯示類似結果（數據未示）。本發明之純化突變CTLA-4-Ig融合蛋白經發現係在尺寸上勻質且並不含有高量（>10%）之凝聚蛋白。確認本發明純化突變CTLA-4-Ig融合蛋白之凝聚狀態係重要者，因為經高度凝聚之突變CTLA-4-Ig融合蛋白

可以較高之結合性結合人類CD80及/或人類CD86分子，並因此可能具有較高之生物活性。

實例4

使用表面電漿子共振（SPR）（Biacore™分析）測量突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於人類CD80-小鼠Ig （hCD80-mIg）及人類CD86-小鼠Ig （hCD86-mIg）融合蛋白之結合性

此實例敘述用以使用Biacore作用分析而篩選突變CTLA-4-Ig融合蛋白之改良hCD80-mIg及/或hCD86-mIg配位體結合性的流程。在用以敘述此種類型分析之術語之中，經固定之結合配對物稱為「配位體」，而在該移動相中之結合配對物則稱為「分析物」。含有Ig域之融合蛋白一般而言會藉由兩Ig域間之強連結力而在溶液中形成二聚體結構。除非另有明示，此等二聚體之構形預期為此實例中所述融合蛋白（亦即，突變CTLA-4-Ig、Orencia®融合蛋白、LEA29Y-Ig、hCD80-mIg及hCD86-mIg）所存在者。名辭「結合性」一般而言係關於二聚體分析物（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白）與二聚體配位體（如，hCD80-mIg或hCD86-mIg融合蛋白）間之結合強度。突變CTLA-4-Ig融合蛋白所述之結合性增加係由各個CTLA-4 ECD域與其對應配位體間之結合性增加所造成。結合性之強度一般而言係以平衡解離常數（K_D）敘述，其敘述平衡連結50%可用配位體的分析物莫耳濃度。

在此篩選法中，其以hCD80-mIg或hCD86-mIg配位體衍化Biacore感應晶片，並使緩衝液中之突變CTLA-4-Ig融合蛋白流過該等經配位體塗覆之感應晶片。突變CTLA-4-Ig融合蛋白結合特定結合配對物（亦即，hCD80-mIg或hCD86-mIg）之能力獲得評估。亦使控制組融合蛋白（亦即，人類CTLA-4-IgG2融合蛋白、Orencia®融合蛋白及突變LEA29Y-Ig融合蛋白）流過該等經配位體塗覆之感應晶片，並以類似方式評估此等分子結合hCD80-mIg或hCD86-mIg之能力以進行比較。使用該Biacore系統，其可評估目標蛋白結合hCD80-mIg或hCD86-mIg配位體之結合（k_{on}）及解離（k_{off}）常數，

並以其計算平衡解離常數K_D。該人類CTLA-4-IgG2融合蛋白（其包含融合人類IgG2多肽之WT人類CTLA-4 ECD多肽）可作為野生型人類CTLA-4-Ig「控制組」。此外或是或者，由於該Orencia®融合蛋白係由融合經修飾IgG1 Fc多肽之WT人類CTLA-4 ECD多肽組成，其亦可有效作為野生型人類CTLA-4-Ig控制組以進行比較。其辨識出相較於人類CTLA-4-IgG2、Orencia®融合蛋白及/或LEA29Y-Ig而具有增加hCD80-mIg及/或hCD86-mIg結合性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白。如下文詳細討論者，本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD80-mIg及/或hCD86-mIg之增加結合性（如相較於Orencia®融合蛋白（亦即，hCTLA-4-IgG1）及/或LEA29Y-Ig對於hCD80-mIg及/或hCD86-mIg之結合性）並非係因存在於該突變CTLA-4-Ig分子中之IgG2與存在於該Orencia®或LEA29Y-Ig分子中之突變IgG1的差異而造成。

所有之Biacore™分析皆係在Biacore™ 2000系統（GE Healthcare）上於室溫（RT，25°C）下進行。在所有實驗中使用HBS-EP緩衝液（10 mM HEPES （pH 7.4），150 mM NaCl，3 mM EDTA，0.005%界面活性劑P20）作為該流動緩衝液。

標準動力分析

標準動力分析係測量塗覆於感應晶片上之二聚體配位體（如，hCD80-mIg融合蛋白或hCD86-mIg融合蛋白）與移動相中之二聚體分析物（如，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白）間之結合動力學。根據製造商之操作流程，將兔抗小鼠IgG抗體（GE Healthcare, #BR-1005-14）固定在CM5感應晶片（GE Healthcare, #BR-1000-14）上。將抗體以固定緩衝液（10mM醋酸鈉，pH 5.0（BR-1003-51））稀釋至30 µg/ml。使用5 µl/分鐘之流速，注射35 µl之1-乙基-3-[3-二甲胺基丙基]碳化二亞胺鹽酸化物（EDC）及N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）混合物（以混合等體積之11.5 mg/ml EDC及75 mg/ml NHS而製備）（GE Healthcare, #BR-1000-50），再接著注射35 µl之未經稀釋抗體，以活化感應晶片CM5。將未經反應之

位點以35 μl之1M乙醇胺-HCL, pH 8.5 （GE Healthcare, #BR-1000-50）淬滅。此一流程一般而言可產生15,000反應單位（RU）之偶合抗體。以10 μl/min之流速，藉由分別注射10 μl或16 μl之配位體溶液（2 μg/ml蛋白於HBS-EP緩衝液中[10mM HEPES pH 7.4，150mM NaCl，3 mM EDTA，0.005% （v/v）界面活性劑P-20，GE Healthcare, #BR-1001-88]），使CTLA-4配位體人類CD80-小鼠Ig （hCD80-mIg） （Ancell, #510-820）或人類CD86-小鼠Ig（hCD86-mIg）（Ancell, #509-820）連結經抗體塗覆之感應晶片。配位體捕捉量一般而言係135-170 RU。使突變CTLA-4-Ig蛋白（或以HBS-EP緩衝液稀釋）以30 μl/min流過經配位體塗覆之感應晶片2 min，再使不含蛋白之HBS-EP緩衝液以相同流速進行5 min之共置。對於自hCD86-mIg具有極緩慢解離速率之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，亦使用較長之解離時間（如，20 min）進行動力分析。突變CTLA-4-Ig蛋白之Rmax信號量係介於約70–100 RU。各循環間之再生係藉著使10 mM甘胺酸緩衝液（pH 1.7）以50 μl/min進行3 min之共置而進行。在用於實際實驗之前，對新晶片進行4-5循環之捕捉/結合/再生。由自含有經捕捉之hCD80-mIg或hCD86-mIg的流細胞所取得之數據中減去自僅含有兔抗小鼠IgG捕捉抗體的參照細胞所取得之數據。一般而言，其係使介於自500 nM至0.2 nM之8種突變CTLA-4-Ig蛋白稀釋物相對空白參照組（僅含HBS-EP緩衝液）進行分析。

取自一典型Biacore分析之感應譜蹤跡圖示於圖5。此圖顯示隨時間（以秒（s）為單位）而取得之反應（RU），以下列三種融合蛋白與hCD86-mIg融合蛋白之結合產生：（1） Orencia®融合蛋白（作為控制組並用以進行比較） （Bristol-Myers Squibb Co.；參見，如，Larson C.P. et al., Am. J. Trans. 5:443-453 （2005））；（2）LEA29Y-Ig融合蛋白（用以進行比較）；及（3） 稱為「純系D3」（亦稱為D3-IgG2）之本發明例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白。該D3-IgG2融合蛋白包含兩個相同之單體融合蛋白，其以在各個單體中之半胱胺酸殘基間所形成之一或多個雙硫鍵彼此共價連結。參

見上文「SDS/PAGE分析」章節中之討論。各個單體融合蛋白包含示於SEQ ID NO:159之成熟突變CTLA-4 ECD多肽，其以其C-端融合示於SEQ ID NO:184或218之人類IgG2多肽之N-端。其他本發明之二聚體融合蛋白可包含類似該二聚體D3-IgG2融合蛋白之結構—除外各個單體融合蛋白之D3突變CTLA-4 ECD多肽經不同之突變CTLA-4 ECD多肽取代。

該結合期反應該目標分析物與該目標配位體間之結合。在圖5中，各個分析物之結合期係以該由箭頭所標記之時間前的時間曲線表示，且其係以分析物（D3-IgG2、Orencia®融合蛋白或LEA29Y-Ig）與該hCD86-mIg配位體之結合而定性。分析物離開該hCD86-mIg配位體之解離速率亦反應在該曲線中—參見，如，自約510秒起始之急遽反應單位增加率。

該分析之解離期係自圖5中之該由箭頭所標記之時間起始。在該解離期中，該分析物與該配位體自其結合之構形中解離。在圖5中，分析物離開該配位體之解離速率係由反應單位之降低表示（隨時間所測得之反應單位降低率）。根據此等數據，可測定相對解離速率常數（“off”速率，k_{off}或k_d）及結合速率常數（“on”速率，k_{on}或k_a）。該作用之總結合性可以K_D，（k_{off}）/（k_{on}）敘述。較高之結合性通常會以較低之解離速率展現。如該較低之解離速率伴隨相等、較高或臨界較慢之結合速率，以使該計算之平衡解離常數K_D為較低，該結合性將係較高。在此情形下，對於hCD86-mIg配位體之結合性大於Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合性的突變CTLA-4-Ig融合蛋白亦將具有低於Orencia®蛋白之離開該配位體的較慢解離速率。對於hCD86-mIg配位體之結合性大於LEA29Y-Ig對於該相同配位體之結合性的突變CTLA-4-Ig融合蛋白亦將具有低於LEA29Y-Ig之離開該配位體的較慢解離速率。

圖5顯示LEA29Y-Ig離開該hCD86-mIg配位體之解離速率顯著較慢於Orencia®蛋白自該相同配位體之解離速率。LEA29Y-Ig結合hCD86-mIg之結合速率亦類似於Orencia®融合蛋白所觀察到者。因此，LEA29Y-Ig具有大於Orencia®蛋白之較高hCD86-mIg結合性。

此一發現與敘述LEA29Y-Ig具有大於Orencia®融合蛋白之較高hCD86-mIg配位體結合性的先前研究相符(Larson C.P. et al., Am. J. Trans. 5:443-453 (2005))。圖5亦顯示本發明之突變D3-IgG2融合蛋白具有小於Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白之離開hCD86-mIg配位體的較慢解離速率。該D3-IgG2融合蛋白亦具有相較Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白對於hCD86-mIg配位體之結合速率的類似(但稍微較快)結合速率結合hCD86-mIg配位體。因此,該D3-IgG2融合蛋白具有大於Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高hCD86-mIg配位體結合性。因此,該D3-IgG2融合蛋白預期可以較高之結合性結合天然CD86,包括,如,在哺乳動物(諸如,人類)中於活體內表現於APCs上之CD86。此一觀點可由下文實例中所討論之功能性細胞基礎性分析進一步支持。

使用其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行Biacore分析。此外,使用經hCD80-mIg塗覆之感應晶片以及本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行Biacore分析。判定此等突變分子之解離速率及結合性,並與Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白之解離速率及結合性進行比較。代表性之結果示於表3及4,並在下文詳細討論。

標準Biacore數據分析

在除去該等感應譜之再生及補充部分後,將曲線歸零至樣本注射前約10 s之所有曲線之5 s平均值。自各試驗曲線減去空白曲線。以BIAevaluation軟體(v4.1,可自GE Healthcare取得),使用"Fit kinetics, Simultaneous k_a/k_d"功能而分析數據。注射起始時間定義為所有曲線皆接近零點之結合期前時間。針對該結合期之數據選擇起始於注射起始時間後約10 s,並結束於注射中止時間前約10 s。注射中止時間定義為任何與解離期相關之信號峰值出現前的時間。解離期係選擇為起始於注射中止時間後約10 s,並包括該5 min解離期之280-295 s。該1:1 Langmuir模式敘述反應A + B <=> AB。此一模式代表單一配位體對單一目標蛋白(如,受體)之結合。使用取自該BIAevaluation軟體之該1:1 Langmuir模式以判定結

合速率常數（k_a）及解離速率常數（k_d），並計算平衡解離常數K_D。$K_D = k_d/k_a$。$K_D =$ （[A]・[B]）/[AB]。平衡解離常數K_D係等於平衡結合常數K_A之倒數。$K_D = 1/K_A$。該反應（分析物A加配位體B產生複合物AB）之速率方程式（其中A＝ 經注射分析物，B＝ 自由配位體，且t＝ 時間）為：$d[B]/dt = -$ （k_a [A][B] - k_d [AB]）及$d[AB]/dt = k_a[A][B] - k_d[AB]$。以R （特定時間之Biacore反應單位（RU））取代[AB]，Rmax-R取代[B]，及C（分析物濃度）取代[A]，以Biacore單位表現之淨速率為$dR/dt = k_aC$（Rmax-R） $- k_dR$，其中R在t0 = 0，B[0] = Rmax，且AB[0] = 0 RU，其總反應 =[AB] + RI。將大平移（RI）設定為零，並使Rmax、k_a及k_d對所有曲線進行整體擬合。

對於本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白製備物以及LEA29Y-Ig及Orencia®融合蛋白進行上述之標準動力分析及數據分析。表3及4摘述代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之結合數據。

表3提出代表性突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD86-mIg之結合性，如以上述之標準Biacore分析測量。具體言之，表3顯示各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白之名稱；對應該單體突變CTLA-4 ECD融合蛋白多肽序列之序列辨識號（SEQ ID NO）；根據該突變蛋白對於hCD86-mIg之結合性所測定之平衡解離常數（K_D （莫耳濃度（M））；以及相對Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg結合性的各突變蛋白之hCD86-mIg結合性。此一相對結合性（示於最右欄）係以突變融合蛋白之hCD86-mIg結合性相較於Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg結合性的倍數改良而表示。表3中之各個本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言在溶液中係以包含兩個相同單體融合蛋白的二聚體融合蛋白形式存在，其中各個單體蛋白包含突變CTLA-4 ECD多肽（如，稱為D1、D1T、D2、D3、D4等），其在其C-端直接融合包含SEQ ID NO:184或218序列之IgG2多肽之N-端。各個此等二聚體突變CTLA-4-Ig可以技藝中已知之標準技術製備。或者，各個此等二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體可使用示於上文實例3之方法製備。簡言之，其可將編碼表3所辨識之特

定突變CTLA-4 ECD的核酸序列（如，編碼表3中所辨識突變CTLA-4 ECD多肽序列之核酸序列）選殖進入該IgG2 Fc融合載體中，以該載體轉染哺乳動物細胞，在進行該所得融合蛋白之表現、純化及評估，如實例3所述。各個突變CTLA-4 ECD之例示性核酸序列示於本文所包括之序列表中。Orencia®融合蛋白（其包含兩個單體融合蛋白，各個單體融合蛋白包含融合經修飾IgG1 Fc之野生型人類CTLA-4 ECD）係作為控制組，亦即，其對於hCD86-mIg之結合性係設定為1。其亦顯示LEA29Y-Ig融合蛋白以及人類CTLA-4-Ig融合蛋白之K_D值。此外，其亦顯示LEA29Y-Ig之hCD86-mIg結合性相較於Orencia®蛋白之hCD86-mIg結合性的倍數改良。CTLA-4-IgG2及Orencia®融合蛋白對於hCD86-mIg之結合性約為相等，因此確認，人類CTLA-4-IgG2中所存在之人類IgG2與Orencia®蛋白中所存在之經修飾IgG1間的差異，對於此等分子個別之hCD86-mIg結合親和性僅有極小之貢獻（如其有任何貢獻）。如下文實例5中所詳細討論，茲以確認，本發明突變CTLA-4-Ig多肽與Orencia®蛋白（或LEA29Y-Ig）間之免疫抑制功能活性差異並非由其包含不同IgG同種型之個別Ig Fc區域造成。

如表3所示，本發明之代表性突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有如下之hCD86-mIg結合性：（1） 至少約等於大於人類CTLA-4-IgG2（"hCTLA-4-IgG2"）（其包含兩個共價連結之單體融合蛋白，各個此種單體蛋白包含融合IgG2 Fc多肽之人類CTLA-4 ECD多肽）之結合性；（2） 至少約等於大於Orencia®蛋白對於hCD86-mIg配位體之結合性；及/或（3） 至少約等於大於LEA29Y-Ig對於hCD86-mIg配位體之結合性。其指出各個CTLA-4-Ig突變體相對於Orencia®蛋白之hCD86-mIg結合性的CD86-mIg結合性倍數改良（表3第4欄）。

茲發現大部分之突變CTLA-4-Ig融合蛋白離開hCD86-mIg融合蛋白之解離速率係較Orencia®融合蛋白離開hCD86-mIg融合蛋白之解離速率緩慢（數據未顯示）。茲發現諸多之突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD86-mIg之結合速率係大於Orencia®融合蛋白對

於該相同配位體之結合速率（數據未顯示）。

所有示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有小於人類CTLA-4-IgG2或Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg平衡解離常數的hCD86-mIg平衡解離常數（K_D）。同時，大部分示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有低於LEA29Y-Ig之hCD86-mIg平衡常數的hCD86-mIg平衡解離常數。

所有示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有大於人類CTLA-4-IgG2 或 Orencia® 融合蛋白之 hCD86-mIg 結合性的hCD86-mIg結合性（相對於Orencia®融合蛋白之hCD86-mIg結合性的經計算倍數改良示於表3第4欄）。同時，諸多示於表3之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於LEA29Y-Ig之hCD86-mIg結合性的hCD86-mIg結合性（表3第4欄）。

具有大於Orencia® 或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高hCD86-mIg配位體結合性的本發明突變CTLA-4-Ig將可能具有較高之活體內免疫抑制強度（分別相較於hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白），諸如，在，如，用以在對象體內抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在其中需要免疫抑制或免疫壓抑之哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法或是本文他處所述之其他方法。

表3

融合蛋白（二聚體）	SEQ ID NO*（如，突變CTLA-4 ECD者）	hCD86-mIg K_D（M）	hCD86-mIg結合力（相對於 Orencia®融合蛋白二聚體）
人類 CTLA-4-IgG2	162	3.95×10^{-9}	1.32x
Orencia®融合蛋白二聚體	164	5.23×10^{-9}	1
LEA29Y-Ig	166	$1.05 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	5x – 10x

D1-IgG2	58	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D1T-IgG2	59	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D2-IgG2	60	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-IgG2	61	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D4-IgG2	62	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D5-IgG2	63	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D6-IgG2	64	$2.65 \times 10^{-9} - 5.23 \times 10^{-10}$	2x – 10x
D20-IgG2	65	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D21-IgG2	66	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D23-IgG2	67	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D24-IgG2	68	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D26-IgG2	69	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D27-IgG2	70	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D28-IgG2	71	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D29-IgG2	72	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D31-IgG2	73	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-1-IgG2	1	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-2-IgG2	2	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-3-IgG2	3	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-4-IgG2	4	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-5-IgG2	5	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-6-IgG2	6	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-7-IgG2	7	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-8-IgG2	8	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-9-IgG2	9	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-11-IgG2	10	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-12-IgG2	11	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-14-IgG2	12	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-15-IgG2	13	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-16-IgG2	14	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-17-IgG2	15	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-19-IgG2	16	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-20-IgG2	17	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-21-IgG2	18	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-22-IgG2	19	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-23-IgG2	20	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-24-IgG2	21	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-25-IgG2	22	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-26-IgG2	23	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-27-IgG2	24	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-28-IgG2	25	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D3-29-IgG2	26	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x

D3-30-IgG2	27	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-31-IgG2	28	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-32-IgG2	29	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-33-IgG2	30	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-34-IgG2	31	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-39-IgG2	32	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D3-50-IgG2	33	$2.62 \times 10^{-10} - 1.31 \times 10^{-10}$	20x – 40x
D3-52-IgG2	34	$5.23 \times 10^{-10} - 2.62 \times 10^{-10}$	10x – 20x
D3-53-IgG2	35	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-54-IgG2	36	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-56-IgG2	38	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-62-IgG2	44	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-65-IgG2	47	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-66-IgG2	48	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-69-IgG2	50	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-70-IgG2	51	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-71-IgG2	52	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-72-IgG2	53	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-73-IgG2	54	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-74-IgG2	55	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-75-IgG2	56	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-76-IgG2	57	$< 1.31 \times 10^{-10}$	> 40x

*註記：表3中針對人類CTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白之序列辨識號（SEQ ID NOS）分別係此等Ig融合蛋白之多肽序列者。表3中為各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NO係辨識該經辨識突變CTLA-4-Ig融合蛋白之突變CTLA-4 ECD的多肽序列。該等數據係有關於突變CTLA-4-Ig，其包含突變CTLA-4 ECD（如，SEQ ID NOS:1-48及58-73中之任一者），其在其N-端直接融合示於SEQ ID NO:184或218之IgG2 Fc多肽之C-端。用以製備此等融合蛋白之方法係為技藝中所已知且述於本文之中。然而，如上所註記，咸已實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中所製備之突變CTLA-4-Ig一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184

中所示之序列並不包括該C-端離胺酸殘基。不包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:205-214、219及221。

表4提出突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD80-mIg之結合性，如以標準Biacore分析測量。具體言之，表4顯示突變CTLA-4-Ig融合蛋白之純系名稱；對應該單體突變CTLA-4 ECD融合蛋白多肽序列之序列辨識號（SEQ ID NO）；hCD80-mIg配位體結合性分析之平衡解離常數（K_D（莫耳濃度（M））；以及相對Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合性的該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之hCD80-mIg配位體結合性。針對各個突變蛋白，其顯示該hCD80-mIg配位體結合性相較於Orencia®融合蛋白之hCD80-mIg配位體結合性的倍數改良（表4第4欄）。Orencia®融合蛋白係作為控制組，亦即，其對於hCD80-mIg之結合性係設定為1。該等突變CTLA-4-Ig融合蛋白一般而言在溶液中係以二聚體融合蛋白之形式存在。如表4所示，本發明之二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有如下之hCD80-mIg結合性：（1） 至少約等於大於人類CTLA-4-IgG2之結合性；（2） 至少約等於大於Orencia®融合蛋白對於hCD80-mIg配位體之結合性；及/或（3） 至少約等於大於LEA29Y-Ig對於hCD80-mIg配位體之結合性。如上所討論，各個二聚體突變CTLA-4-Ig二聚體可使用上文實例3所示之方法製備。

茲發現諸多之突變CTLA-4-Ig融合蛋白離開hCD80-mIg融合蛋白之解離速率係約等於或大於Orencia®融合蛋白離開該相同配位體之解離速率（數據未顯示）。茲發現部分之突變CTLA-4-Ig融合蛋白對於hCD80-mIg之結合速率係約等於或大於Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合速率（數據未顯示）。

諸多示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有低於人類CTLA-4-IgG2或Orencia®融合蛋白之hCD80-mIg平衡解離常數

的hCD80-mIg平衡解離常數（K_D）。同時，數種示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有至少約等於LEA29Y-Ig之hCD80-mIg平衡常數的hCD80-mIg平衡解離常數。

諸多示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆具有大於人類CTLA-4-IgG2或Orencia®融合蛋白對於該相同配位體之結合性的hCD80-mIg結合性（相對於Orencia®融合蛋白之hCD80-mIg結合性倍數改良示於第4欄）。同時，數種示於表4之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有至少約等於或大於LEA29Y-Ig對於該相同配位體之結合性的hCD80-mIg結合性。

具有大於hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高hCD80-mIg結合性的本發明突變CTLA-4-Ig將可能具有較高之活體內免疫抑制強度（分別相較於hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白），諸如，在，如，用以在對象體內抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在其中需要免疫抑制或免疫壓抑之哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法或是本文他處所述之其他方法。

表4

融合蛋白（二聚體）	SEQ ID NO*（如，突變CTLA-4 ECD者）	hCD80-mIg K_D（M）	hCD80-mIg結合力（相對於Orencia®融合蛋白二聚體）
hCTLA-4-Ig G2	162	6.55×10^{-10}	1.34x
Orencia®融合蛋白二聚體	164	8.77×10^{-10}	1
LEA29Y-Ig	166	4.39×10^{-10} – 2.19×10^{-10}	2x – 4x
D1-IgG2	58	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D1T-IgG2	59	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D2-IgG2	60	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-IgG2	61	1.75×10^{-9} – 4.39×10^{-10}	0.5x - 2x
D4-IgG2	62	1.75×10^{-9} – 4.39×10^{-10}	0.5x - 2x
D5-IgG2	63	1.75×10^{-9} – 4.39×10^{-10}	0.5x - 2x

D6-IgG2	64	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D20-IgG2	65	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D21-IgG2	66	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D23-IgG2	67	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D24-IgG2	68	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D26-IgG2	69	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D27-IgG2	70	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D28-IgG2	71	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D29-IgG2	72	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D31-IgG2	73	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-1-IgG2	1	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-2-IgG2	2	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-3-IgG2	3	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-4-IgG2	4	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-5-IgG2	5	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-6-IgG2	6	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-7-IgG2	7	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-8-IgG2	8	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-9-IgG2	9	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-11-IgG2	10	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-12-IgG2	11	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-14-IgG2	12	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-15-IgG2	13	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-16-IgG2	14	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-17-IgG2	15	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-19-IgG2	16	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-20-IgG2	17	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-21-IgG2	18	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-22-IgG2	19	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-23-IgG2	20	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-24-IgG2	21	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-25-IgG2	22	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-26-IgG2	23	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-27-IgG2	24	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-28-IgG2	25	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-29-IgG2	26	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-30-IgG2	27	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-31-IgG2	28	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-32-IgG2	29	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-33-IgG2	30	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-34-IgG2	31	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-39-IgG2	32	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x

D3-50-IgG2	33	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-52-IgG2	34	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-53-IgG2	35	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-54-IgG2	36	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-56-IgG2	38	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x
D3-62-IgG2	44	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-65-IgG2	47	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-66-IgG2	48	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-69-IgG2	50	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-70-IgG2	51	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-71-IgG2	52	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-72-IgG2	53	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-73-IgG2	54	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-74-IgG2	55	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-75-IgG2	56	$< 4.39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-76-IgG2	57	$1.75 \times 10^{-9} - 4.39 \times 10^{-10}$	0.5x - 2x

*註記：表4中針對人類CTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NOS分別係此等融合蛋白之多肽序列者。表4中為各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NO係辨識該經辨識突變CTLA-4-Ig融合蛋白之突變CTLA-4 ECD的多肽序列。該等數據係有關於突變CTLA-4-Ig，其包含突變CTLA-4 ECD（如，SEQ ID NOS:1-48及58-73中之任一者），其在其N-端融合示於SEQ ID NO:184或218之IgG2 Fc多肽之C-端。然而，茲已藉由LCMS分析而實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中所製備之突變CTLA-4-Ig一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之序列並不包括該C-端離胺酸殘基。不包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:205-214、219及221。

單體動力分析

對於突變CTLA-4-Ig融合蛋白結合特性之進一步確認可由單價動力結合分析取得。此等分析係測量塗覆於感應晶片上之二價試驗蛋白（如，二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白）與移動相中之單價配位體(如，經木瓜蛋白酶酶切消化之hCD86-mIg)間之結合動力學。根據製造商之操作流程，將山羊抗人類IgG抗體（Jackson ImmunoResearch, #109-005-098）偶合在CM5感應晶片上，一般而言可產生15,000反應單位(RU)。以10 μl/min之流速，藉著使經抗體塗覆之晶片與10 μl之二聚體突變CTLA-4-Ig融合蛋白於HBS-EP緩衝液中之2 μg/ml溶液進行共置而捕捉配位體。配位體捕捉量一般而言係25-80 RU。將單體hCD86-mIg配位體（由hCD86-mIg之木瓜蛋白酶酶切消化及蛋白-A瓊脂糖吸收而產生，如Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques [生物複合技術], Academic Press, 1996中所述）以HBS-EP緩衝液稀釋，並使其以30 μl/min流過經試驗蛋白塗覆之感應晶片2 min，再使不含蛋白之HBS-EP緩衝液以相同流速進行2 min之共置。各循環間之再生係藉著使10 mM甘胺酸緩衝液(pH 1.7)以30 μl/min進行3 min之共置而進行。一般而言，其係使介於自3000 nM至0.2 nM之8種單體分析物蛋白稀釋物相對空白參照組（僅含HBS-EP緩衝液）而以雙重試驗進行分析。與突變CTLA-4-Ig蛋白結合之Rmax信號量係介於約10-60 RU。

針對動力分析，如上選擇進行單體結合分析之數據，除外該結合數據選擇係起始及結束於距注射起始及中止時間5 s，且解離數據選擇係起始於注射中止時間後5 s，並一般而言包括該解離期之1-60 s。亦使用BIAevaluation軟體分析此等數據之穩態平衡親和性。使用BIAevaluation之"General fit: average"功能，在接近樣本注射結束之5-20 s範圍內，平均各個濃度之穩態結合量（$Response_{eq}$ （"R_{eq}"）值）。使用BIAevaluation軟體，根據方程式$Req=K_A \times C \times Rmax/(K_A \times C \times n+1)$ （其中C係分析物濃度，且立體干擾因子n係1，且$K_D= 1/ K_A$），自Req對

濃度作圖而判定穩態親和性。在部分情形下，其可觀查到實質性之非專一性結合，如以解離後之殘餘平坦R-值蹤跡表示。此等數據可藉著自該等R_{eq}值中減去該殘餘R值而校正。接著在GraphPad Prism軟體（GraphPad Software, Inc.）中，使用"one site-specific binding"模式而計算值K_D。

對於代表性突變CTLA-4-Ig蛋白之亞群進行此一單體結合分析，且該等結果摘述於表5。整體言之，在該單體結合分析中相對於LEA29Y-Ig所觀察到之對於突變CTLA-4-Ig融合蛋白之hCD86 ECD結合改良程度，與標準動力分析中相對於LEA29Y-Ig所觀察到之對於突變CTLA-4-Ig融合蛋白之hCD86 ECD結合改良程度相似。此等結果支持突變蛋白在結合動力學中所觀察到之改良係由該等突變蛋白在結合親和性方面之真正改良（如，相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白）所造成，且並不係由因凝聚蛋白製備物之高價性而造成之潛在人造物所造成。

表 5

融合蛋白（二聚體）	SEQ ID NO*（如，突變CTLA-4 ECD者）	單體 hCD86 ECD K_D （M）	單體 hCD86 ECD 之結合親和性 （相對於 LEA29Y-Ig）
LEA29Y-Ig	166	1.68×10^{-6}	1
D3-IgG2	61	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-4-IgG2	4	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-11-IgG2	10	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-12-IgG2	11	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-14-IgG2	12	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-17-IgG2	15	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-20-IgG2	17	8.4×10^{-7} - 3.36×10^{-7}	2x-5x
D3-27-IgG2	24	8.4×10^{-7} - 3.36×10^{-7}	2x-5x
D3-29-IgG2	26	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-31-IgG2	28	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-53-IgG2	35	$< 3.36 \times 10^{-7}$	>5x

*註記：表5中針對LEA29Y-Ig所示之SEQ ID NO係

LEA29Y-Ig融合蛋白之多肽序列者。表5中為各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白所示之SEQ ID NO係辨識該經辨識突變CTLA-4-Ig融合蛋白之突變CTLA-4 ECD的多肽序列。該等數據係有關於突變CTLA-4-Ig，其包含突變CTLA-4 ECD （如，SEQ ID NOS:4、10-12、15、17、24、26、28、35及61中之任一者），其在其N-端融合示於SEQ ID NO:184或218之IgG2 Fc多肽之C-端。然而，茲已藉由LCMS分析而實驗發現，藉由使用包含編碼SEQ ID NO:184中所示預測hIgG2 Fc多肽之核苷酸序列的載體而在CHO細胞中所製備之突變CTLA-4-Ig一般而言並不包括該預測C-端離胺酸（K）殘基；因此，突變CTLA-4-IgG2之hIgG2 Fc多肽序列係示於SEQ ID NO:218中者，該hIgG2 Fc多肽序列相較於SEQ ID NO:184中所示之序列並不包括該C-端離胺酸殘基。不包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:205-214、219及221。包括該C-端離胺酸殘基之例示性融合蛋白序列示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、220及222。

實例5

使用人類PBMC增殖分析（抗-CD3抗體刺激）而測量CTLA-4突變體之生物活性

CTLA-4-Ig及其特定變體已經顯示為活體外T細胞增殖之強抑制劑（參見，如，Larson et al., Am. J. Transplant. 5, 443）。為在此等分析中測量突變CTLA-4-Ig蛋白之改良活性，茲發展出周邊血液單核細胞（PBMC）增殖分析。

以等體積之PBS稀釋人血（由捐贈者計畫新鮮收集），再使用Histopaque （Sigma, #10771） Ficoll梯度，根據製造商之建議條件進行分級分離以分離PBMCs。以生長培養基（添加10% FBS （Hyclone #SV30014.03）及1x PSG （Invitrogen, #10378-016）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, #10565-018））稀釋PBMCs，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入96孔培養盤（BD

Biosciences, #353077）中。以生長培養基系列稀釋試驗化合物，並以三重試驗形式加入該等孔中。添加小鼠抗-人類CD3抗體（BD Pharmingen: 555329）至5 μg/ml之終濃度以起始細胞增殖。在37°C下培育2天（d）後，以1 μCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE Healthcare, #TRK758-5MCI），再使該等試驗盤在37°C下培育額外16 hr。在細胞收集器（FilterMate Omnifilter-96 Harvester）中，使用製造商之建議條件而收集細胞，並使用閃爍計數器（Wallac Trilux, #1450-421）測量^{3}H胸苷之納入。^{3}H胸苷納入之程度（^{3}H胸苷攝入）係T細胞增殖程度之指標。^{3}H胸苷之納入係以標準技術測量。T細胞之增殖係以三重試驗孔之平均每分鐘計數（cpm）表示。

使用非線性回歸曲線擬合模式（S型劑量反應，可變斜率）及最小平方擬合法，以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據。茲報告取自該等結果之IC50（亦顯示為IC_{50}）參數及其相關之95%信賴區間（表6）。圖6顯示取自涉及一組本發明例示突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D3-04-IgG2、D3-11-IgG2、D3-12-IgG2及D3-14-IgG2融合蛋白）之代表性PBMC增殖分析（使用抗-CD3抗體刺激）的細胞增殖曲線。該圖係^{3}H胸苷納入（每分鐘計數（cpm））對蛋白濃度（納莫耳濃度（nM））之作圖。^{3}H胸苷納入（^{3}H胸苷攝入）（其係T細胞增殖程度之指標）係以標準技術測量。

其亦包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。此等結果說明，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高強度或較大能力，以在活體外抑制或壓抑多株T細胞之活化或T細胞之增殖。

茲使用其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行PBMC增殖分析。表6提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表6提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對控制組（Orencia®、hCTLA-4-IgG2及LEA29Y-Ig融合蛋白）在該

PBMC增殖分析（使用抗-CD3抗體刺激）中之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。IC50值表示在活體外產生T細胞增殖之50%抑制所需之化合物（如，突變CTLA-4-Ig、hCTLA-4-IgG2、Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白）濃度。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。使用單因子ANOVA及事後比較Dunnett或Bonferroni試驗，分別使突變CTLA-4-Ig融合蛋白及hCTLA-4-IgG2與Orencia®或LEA29Y-Ig融合蛋白進行比較（C.W. Dunnett, New Tables for Multiple Comparisons with a Control [用以與控制組進行多重比對之新穎表格], Biometrics 20(3):482-491（Sept. 1964）; Abdi, Herve, "The Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons [多重比對之Bonferroni及Sidak校正]", 於Encyclopedia of Measurement and Statistics [測量及統計百科全書]（N.J. Salkind ed., Thousand Oaks, CA 2007）；亦可在全球資訊網於網址utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf取得）。Ig融合蛋白之統計分析係使下列突變CTLA-4 ECD多肽（純系D24、D3-07、D3-15及D3-16）中之一種作為n = 1不進行分析而構成。名辭「SD（平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。

表6. 使用抗-CD3抗體刺激之例示性PBMC增殖分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50（nM）	平均 Log IC50（nM）	SD（平均 Log IC50）（nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	5.16	0.71	0.51
hCTLA-4-IgG2	8.46	0.93	0.43
LEA29Y-Ig	0.48[1]	-0.32	0.54
D3-4-IgG2	0.05[1,2]	-1.27	0.45
D3-7-IgG2	0.12	-0.93	NA
D3-11-IgG2	0.08[1,2]	-1.07	0.40
D3-12-IgG2	0.06[1,2]	-1.27	0.17
D3-14-IgG2	0.07[1,2]	-1.17	0.15

D3-15-IgG2	0.21	-0.69	NA
D3-17-IgG2	0.04[1,2]	-1.36	0.37
D3-20-IgG2	0.07[1,2]	-1.19	0.37
D3-26-IgG2	0.15[1]	-0.83	0.49
D3-27-IgG2	0.10[1,2]	-1.00	0.41
D3-29-IgG2	0.07[1,2]	-1.13	0.53
D3-30-IgG2	0.18[1]	-0.74	0.35
D3-31-IgG2	0.04[1,2]	-1.42	0.25
D3-32-IgG2	0.10[1]	-1.00	0.47
D3-33-IgG2	0.12[1]	-0.94	0.69
D3-34-IgG2	0.41[1]	-0.39	0.18
D3-39-IgG2	0.47[1]	-0.33	0.21
D3-50-IgG2	0.35[1]	-0.46	0.23
D3-52-IgG2	0.49[1]	-0.31	0.20
D3-53-IgG2	0.02[1,2]	-1.69	0.24
D3-54-IgG2	0.17[1]	-0.77	0.22
D3-56-IgG2	0.08[1]	-1.08	0.20
D3-62-IgG2	0.05[1,2]	-1.29	0.23
D3-69-IgG2	0.05[1,2]	-1.34	0.19
D3-70-IgG2	0.08[1]	-1.10	0.10
D3-71-IgG2	0.05	-1.32	NA
D3-72-IgG2	0.03[1,2]	-1.54	0.19
D3-73-IgG2	0.23[1]	-0.64	0.25
D3-75-IgG2	0.08[1]	-1.11	0.33
D3-76-IgG2	0.13[1]	-0.88	0.36
D3-IgG2	0.14[1]	-0.85	0.13
D24-IgG2	0.12	-0.93	NA

表6中之上標註記如下：[1]與Orencia之統計差異$p<0.05$，如以單因子ANOVA及事後比較Dunnett試驗測定。

[2]與LEA之統計差異$p<0.05$，如以單因子ANOVA事後比較Bonferroni試驗測定。包含D3-7、D3-15、D3-71及D24突變CTLA-4 ECDs之融合蛋白僅試驗一次，並因此無法進行統計比較。註記：表6中之名辭「NA」意謂「未取得」。

統計分析顯示，在至少兩次不同分析中試驗並以上標註記（1）指明（參見表6）之所有突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆在強度上統計優於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較大

能力，以在活體外之PBMC分析中壓抑或抑制T細胞之增殖）。該等以上標註記（2）指明者（參見表6）亦在強度上統計優於LEA29Y-Ig融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之PBMC分析中壓抑或抑制T細胞之增殖），如以上文所討論之單因子ANOVA及事後比較Dunnett及Bonferroni試驗測定。在包含經修飾之IgG1 Fc（如於Orencia®中）或野生型IgG2 Fc（如於hCTLA4-IgG2中）之人類CTLA-4-Ig融合蛋白間並無統計差異。此等發現說明，表6所示本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（其包含人類IgG2 Fc）與Orencia®或hCTLA-4-IgG2間之功能活性差異係CTLA-4 ECD區域中所為胺基酸變化（亦即，胺基酸取代）之直接結果。本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白與，例如，Orencia®（其包含經修飾之IgG1 Fc）間之功能活性差異並不係其個別Ig Fc多肽序列中差異之結果。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制T細胞增殖之較高能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較高免疫抑制強度。各個此等本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之預防或應用中具有相對於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較高能力而壓抑或抑制T細胞增殖，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

應用相同之統計分析，茲發現，在Orencia®融合蛋白（其包含人類CTLA-4 ECD-突變IgG1）及人類CTLA-4-IgG2間並無

統計差異。因此，咸信此等分子Ig域間之差異（亦即，Orencia®融合蛋白之突變IgG1與hCTLA-4-IgG2之人類IgG2）並不會影響此等分子之功能性。參見圖11。隨著漸增劑量之Orencia®融合蛋白所觀察到之增殖抑制並未顯著不同於以CTLA-4-IgG2所觀察到者，此指出其分別之免疫抑制活性並不會根據其不同之IgG同種型而有所偏移，而是由其hCTLA-4 ECD多肽所造成。因此，本發明突變CTLA-4-Ig多肽與Orencia®融合蛋白（或LEA29Y-Ig，因其與Orencia®蛋白含有相同之Ig）間之不同免疫抑制活性並不可歸因於其包含不同IgG同種型之個別Fc區域。

本發明包括單體突變CTLA-4 ECD蛋白，其具有能力，且在部分情形下，具有大於單體人類CTLA-4蛋白或其胞外域之較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。其亦提供單體突變CTLA-4 ECD融合蛋白，其具有能力，且在部分情形下，具有大於單體hCTLA-4-Ig蛋白或其胞外域之較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。其亦包括突變CTLA-4 ECD蛋白，其具有能力，且在部分情形下，具有大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體的較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。部分之本發明突變CTLA-4 ECD融合蛋白二聚體（如，突變CTLA-4-ECD-Ig融合蛋白二聚體）具有能力，且在部分情形下，具有大於hCTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體、Orencia®融合蛋白二聚體及/或LEA29YIg融合蛋白二聚體之較大能力，以壓抑或抑制T細胞之活化或增殖。

實例6

使用人類$CD4^+$ T細胞增殖分析而測量突變CTLA-4-Ig分子之生物活性

人類CTLA-4-Ig以及其特定變體已經顯示可藉著阻斷CD80及CD86經由CD28之信號傳導而抑制T細胞之增殖（Linsley P.S., Immunity 1:793-801 （1994）；Larson C. P. et al.,

Am. J. Transplant. 5:443-453 （2005））。由於本發明之突變CTLA-4-Ig蛋白具有改良之CD86-Ig配位體結合性，茲發展出$CD4^+$ T細胞增殖分析以測量該等突變CTLA-4-Ig蛋白阻斷經由CD86之信號傳導的能力。

創造編碼全長人類CD86蛋白之DNA序列

茲創造質體pCDNA3.1 hB7.2 FL，以編碼全長人類CD86蛋白，而在經轉染細胞之表面表現。以衍生自人類白細胞（BD Biosciences, Cat# HL4050AH）之cDNA的PCR擴增，使用根據其與示於SEQ ID NO:176之CD86-編碼核苷酸序列之序列同源性而設計之正向及反向寡核苷酸引子進行。該等引子係以一般熟習技藝者所熟知之標準流程而設計、製備及組合，且其可如需要包括中止及起始密碼子以及限制位點。所用之PCR擴增流程亦為技藝中所熟知。此等技術述於，如，Berger、Ausubel及Sambrook，皆為上述文獻。使用50納克（ng）之cDNA作為樣板，在100 μl之PCR反應中，以1 μM正向及反向引子、Herculase聚合酶緩衝液（Stratagene; #600260）及200 μM dNTPs，進行30個擴增循環（94°C，30 s；50°C，30 s；72°C，60 s）。根據製造商之建議條件，將該PCR產物以QiaQuick PCR離心管柱（Qiagen #28106）純化，並以限制酶*KpnI*及*NotI*進行酶切消化。以瓊脂糖凝膠電泳分離該等片段，使用Qiaquick凝膠萃取套組（Qiagen, #28704）而根據製造商之建議條件進行純化，再使其接合進入經類似酶切消化之質體pCDNA 3.1（+）（Invitrogen, Cat. #V790-20）中。根據製造商之建議條件，使接合物轉形進入TOP10大腸桿菌細胞（Qiagen, Cat. #C4040-10）中。使該等經轉形之細胞，在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LB（Luria液態培養基）中，於37°C下並以250 rpm震盪，進行隔夜培育，並接著根據製造商之建議條件，以其製備質體DNA之maxiprep （Qiagen; #12362）貯液。

該全長人類CD86蛋白之預測胺基酸序列示於SEQ ID

NO:175。在此序列中，胺基酸殘基1-23係預測之信號序列，胺基酸殘基21-241包含人類CD86胞外域，胺基酸殘基242-270包含穿膜域，且胺基酸殘基271-329包含胞質域。

創造在細胞表面表現人類CD86之穩定細胞系

在含有20 ml生長培養基（添加10% FBS （Hyclone Cat. #SV30014.03）及1x PSG （Invitrogen, Cat. #10378-016）之DMEM/F12培養基（Invitrogen, Cat. #10565-018））之T-175燒瓶中，使HEK293細胞生長至80-90%鋪滿。以混合60 µl Fugene 6 （Roche, #11814443001）之10 µg質體DNA（pCDNA3.1 hB7.2 FL），根據製造商之建議條件而轉染細胞。在37°C下於生長培養基中培育細胞2天（d），再接著於選擇培養基（含有300 µg/ml遺傳黴素（Invitrogen, #10131-027）之生長培養基）中培育10 d，每2 d更換培養基。為容許進行FACS分選，以FITC-標記性抗-CD86抗體（BD Biosciences, #555），根據製造商之建議條件，染色經轉染之細胞。使用門控FITC信號之細胞分選器（Dako, MoFlo），將CD86-陽性細胞分別分選進入96孔細胞培養盤（Sigma-Aldrich, #CLS-3596）中，該盤含有200 µl/孔之含有25%條件培養基（先前自未經轉染（或天然）細胞培養物所收集之生長培養基）之生長培養基。在37°C下培育13-19 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有0.5 ml/孔之生長培養基的24孔培養盤中。在37°C下培育7 d後，以胰蛋白酶水解而分散細胞，並將其移至含有20 ml生長培養基之T-175燒瓶中。根據高含量之細胞表面CD86表現而選擇終細胞系，如使用FACS Caliber （BD Biosciences），根據製造商之建議條件，以經FITC-標記性抗-CD86抗體染色之細胞的FACS分析所測量。

$CD4^+$ T細胞增殖分析

自人類Buffy蛋白殼製備物coat preps （Stanford University

Blood Center, Stanford, CA），使用EasySep人類CD4陽性選擇套組（StemCell Technologies, #18052R），以磁性細胞分離器（RoboSep, StemCell Technologies, #20000），根據製造商之建議，使$CD4^+$ T細胞富集至>96%。以添加10% FBS （Hyclone SV30014.03）之Yssel氏培養基（Gemini Bio-Products, #400-102），將經富集之$CD4^+$ T細胞調整至1 x 10^6細胞/ml之密度，並以50 µl/孔加入96孔組織培養盤中。對於表現膜連人類CD86之HEK293細胞以6000 rads （Stanford Research Institute, Menlo Park, CA）進行輻射照射，以該相同培養基調整至1 x 10^6細胞/ml，再以50 µl/孔加入培養盤中。以該相同培養基系列稀釋試驗化合物，並以三重試驗形式加入該等孔中。添加小鼠抗-人類CD3抗體（BD Pharmingen: 555329）至5 µg/ml之終濃度以起始細胞增殖。在37°C下培育3 d後，以1 µCi/孔之濃度加入^3H胸苷（GE Healthcare, #TRK758-5MCI），再使該等試驗盤在37°C下培育額外18 hr。使用細胞收集器（Perkin Elmer Filter Harvester D961962）收集細胞，並根據製造商之建議條件，使用液體閃爍計數器（Wallac Trilux 1450）測量^3H胸苷。使用可變斜率方程式

（Y=底值 + （頂值-底值）/（1+10^((LogIC50-X)(斜率))），以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據，以產生各試驗化合物之IC50。名辭「(LogIC50-X)(斜率)」係該方程式中之一指數。

圖7顯示取自涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組（亦即，D3-04-IgG2、D3-11-IgG2、D3-12-IgG2及D3-14-IgG2融合蛋白）之代表性$CD4^+$ T細胞增殖分析的細胞增殖曲線。其亦包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。該圖係^3H胸苷納入（cpm）對蛋白濃度（nM）之作圖。^3H胸苷納入係細胞增殖程度之指標，且係以標準技術測量。此等結果說明，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高強度或較大能力，以

在活體外抑制或壓抑CD86共刺激。

茲對諸多其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行此$CD4^+$ T細胞增殖分析。表7提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表7提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對控制組（Orencia®、LEA29Y-Ig及人類CTLA-4-IgG2融合蛋白）使用該$CD4^+$ T細胞增殖分析之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。名辭「SD （平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。

表 7. 例示性 $CD4^+$ T 細胞增殖分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50 （nM）	平均 Log IC50 （nM）	SD （平均 Log IC50） （nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	1.56	0.19	0.22
hCTLA-4-IgG2	2.24	0.35	0.28
LEA29Y-Ig	0.21[1]	-0.67	0.25
D3-02-IgG2	0.03	-1.56	NA
D3-03-IgG2	0.04[1,2]	-1.40	0.11
D3-04-IgG2	0.03[1,2]	-1.47	0.02
D3-06-IgG2	0.05[1]	-1.32	0.03
D3-11-IgG2	0.03[1,2]	-1.52	0.07
D3-12-IgG2	0.04[1,2]	-1.45	0.09
D3-14-IgG2	0.04[1,2]	-1.37	0.11
D3-15-IgG2	0.02[1,2]	-1.62	0.08
D3-17-IgG2	0.03[1,2]	-1.47	0.11
D3-20-IgG2	0.04[1,2]	-1.40	0.11
D3-27-IgG2	0.04[1,2]	-1.37	0.10
D3-29-IgG2	0.04[1,2]	-1.36	0.13
D3-31-IgG2	0.03[1,2]	-1.58	0.21
D3-34-IgG2	0.05[1,2]	-1.28	0.13
D3-39-IgG2	0.05[1,2]	-1.35	0.10
D3-50-IgG2	0.06[1,2]	-1.23	0.24
D3-52-IgG2	0.07[1,2]	-1.14	0.24
D3-53-IgG2	0.02[1,2]	-1.70	0.25
D3-54-IgG2	0.04[1,2]	-1.40	0.12
D3-56-IgG2	0.04[1,2]	-1.41	0.07
D3-62-IgG2	0.04[1,2]	-1.44	0.09
D3-65-IgG2	0.06[1,2]	-1.26	0.14

D3-69-IgG2	0.03[1,2]	-1.59	0.14
D3-70-IgG2	0.05[1,2]	-1.30	0.06
D3-71-IgG2	0.04[1,2]	-1.43	0.09
D3-72-IgG2	0.03[1,2]	-1.48	0.05
D3-73-IgG2	0.06[1,2]	-1.26	0.18
D3-75-IgG2	0.03[1,2]	-1.51	0.12
D2-IgG2	0.03[1,2]	-1.52	0.18
D3-IgG2	0.04[1,2]	-1.45	0.17

表7中之上標註記如下：[1]與Orencia之統計差異為$p<0.05$，如以單因子ANOVA及事後比較Dunnett試驗測定。[2]與LEA之統計差異為$p<0.05$，如以單因子ANOVA事後比較Bonferroni試驗測定。包含D3-02突變CTLA-4 ECD之融合蛋白僅試驗一次，並因此無法進行統計比較。

統計分析顯示，在至少兩次不同分析中試驗並以上標註記（1）指明（參見表7）之所有突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆在強度上統計優於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於Orencia®及hCTLA-4-IgG2融合蛋白之較大能力，以在活體外之$CD4^+$ T細胞分析中壓抑或抑制T細胞之增殖）。該等以上標註記（2）指明者（參見表7）亦在強度上統計優於LEA29Y-Ig融合蛋白（$p < 0.05$）（亦即，具有大於LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之$CD4^+$ T細胞分析中壓抑或抑制T細胞之增殖），如以上文所討論之單因子ANOVA及事後比較Dunnett及Bonferroni試驗測定。在包含經修飾之IgG1 Fc（如於Orencia®中）或野生型IgG2 Fc（如於hCTLA4-IgG2中）之人類CTLA-4-Ig融合蛋白間並無統計差異。此等發現說明，表7所示本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（其包含人類IgG2 Fc）與Orencia®或hCTLA-4-IgG2間之功能活性差異係CTLA-4 ECD區域中所為胺基酸變化（亦即，胺基酸取代）之直接結果。此等本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白與，例如，Orencia®（其包含經修飾之IgG1 Fc）間之功能活性差異並不係其個別Ig Fc多肽序列中差異之結果。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於

Orencia®、LEA29Y-Ig及/或hCTLA-4-IgG2融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制CD86共刺激之較高能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法或應用中具有分別相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig融合蛋白（如，人類CTLA-4-IgG2融合蛋白（"hCTLA-4-IgG2"））之較高免疫抑制強度。在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之方法或應用中具有分別相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig （如，hCTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高能力而壓抑或抑制T細胞(如，人類T細胞)之CD86-中介性共刺激，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及/或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

實例7

使用人類PBMC增殖分析（回憶抗原刺激）而測量突變CTLA-4-Ig分子之生物活性

記憶T細胞之活化係自體免疫力之一重要態樣（Rogers N.J., et al. Eur. J. Immunol 35:2909-2919 （2005））。為測量突變CTLA-4-Ig蛋白在此態樣中之免疫抑制活性，茲使用PPD抗原刺激而發展周邊血液單核細胞（PBMC）增殖分析。

以等體積之PBS稀釋人血（由捐贈者計畫新鮮收集），再使用Histopaque （Sigma, #10771） Ficoll梯度，根據製造商之建議條件進行分級分離以分離PBMCs。以添加10% FBS（Hyclone #SV30014.03）及1x PSG （青黴素、鏈黴素及麩醯胺）（Invitrogen, #10378-016）之RPMI培養基（Sigma, #R8758）稀釋PBMCs，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入96孔培養盤（BD Biosciences, #353077）中。以該相同培養基系列稀釋試驗化合

物，並以四重試驗形式加入該等孔中。添加PPD抗原（取自結核桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*，Mycos, #P-1000-001）之純化蛋白衍生物）至5 μg/ml之終濃度以起始細胞增殖。在37°C下培育5 d後，以1 μCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE Healthcare, #TRK758-5MCI），再使該等試驗盤在37°C下培育額外18 hr。以細胞收集器（FilterMate Omnifilter-96 Harvester, Perkin Elmer），使用製造商之建議條件而收集細胞，並使用閃爍計數器（Wallac Trilux, #1450-421）測量^{3}H胸苷之納入。使用非線性回歸曲線擬合模式（S型劑量反應，可變斜率）及最小平方擬合法，以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據。茲報告IC_{50}（或"IC50"）參數及其相關之95%信賴區間。

圖8顯示取自涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組（亦即，D3-IgG2、D3-12-IgG2、D3-17-IgG2及D3-29-IgG2融合蛋白）之代表性PBMC增殖分析的細胞增殖曲線。其亦包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。該圖係^{3}H胸苷納入（cpm）對蛋白濃度（nM）之作圖。^{3}H胸苷納入（其係T細胞增殖程度之指標）係以標準技術測量。此等結果說明，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig蛋白之較高強度，以在活體外抑制或壓抑記憶T細胞之增殖（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig蛋白之較大能力，以在人類PBMC增殖分析（回憶抗原刺激）中，在活體外抑制或壓抑記憶T細胞之增殖）。

茲使用其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行此使用PPD抗原刺激之PBMC增殖分析。表8提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表8提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對控制組（Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白）使用該以回憶抗原刺激之PBMC增殖分析之平均IC50值（納莫耳濃度（nM））的比較。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。名辭「SD

（平均log IC50）」表示平均log IC50值之標準差。

表8. 使用PPD抗原刺激之例示性PBMC增殖分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50（nM）	平均 Log IC50（nM）	SD （平均 Log IC50） （nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	5.92	0.67	0.37
LEA29Y-Ig	0.31	-0.71	0.53
D3-IgG2	0.03	-1.49	NA
D3-12-IgG2	0.06	-1.27	0.17
D3-14-IgG2	0.07	-1.17	0.15
D3-17-IgG2	0.07	-1.24	0.25
D3-20-IgG2	0.13	-0.91	0.18
D3-27-IgG2	0.17	-0.84	0.30
D3-29-IgG2	0.07	-1.16	0.18
D3-34-IgG2	0.51	-0.29	NA
D3-50-IgG2	0.28	-0.55	NA
D3-53-IgG2	0.05	-1.29	NA
D3-54-IgG2	0.01	-2.00	NA
D3-56-IgG2	0.01	-1.92	NA
D3-69-IgG2	0.01	-2.00	NA
D3-71-IgG2	0.01	-1.87	NA
D3-75-IgG2	0.01	-2.02	NA
D3-76-IgG2	0.01	-1.89	NA

註記：表8中之名辭「NA」意謂「未取得」。

統計分析顯示，在所有試驗之突變CTLA-4-Ig融合蛋白皆在強度上統計優於Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白兩者，其$p < 0.05$，如分別以上文所討論之單因子ANOVA及事後比較Dunnett及Bonferroni試驗測定（亦即，突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在人類PBMC增殖分析（回憶抗原刺激）中，在活體外抑制或壓抑記憶T細胞之增殖）。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制記憶T細胞（如，人類記憶T細胞）增殖之較高能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法或應用中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig （如，人類

CTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高免疫抑制強度。在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之方法或應用中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig（如，hCTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高能力而壓抑或抑制記憶T細胞（如，人類記憶T細胞）之增殖，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及/或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

實例8

使用人類MLR （混合淋巴細胞反應）分析而測量突變CTLA-4-Ig分子之生物活性

CTLA-4-Ig以及其特定變體係試管中初級同種異體反應之強抑制劑（Vaughan, A. N. et al., J. Immunol. 165:3175-3181（2000）; Wallace P. M., et al., Transplantation 58:602-610（1994））。為在此等分析中測量突變CTLA-4-Ig蛋白之改良活性，茲發展出人類混合淋巴細胞反應（MLR）分析。

以等體積之PBS稀釋人血（由捐贈者計畫新鮮收集），再使用Histopaque （Sigma, #10771） Ficoll梯度，根據製造商之建議條件進行分級分離以分離PBMCs。以添加10% FBS（Hyclone #SV30014.03）及1x PSG （Invitrogen, #10378-016）之RPMI培養基（Sigma, #R8758）稀釋取自一捐贈者之PBMCs，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入96孔培養盤（BD Biosciences, #353077）中。對於取自取自一不同捐贈者之PBMCs以2500 rads進行輻射照射，以該相同培養基稀釋，再以1 x 10^5細胞/孔之密度，加入該相同培養盤中。以該相同培養基系列稀釋試驗化合物，並以四重試驗形式加入該等孔中。在37°C下培育5 d後，以1 μCi/孔之濃度加入^{3}H胸苷（GE

Healthcare, #TRK758-5MCI)，再使該等試驗盤在37°C下培育額外18 hr。以細胞收集器（FilterMate Omnifilter-96 Harvester, Perkin Elmer)，使用製造商之建議條件而收集細胞，並使用閃爍計數器（Wallac Trilux, #1450-421）測量^{3}H胸苷之納入。使用非線性回歸曲線擬合模式（S型劑量反應，可變斜率）及最小平方擬合法，以GraphPad Prism 5軟體分析細胞增殖數據。茲報告IC50參數及其相關之95%信賴區間。

圖9顯示取自涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白D3-IgG2之代表性MLR增殖分析的細胞增殖曲線。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。該圖係^{3}H胸苷納入（cpm）對蛋白濃度（nM）之作圖。^{3}H胸苷納入（其係T細胞增殖程度之指標）係以標準技術測量。此等結果說明，D3-IgG2具有顯著大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig蛋白之較高強度，以在活體外分析中抑制或壓抑T細胞之初級同種異體刺激（如，D3-IgG2具有大於Orencia®或LEA29Y-Ig蛋白之較大能力，以在活體外之MLR分析中抑制或壓抑T細胞增殖之初級同種異體刺激)。

茲對諸多其他本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白進行此MLR分析。表9提供代表性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之數據摘要。表9提出例示性突變CTLA-4-Ig融合蛋白相對參照控制組（Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白）在該MLR分析中之平均IC50值（納莫耳濃度（nM)）的比較。將取自個別實驗之IC50值進行平均以提供平均IC50值，其再用以進行統計分析。名辭「SD （平均log IC50)」表示平均log IC50值之標準差。示於表9之突變CTLA-4-Ig融合蛋白的平均IC50值低於Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白個別之平均IC50值。

在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其咸信在強度上優於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之強度的（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其咸信具有大於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之MLR分析中

抑制或壓抑T細胞增殖之初級同種異體刺激）。

咸信，根據本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白在活體外分析中壓抑或抑制T細胞（如，人類記憶T細胞）初級同種異體刺激之預期增強能力，此等突變蛋白應亦在活體內之治療及/或預防方法或應用中具有相較於Orencia®及/或LEA29Y-Ig融合蛋白之較高免疫抑制強度。

在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有顯著大於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig （如，人類CTLA-4-IgG2）融合蛋白之較高強度，以在活體外抑制或壓抑T細胞之初級同種異體刺激（如，突變CTLA-4-Ig融合蛋白具有大於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig融合蛋白之較大能力，以在活體外之MLR分析中抑制或壓抑T細胞增殖之初級同種異體刺激）。在一態樣中，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白咸信在活體內之方法或應用中具有相較於Orencia®、LEA29Y-Ig及/或人類CTLA-4-Ig融合蛋白之較大能力而壓抑或抑制T細胞（如，人類T細胞）之初級同種異體刺激，諸如，在，如，用以在對象體內壓抑或抑制免疫反應之治療及/或預防方法（如，在哺乳動物（諸如，如，人類）體內的免疫系統疾病或病症之活體內治療中）、用以抑制接受者（如，哺乳動物，諸如，如，人類）對於來自捐贈者之組織或器官移植排斥之方法、以及/或是本文他處所述之其他治療或診斷方法。

表 8. 例示性 NLR 分析之數據摘要

融合蛋白（二聚體）	平均 IC50（nM）	平均 Log IC50（nM）	SD （平均 Log IC50） （nM）
Orencia®融合蛋白二聚體	12.53	1.05	0.23
LEA29Y-Ig	0.92	-0.19	0.48
D3-IgG2	0.06	-1.26	NA
D3-12-IgG2	0.09	-1.11	0.34
D3-14-IgG2	0.08	-1.20	0.43

D3-17-IgG2	0.09	-1.15	0.43
D3-20-IgG2	0.14	-1.11	0.64
D3-27-IgG2	0.13	-1.29	0.86
D3-29-IgG2	0.11	-1.14	0.54
D3-34-IgG2	0.10	-1.09	0.39
D3-53-IgG2	0.02	-1.64	0.11
D3-54-IgG2	0.07	-1.13	NA
D3-56-IgG2	0.06	-1.23	NA
D3-69-IgG2	0.04	-1.41	NA
D3-71-IgG2	0.05	-1.32	NA
D3-75-IgG2	0.08	-1.11	NA
D3-76-IgG2	0.08	-1.11	NA

註記：表9中之名辭「NA」意謂「未取得」。

實例9

可如下而以可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白治療罹患類風濕性關節炎之成人病患。製備一種醫藥組合物，其包含可溶性之本發明突變CTLA-4-Ig融合以及醫藥可接受之賦形劑或載體（如，PBS）。例示性之可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含以一或多個雙硫鍵彼此連結之兩個相同單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含本發明之突變CTLA-4 ECD多肽，其包含選自SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列，在其C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。例示性之融合蛋白包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之多肽序列者。此等融合蛋白一般而言係以二聚體形式表現。該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為介於自約0.05 mg/ml至約200 mg/ml、自約1 mg/ml至約150 mg/ml、自約25 mg/ml至約120 mg/ml、自約1 mg/ml至約100 mg/ml、自約25 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約75 mg/ml、自約100 mg/ml至約150 mg/ml及其類似者。舉例而言，該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為約1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、15 mg/ml、25 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、

80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml或200 mg/ml。此種醫藥組合物之pH係約pH 4至約pH 10，包括，約pH 5至約pH 9、約pH 6.5至約pH 8.5，較佳者為約pH 6.0至pH 8.0、約6.5至pH 7.5或約pH 7.0至約pH 8.0。

該病患類風濕性關節炎之治療係藉著以靜脈或皮下注射而對該病患投與治療有效量之該突變CTLA-4-Ig（如，有效劑量）而進行。該注射位點可為，如，該病患之手臂、軀幹或腿。該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之有效劑量一般而言係，但不限於，如，自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg該成人病患體重，諸如，如，自約0.01-5.0 mg/kg、約0.01-3.0 mg/kg、約0.05-2.5 mg/kg、約0.1-2.0 mg/kg、約0.1-1.0 mg/kg、約0.01-0.05 mg/kg、約0.5-1.5 mg/kg、約1.0-4.0 mg/kg、約1.0-3.0 mg/kg、約1.0-2.0 mg/kg，其包括，但不限於，對該病患投與約0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/ml、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg或100 mg/kg該病患體重。或者，可使用述於上文「本發明之方法」章節之有效量或劑量或劑量範圍。該待投與之融合蛋白劑量係根據該融合蛋白之強度及/或該病患類風濕性關節炎之症狀或徵兆的嚴重性而判定。對於該病患所投與之總突變CTLA-4-Ig融合蛋白量可為，如，自約0.01 mg至約100 mg，一般而言係自約1 mg至100 mg、自約10 mg至100 mg、自約10 mg至約75 mg或自約10至約50 mg。對該病患所投與之醫藥組合物體積係根據該融合蛋白在該組合物中之濃度以及待投與之融合蛋白劑量而判定。就皮下注射而言，一般而言可以注射投與1至2毫升包含該融合蛋白之醫藥組合物。就靜脈注射而言，其可投與適當體積之包含該融合蛋白之醫藥組合物。

在起始劑量之注射後，可在，如，該起始投劑之1、2、3或4週後，經由皮下（如，s.c.注射）或靜脈內（如，i.v.注射）

而對該病患投與第二相同劑量之該融合蛋白。該投劑時程可為每兩週一劑、一劑/月、每兩個月一劑等，根據，如，該病患之病況而定。後續之投劑可隨需要而每四週或是以較高或較低之頻率進行投藥。投劑之頻率可取決於該病患之病況而各異，並可取決於該病患類風濕性關節炎症狀或徵兆之嚴重性。

在一例示性之態樣中，其係根據該病患之條件以及對該藥物之反應，隨需要而每週一次或每月一次，對罹患類風濕性關節炎之人類，以皮下注射，投藥足以提供約0.5 mg/kg體重之該融合蛋白二聚體劑量的包含本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（諸如，D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2等）以及醫藥可接受性賦形劑之醫藥組合物量。

在另一例示性之態樣中，其係根據該病患之條件以及對該藥物之反應，隨需要而每週一次或每月一次，對罹患類風濕性關節炎之人類，經由靜脈內而投藥足以提供約10 mg/kg體重之該融合蛋白二聚體劑量的包含本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體（諸如，D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2等）以及醫藥可接受性賦形劑之醫藥組合物量。可使用標準之i.v.流程而進行此種投藥。舉例而言，可使該醫藥組合物結合另一液體而輸液進入該人類體內，諸如，無菌鹽水溶液、葡萄糖溶液或其他等滲溶液，經由標準之靜脈進入裝置而使用標準之連續靜脈滴液進行。

各個上述以s.c.或i.v.注射所進行之治療方法預期可減少或減輕該病患體內一或多種與類風濕性關節炎相關之徵兆、症狀或生物反應，諸如，如，發炎、關節壓痛、關節腫脹、疼痛、組織萎縮及僵硬。此種治療可降低該疾病在該病患體內之進一步進展，特別是在結締、肌肉及骨骼組織中。舉例而言，此種治療可降低該病患體內結締組織、萎縮肌肉組織、骨骼、關節、軟骨及/或脊柱及其類似者之損傷或惡化的進展。其他該疾病之臨床症狀，包括對於皮膚、中樞神經系統或器官所造成之損傷，亦可獲得減少或是減輕。此種治療亦可改善該病患之身體

機能。

實例10

可如下而以可溶性之突變CTLA-4-Ig融合蛋白治療正在進行用於預防器官移植排斥之維持治療的成人病患。製備一種醫藥組合物，其包含可溶性之本發明突變CTLA-4-Ig融合以及醫藥可接受之賦形劑或載體（如，PBS或其類似者）。例示性之可溶性突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含以一或多個雙硫鍵彼此連結之兩個相同單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含本發明之突變CTLA-4 ECD多肽，其包含選自SEQ ID NOS:1-73中任一者之多肽序列，在其C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。例示性之融合蛋白包括該等包含示於SEQ ID NOS:74-79、197-200、205-214及219-222中任一者之多肽序列者。該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為介於自約0.05 mg/ml至約200 mg/ml、自約1 mg/ml至約150 mg/ml、自約25 mg/ml至約120 mg/ml、自約1 mg/ml至約100 mg/ml、自約25 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約100 mg/ml、自約50 mg/ml至約75 mg/ml、自約100 mg/ml至約150 mg/ml及其類似者。舉例而言，該融合蛋白於該醫藥組合物中之濃度可為約1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、15 mg/ml、25 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml或200 mg/ml。此種醫藥組合物之pH係約pH 4至約pH 10，包括，約pH 5至約pH 9、約pH 6.5至約pH 8.5，較佳者為約pH 6.0至pH 8.0、約6.5至pH 7.5或約pH 7.0至約pH 8.0。

用於預防或壓抑器官移植排斥之維持治療係藉著以靜脈或皮下注射而對已接受器官移植（如，腎臟移植）之該病患投與治療有效量之該突變CTLA-4-Ig （如，有效劑量）而進行。該注射位點可為，如，該病患之手臂、軀幹或腿。該投藥之突變CTLA-4-Ig融合蛋白有效劑量一般而言係，但不限於，如，

自約0.01 mg/kg至約100 mg/kg該成人病患體重，諸如，如，自約0.01-5.0 mg/kg、約0.01-3.0 mg/kg、約0.05-2.5 mg/kg、約0.1-2.0 mg/kg、約0.1-1.0 mg/kg、約0.01-0.05 mg/kg、約0.5-1.5 mg/kg、約1.0-4.0 mg/kg、約1.0-3.0 mg/kg、約1.0-2.0 mg/kg，其包括，但不限於，對該病患投與約0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.075 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/ml、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg或100 mg/kg該病患體重。或者，可使用述於上文「本發明之方法」章節之有效量或劑量或劑量範圍。該待投與之融合蛋白劑量係根據該融合蛋白之強度及/或該病患器官移植排斥之症狀或徵兆的嚴重性而判定。對於該病患所投與之總突變CTLA-4-Ig融合蛋白量可為，如，自約0.01 mg至約100 mg，一般而言係自約1 mg至100 mg、自約10 mg至100 mg、自約10 mg至約75 mg或自約10至約50 mg。對該病患所投與之醫藥組合物體積係根據該融合蛋白在該組合物中之濃度以及待投與之融合蛋白劑量而判定。該融合蛋白可在移植後之任何天數投與，如，移植後之第1、4、7、14、28、56、84天等。就皮下注射而言，一般而言可投與1至2毫升之該醫藥組合物。就靜脈注射而言，其可投與適當體積之包含該融合蛋白之醫藥組合物。

在起始劑量之注射後，可在，如，該起始投劑之1、2、3或4週後，經由皮下或靜脈內而對該病患投與第二相同劑量之該融合蛋白。該投劑時程可為每兩週一劑、一劑/月、每兩個月一劑等，根據，如，該病患之病況而定。後續之投劑可隨需要而每四週或是以較高或較低之頻率進行投藥，且如需要可以每月之基礎而繼續進行。投劑之頻率可取決於該病患之病況而各異，並可取決於該病患器官移植排斥症狀或徵兆之嚴重性。

此種治療預期可減少或減輕該病患體內一或多種與器官移植排斥相關之徵兆、症狀或生物反應，諸如，如，移植器官

之急性排斥、移植器官之慢性排斥、移植器官之功能降低、該病患體內血清肌酸酐含量之增加及/或T細胞進入該移植器官之較高浸潤情形。此種治療可降低該移植器官由該病患之免疫系統排斥之可能性。

實例11

突變CTLA-4-IgG2融合蛋白在大鼠體內之藥物動力評估

藥劑在對一活生物體進行外來投與之後之血清濃度會大量影響其治療功效，且其可由藥物動力學（PK）評估判定。在下列流程中，其在大鼠體內，相較於hCTLA-4-IgG2及Orencia®融合蛋白試驗物兩者，評估代表性突變CTLA-4-IgG2試驗物D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2及D3-75-IgG2之PK特性。該實驗設計、數據產生及釋意述於後文。

活體內研究設計

在至少5天之適應期後，使用重量相符之雄性Hans Wistar大鼠。根據其體重而計算個別動物之試驗物投劑體積，以使其皆接受1mg/kg之試驗物。因此，典型之150克（g）大鼠即接受150 μl之投劑體積，因每個試驗物皆係在PBS中以1mg/ml製備。以靜脈內(i.v.或IV)之團劑，或試劑藉由皮下(縮寫為"s.c."或"SC"）途徑，傳遞上述突變CTLA-4-IgG2試驗物、hCTLA-4IgG2或Orencia®融合蛋白之單一投藥。該試驗之大小足以進行每個時間點最少四次之300 μl血液取樣，同時限制自任何特定大鼠所取出之血液體積不超過其10%總血液體積。血液取樣之時程就i.v.及s.c.投藥而言分別為取樣前、取樣後5分鐘（min）、30 min、2小時（h）、4 h、8 h、1天（d）、2 d、3 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d及14 d，或是取樣後5 min、30 min、2 h、4 h、8 h、1 d、2 d、3 d、4 d、6 d、8 d、10 d,11 d、12 d、13 d、14 d 及15 d。自各個血液樣本中製備血清，並以ELISA

試驗以定量經投藥試驗物之存在。

PK ELISA法

使存在於該等血清樣本中之突變CTLA-4-IgG2、hCTLA-4IgG2或Orencia®融合蛋白與預先塗覆於微滴定盤上之人類CD80-小鼠IgG（如上所述）進行連結。藉由添加辣根過氧化酶（HRP）複合性山羊抗人類IgG（Jackson ImmunoResearch #109-035-098）而達成偵測。經由使用顯色性之HRP受質3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（TMB）添加過氧化氫（Kem-En-Tec #4390A）進行定量，添加0.2N硫酸（H_2SO_4）中止反應，再以分光光度計而在450 nm測量光學吸收。在添加至ELISA盤中前，將血清樣本預稀釋為1/20，以使該基質標準化至5%大鼠血清，並在5%大鼠血清中進一步稀釋，以產生總共八個稀釋物。對抗使用添加至5%大鼠血清中之相同試驗物的滴定而製備之標準曲線，定量各個經稀釋血清樣本之濃度。該標準曲線係介於自10至0.078 ng/ml，且其精確範圍係判定為自5%大鼠血清中背景值之兩倍至5 ng/ml。使用在5%大鼠血清中以該標準曲線精確範圍之高、中、低濃度所製備之相同試驗物的品管（QC），評估該標準曲線之品質。QC接受標準係使該觀察QC濃度為在該預期QC濃度之20%之內。藉由平均該等以該標準曲線精確範圍內之光學密度（ODs）而指定予稀釋物之濃度，產生個別未知血清樣本之濃度。使用至少4份個別血清樣本以計算各所列時間點之平均血清濃度。

PK參數

圖15A及15B顯示在大鼠體內，使用單一（A）靜脈（IV）團藥或（B）皮下（SC）注射形式，以1 mg/kg投與之Orencia®融合蛋白、hCTLA-4-IgG2及突變CTLA-4-IgG2融合蛋白的PK特性。誤差條代表平均值之標準差（SD）。虛線代表該ELISA之定量下限（在100%血清中~3 ng/ml之試驗物）。在試驗物於

時間0 h之投與後之各個所列時間點的平均血清濃度包含圖15中之半-log濃度-時間特性內容的數據點。

使用WinNonLin模式201 （i.v.-團藥輸入）或是模式200（血管外之輸入），分別針對該i.v. （IV）或s.c. （SC）途徑，使用平均血清濃度而產生PK參數。表10分別摘述s.c.及i.v.投藥途徑之重要PK參數。

表 10. 使用單一 I.V.或 S.C.團藥形式而以 1 mg/kg 對大鼠投藥之 Orencia® 融合蛋白、hCTLA-4-IgG2 及突變 CTLA-4-IgG2 融合蛋白之 PK 參數摘要

化合物	途徑	Cmax (ug/L)	T1/2 (h)	AUC (h*ng/L)	Cl (ml/h/kg)	Vz (ml/kg)
Orencia	SC	3.3	70.0	391	2.6	258.13
CTLA-4IgG2	SC	5.9	45.0	838	1.2	77.49
D3-29	SC	4.6	11.2	650	1.5	24.90
D3-54	SC	4.5	23.6	528	1.9	64.52
D3-56	SC	7.4	23.7	1049	1.0	32.67
D3-69	SC	6.0	28.1	967	1.0	41.97
D3-75	SC	9.0	56.4	1204	0.8	67.59
Orencia	IV	22.3	42.3	728	1.37	83.9
CTLA-4IgG2	IV	66.2	49.8	2483	0.40	29.0
D3-29	IV	43.0	33.0	912	1.10	52.2
D3-54	IV	20.6	39.4	1034	0.97	55.0
D3-56	IV	34.2	15.3	1822	0.55	12.1
D3-69	IV	81.9	83.0	2133	0.47	56.1
D3-75	IV	30.1	65.4	2326	0.43	40.5

Cmax係指試驗物之最大血清濃度。終期半生期值（T1/2）係在該濃度-時間特性測定之終期中，該試驗物在血清中之濃度減少一半所需之以小時計之時間。血清濃度-時間曲線下之面積（AUC）係使用梯形規則而自時間零點至無限定量。清除值（Cl）係使用方程式劑量/AUC計算，而終期之分布體積（Vz）則係使用方程式Cl/k計算。

各化合物之生物可利用性因子（F）示於表11，且係藉由計算皮下途徑之AUC/靜脈內途徑之AUC而判定。

表 11. Orencia®融合蛋白、hCTLA-4-IgG2、D3-29-IgG2、D3-54-IgG2、D3-56-IgG2、D3-69-IgG2 及 D3-75-IgG2 融合蛋白之生物可利用性比較

化合物	生物可利用性
Orencia	0.54
CTLA-4IgG2	0.34
D3-29	0.71
D3-54	0.51
D3-56	0.58
D3-69	0.45
D3-75	0.52

儘管具有不同之IgG架構，人類CTLA-4IgG2及Orencia®融合蛋白展示類似之PK特性，其說明，當功能域係恆定時，此等個別試驗物中之人類IgG2及突變人類IgG1 Fc部分具有相當之PK活性。藉由推論，突變CTLA-4-IgG2融合蛋白相較於Orencia®融合蛋白在PK特性上之任何變化因此應可歸因於功能域中之差異而非Fc部分。

就各個突變突變蛋白而言，其移除係緩慢者，如以該長半生期值及曲線下之大面積而建議。相較於Orencia®融合蛋白（其在以SC或IV途徑投與時分別具有70.0或42.3小時之半生期），其以SC投劑之半生期係介於自11.2至56.4 hr，且以IV投劑係自15.3至83.0小時(h)。突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之AUC值平均優於Orencia®融合蛋白。在SC投劑後，其平均值係879.5 +/- 281.6 h*kg*ng/L/mg （相較於SC Orencia®融合蛋白之391h*kg*ng/L/mg ），而IV投藥則產生1645.5 +/- 641.1h*kg*ng/L/mg之AUC值（相較於IV Orencia®融合蛋白之728h*kg*ng/L/mg)。

兩種投藥途徑之分布體積皆為相似，其中突變CTLA-4-IgG2融合蛋白係分布至血清之外但在血管外液體中，如以44.8 ml/kg之平均值所建議，其係高於30 ml/kg之血漿參照體積，且係在標準大鼠之300 ml/kg胞外液體參照限制之內

（Davies, B. et al., Pharm. Res. 10（7）:1093-95 （1993））。

大部分突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之生物可利用性亦為相似，其平均值為0.6+/- 0.1 （相較有利於Orencia®融合蛋白之0.53生物可利用性）。

最後，相較於Orencia®融合蛋白，突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之Cmax一般而言係較高。相較於Orencia®融合蛋白（其在以SC或IV途徑投與時分別具有3.3或22.3 ug/L之Cmax值），其以SC投劑之Cmax值係介於自4.5至9.3ug/L，且以IV投劑係自20.6至81.9 ug/L。

整體言之，該PK數據顯示，在經由SC或IV途徑而以1mg/kg對大鼠投與時，所有經評估之突變CTLA-4-IgG2融合蛋白一般而言具有相對Orencia®融合蛋白之非較差PK特性，且當功能域係恆定時，IgG1或IgG2 Fc部分係為相當。

實例12

此實例敘述創造穩定轉染細胞系以表現本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白，使用可用於進行該突變CTLA-4-Ig融合蛋白之慣常實驗室規模製備之細胞系進行，並自該細胞表現培養基中純化該突變CTLA-4-Ig融合蛋白。儘管此實例特定敘述一種用以創造穩定轉染之CHO-K1細胞系以表現D3-54-IgG2融合蛋白之方法，使用此種細胞以進行實驗室規模製備並自培養基中純化該蛋白，本文所述之方法可以任何本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白及/或上文所揭示之任何適當細胞系而使用。

創造穩定轉染細胞系

材料

CHO-K1天然（未轉染）細胞：將可適應化學限定培養基中之無血清懸浮生長的CHO-K1細胞（細胞ID: M4-PeM-0436-112-01）貯存在液態氮蒸汽相中（Dewar

MVE1536P）。解凍一小瓶之M4-PeM-0436-112-01，並在搖瓶中以CD OptiCHO™培養基（Invitrogen, #12681）進行培養。該等培養物可提供用以進行轉染之細胞以及用以進行生長及選殖之條件培養基。所有之培養物皆係在37 ℃、5% CO_2下生長。

質體：將編碼融合人類IgG2a Fc區域之D3-54突變CTLA-4 ECD的DNA插入CET1019AS UCOE載體（Millipore）中，並使用該所得之質體CET1019AS-D3-54-IgG2進行所有之轉染。

細胞培養基：在所有培養物中使用添加2% v/v 200 mM L-麩醯胺（Invitrogen #25031）之CD Opti-CHO （Invitrogen #12681）化學限定無動物組成份培養基。

條件培養基：條件培養基係藉著在CD Opti-CHO培養基中培養母CHO-K1細胞系而取得。在細胞計數≥ 5 x 10^5細胞/ml時，離心該細胞培養物，並對該條件培養基上清液進行無菌過濾。每天新鮮製備條件培養基以進行使用或是貯存在2-8℃下最多7天。

50%條件培養基：使條件培養基（上述）結合等體積之新鮮細胞培養基；在其使用之每天新鮮製備。

分析方法

細胞計數及存活性係以Cedex或Cedex HiRes細胞計數器（Innovatis）進行。

對於表現該突變CTLA-4-Ig融合蛋白（D3-54-IgG2）之純系的初始篩選係以ELISA進行。以hCD80-小鼠Ig融合蛋白隔夜塗覆ELISA盤。第二天，以二重分析之方式，使用50-及200-倍之稀釋物，將待分析之樣本轉移至該等ELISA盤中。在兩小時之共置後，加入抗-人類IgG-HRP抗體，並進行共置30分鐘。以TMB對該等試驗盤進行顯影，並在450nm下視讀。報導粗光學密度（OD）。

D3-54-IgG2融合蛋白之定量測定係使用Poros A/20管柱

（ABI # 1-5024-12）而以蛋白A HPLC法進行。使用兩種緩衝液：緩衝液A：50 mM磷酸，150 mM氯化鉀，pH 7.6 ± 0.1，以及緩衝液B：50 mM磷酸，150 mM氯化鉀，pH 2.5 ± 0.1。兩種緩衝液皆額外添加5%異丙醇。平衡及樣本注射後之清洗係以42%緩衝液A及58%緩衝液B （pH 6.5）進行。溶析係使用1分鐘內之12%緩衝液A及88%緩衝液B進行。

流程

使用於創造用以進行D3-54-IgG2融合蛋白GMP製備之穩定細胞系的天然黏附CHO-K1細胞適應進行化學限定CD OptiCHO™培養基中之懸浮生長。解凍一小瓶之此等天然CHO-K1細胞，並使其在含有CD OptiCHO™培養基之125 ml搖瓶中生長至5 x 10^5個活細胞/ml之密度。使2 x 10^6個活細胞再懸浮於400 µl之50%條件培養基中，並在小管中使其與20 µg之質體DNA （D3-54-IgG2於CET1019AS UCEO載體中）結合。使用Gene Xcell Pulser （BioRad），以320伏特（V）及15毫秒（ms）之方波脈衝長度進行電穿孔。進行二重實驗之轉染，並接著集合該等細胞。將該等集合之細胞移至含有5 ml之50%條件培養基的T-25燒瓶中，並進行培育兩天。

將經轉染之細胞直接分配至96孔試驗盤中進行選殖，或是以抗生素選擇進行培養，直到取得穩定之集合物為止，再接著分配至96孔試驗盤中。在電穿孔後兩天，以含有8 µg/ml嘌呤黴素以產生選擇壓力之條件培養基將該培養物稀釋至1250細胞/ml。以每孔200 µl （250細胞/孔）將該等細胞分配至96孔試驗盤中。培育該等試驗盤約10天以殺死未轉染及瞬時轉染之細胞。在10-12天後，目視檢驗每一試驗盤中之每一孔，以辨識具有單一純系之孔。其後再次檢驗此等孔，以確認其含有適於在24孔試驗盤中進行擴增之單一、健康純系。

在電穿孔後兩天，離心該培養物，再使其再懸浮於含有7 µg/ml嘌呤黴素以產生選擇壓力之50%條件培養基中。亦以相

同培養基中之未轉染細胞接種控制組燒瓶。根據進行中之最適化研究，在3天後將嘌呤黴素之濃度增加至8 μg/ml。在控制組燒瓶中之所有細胞死亡時，於選擇10-12天後產生穩定之集合物。以蛋白A HPLC確認該穩定集合物中之產物表現，而該培養物之存活率經確認為> 95%。以不含嘌呤黴素之條件培養基系列稀釋該等細胞直到3.8細胞/ml之終密度。以每孔200 μl（75細胞/盤或0.8細胞/孔）將該等細胞播種於96孔試驗盤中。

在一天後，目視檢驗每一試驗盤中之每一孔，以辨識具有單一細胞或純系之孔。第二天，選擇具有2-4個細胞之單一純系之孔。排除任何具有超過兩個純系之孔。由第二操作員確認該等選擇。其後再次檢驗該等孔，以確認其含有適於在24孔試驗盤中進行擴增之單一、健康純系。

將取自96孔試驗盤之細胞在含有每孔1 ml條件培養基（含8 μg/ml嘌呤黴素）之24孔試驗盤中進行擴增。將取自該等96孔試驗盤之具有單一純系之所選孔的全部內含物移至24孔試驗盤之個別孔中。自該24孔試驗盤之各個新孔中取出200 μl以清洗該96孔試驗盤之對應孔，接著再移回。為進行備用，將200 μl含有8 μg/ml嘌呤黴素之條件培養基加回該96孔試驗盤之各孔中。

1-3天後，自該等24孔試驗盤之各孔中取樣，並以ELISA試驗D3-54-IgG2之表現。根據該等粗ELISA OD值以及適當生長之表現，選擇純系進行進一步之擴增。

使根據ELISA及所觀察到之生長結果的首選35-40個純系在含有5 ml條件培養基（含8 μg/ml嘌呤黴素）之T-25燒瓶中進行擴增。將取自該等24孔試驗盤之各個所選孔的全部內含物移至個別之T-25燒瓶中。以該相同培養基清洗該等孔中之殘餘細胞，並加至對應之T-25燒瓶中。為進行備用，將1 ml含有8 μg/ml嘌呤黴素之條件培養基加回該24孔試驗盤之各孔中。

藉著選擇具有最高產率之純系而進一步減少純系數目。以1-2 x 10^5個活細胞/ml之密度使細胞再懸浮於新鮮培養基中，並

播種至T25燒瓶（5 ml培養物）或125 ml搖瓶（12 ml培養物）中。使該等培養物進行培育22-24小時，並接著進行終細胞密度及存活性測定，接著取樣而以蛋白A HPLC進行產物濃度測定。產率係藉著使該所生產蛋白之總量除以該燒瓶中活細胞之總數，再除以培養持續時間而計算。將該等單位轉化為每天每細胞之皮克（picograms）數或"pcd"。根據其pcd值而排序純系，但略去並未顯示顯著生長之純系。使該等首選純系在125 ml搖瓶中進行擴增，以進行冷凍保存以及生長及生產之進一步評估。

將待進行進一步評估之純系以1 x 10^5個活細胞/ml之密度播種於250 ml搖瓶中之50 ml新鮮培養基中。當細胞密度到達1 x 10^6個活細胞/ml時，使該培養物傳代至新搖瓶中，同樣係以1 x 10^5個活細胞/ml之密度加至50 ml新鮮培養基中。再次重複該傳代一次。在此第三傳代之過程中，每日對該培養物取樣以進行細胞計數、存活性及產物濃度測定（以蛋白A HPLC進行）。

根據生長及特定生產率而選擇表現D3-54-IgG2融合蛋白之首選純系進行次選殖。如上節針對穩定集合物所述者進行限制稀釋而進行次選殖，除外在任何時間皆不使用嘌呤黴素。純系之擴增、篩選及評估亦如上所述進行。

使所選之次純系在搖瓶中重複傳代約90天以評估生產穩定性。在各傳代時，使細胞以1 x 10^5個活細胞/ml之密度播種於125 ml搖瓶中之25 ml新鮮培養基中。每3-4天傳代該等培養物。在各次傳代之前，測量細胞之密度及存活性，接著取樣而以蛋白A HPLC進行產物濃度測定。

自以pcd值排序之時至安定性評估中之不同時點，將所選之純系及次純系以冷凍保存。冷凍培養基係以90%生長培養基及10% DMSO （Sigma）新鮮製備。使取自搖瓶培養物之細胞進行離心，再以介於2-10 x 10^6個細胞/ml之密度再懸浮於冷凍培養基中。將該細胞懸浮液以1 ml之小份分配至凍存管中。將該等凍存管至於異丙醇冷凍容器中，並在–80°C下隔夜貯存。

在第二天將該等經冷凍之小瓶移至液態氮蒸汽相貯槽中。

突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之製備

解凍含有1 ml體積表現D3-54-IgG2融合蛋白之CHO-K1細胞的凍存管，並使其在37°C及5% CO_2下，在含有CD OptiCHO™培養基之125 ml搖瓶中，生長至5 x 10^5個活細胞/ml之密度。結合數個燒瓶而以1-2 x 10^5個細胞/ml之密度接種波浪袋(wave bag)中之5或10 L體積CD OptiCHO™培養基(含4 mM麩醯胺)。使該波浪袋培養物維持在添加5% CO_2之37°C恆溫培育箱中，購自Sartorius Stedim Biotech之裝置的震盪平台設定為18-22 rpm及8度之角度。每日對該培養物取樣以測定細胞計數、存活性、營養素含量、代謝特性及突變CTLA-4-IgG2（亦即，D3-54-IgG2）之表現量（以蛋白A HPLC分析進行）。當存活率降至~50%時（一般而言係接種後9-11天）收集細胞。使用深層過濾及無菌過濾之組合進行過濾而澄清該細胞培養物質，並直接使用進行進一步之處理或是貯存在2-8 °C下。

突變CTLA-4-IgG2融合蛋白之純化

使用AKTA Explorer HPLC系統（GE Healthcare），以蛋白-A親和層析純化突變CTLA-4-IgG2融合蛋白（D3-54-IgG2）。使突變CTLA-4-Ig融合蛋白（D3-54-IgG2）在PBS緩衝液（Invitrogen）中連結MabSelect Protein A FF管柱（GE Healthcare, #17-5079-01)(以~10mg/ml層析培養基加樣)，以該相同緩衝液清洗，以100 mM檸檬酸緩衝液（pH 4.0）溶析，再接著加入1/10體積之2M Tris鹼而進行中和。使用切向流過濾（TFF）系統，以滲濾（diafiltration）進一步處理該經蛋白A純化之樣本，使緩衝液交換為20mM Tris-Cl, pH 7.5。

在Q-Sepharose管柱上，以~10mg/ml之加樣密度加樣，使用陰離子交換層析而進一步純化該經緩衝液交換之蛋白樣本。使用20管柱體積（CV）的20 mM Tris-Cl, pH 7.5中自

0-500mM NaCl之線性NaCl梯度溶析連結之蛋白。收集主要峰值級份，並測量280 nm之吸收值而測定濃度。

以SDS-PAGE分析確認蛋白純度，並使用尺寸排除-HPLC法測定單體含量。將樣本以小份貯存在2-8°C下或是在-20°C下於使用前長期貯存。

在前述之發明已為明確及理解而以部分細節敘述之同時，熟習技藝者將可明瞭，由此揭示內容之閱讀，可在不偏離本發明真正範圍之情形下，進行各種形式及細節之變化。咸可明瞭，本文所述之材料、實例及具體實例僅係為說明目的且並不欲進行限制，且根據其之各種修飾或變化將可對熟習技藝者建議，並包括於本申請案之精神及範圍以及附呈申請專利範圍之範圍中。本文所提及之所有出版品、專利申請案、專利或其他文件皆就所有目的而以其全文併入作為參考，其範圍如同各個此等個別之出版品、專利、專利申請案或其他文件皆個別具體指明為就所有目的而以其全文併入作為參考並以其全文述於本文之中。在衝突之情形下，本申請案（包括定義）將具有支配力。

【圖式簡單說明】

圖1係質體表現載體pCDNA突變CTLA-4-Ig之圖示，其包含編碼突變CTLA-4-Ig融合蛋白之核苷酸序列。在圖1中，各個突變CTLA-4-Ig融合蛋白包含在其C-端融合人類IgG2（hIgG2） Fc多肽之N-端的本發明突變CTLA-4 ECD多肽。

圖2A-2D分別係例示性hCD80-Ig、hCD86-Ig、LEA29Y-Ig及hCTLA-4-IgG2融合蛋白之圖示。其圖示各個融合蛋白之信號肽、胞外域（ECD）、連接子（如有任何存在）及Ig Fc域。其顯示存在於該信號肽、ECD、連接子（如有任何存在）及Ig Fc接合處之胺基酸殘基。各個融合蛋白之信號肽一般而言會在加工過程中受到切割，並因此該分泌（成熟）融合蛋白一般而

言並不含有該信號肽序列。圖2D提出人類CTLA-4-IgG2（“hCTLA-4-IgG2”）融合蛋白之圖示，其包含人類CTLA-4胞外域（“hCTLA-4 ECD”），其以其C-端共價融合人類IgG2多肽之N-端。此hCTLA-4-IgG2融合蛋白之預測多肽序列示於SEQ ID NO:161，並包含下列節段：hCTLA-4信號肽（胺基酸殘基1-37）、hCTLA-4 ECD多肽（胺基酸殘基38-161）及人類IgG2 Fc多肽（胺基酸殘基162-389）。在該hCTLA-4 ECD多肽之C-端及該人類IgG2 Fc之N-端間並未包括連接子（如，無胺基酸殘基）。該人類IgG2 Fc多肽包含人類IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域。在圖2D中，其顯示此等不同節段間接合處之胺基酸殘基。具體言之，其顯示該信號肽之末四個胺基酸殘基、該hCTLA-4 ECD多肽之首五個及末五個胺基酸殘基及該人類IgG2 Fc多肽之首五個及末五個胺基酸殘基。

該信號肽一般而言會在加工過程中受到切割，並因此該hCTLA-4-IgG2之分泌融合蛋白（成熟融合蛋白）一般而言並不含有該信號肽序列。此hCTLA-4-IgG2融合蛋白之成熟或分泌形式的多肽序列示於SEQ ID NO:162。該hCTLA-4 ECD多肽之序列係SEQ ID NO:162之胺基酸殘基1-124，且該人類IgG2 Fc多肽之序列包含SEQ ID NO:162之胺基酸殘基125-352。在另一態樣中，此成熟hCTLA-4 Ig並不包括該C-端離胺酸（K）殘基，並因此包含SEQ ID NO:162之胺基酸殘基1-351。

該成熟hCTLA-4-IgG2融合蛋白（其具有總共352個胺基酸）包含示於SEQ ID NO:160之全長WT hCTLA-4蛋白多肽序列之胺基酸殘基38-389，並係以胺基酸殘基序列：甲硫胺酸-組胺酸-纈胺酸-丙胺酸起始。如需要，該成熟形式之胺基酸可以該Met-His-Val-Ala序列之Met起始編號，將Met指定為該第一殘基（如，該ECD包含編號1-124之胺基酸殘基），如在SEQ ID NO:162中者。成熟hCTLA-4IgG2係一般而言用於前文所述實例分析中之融合蛋白形式，除非另有明示。編碼hCTLA-4-IgG2融合蛋白（其包含融合hIgG2 Fc多肽之hCTLA-4 ECD）之DNA

序列示於SEQ ID NO:163。

圖3表示下列蛋白之SDS/PAGE分析：各種質量之分子量標記物（千道耳吞（kDa））（第1道）；根據純系D3之例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D3-IgG2）（第2道）；根據純系D4之例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D4-IgG2）（第3道）；及Orencia®（Abatacept）融合蛋白（第4道）（Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ）。

圖4表示例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（亦即，D3-IgG2）由SEC分析取得之溶析特性，其說明本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白在自瞬時轉染之COS細胞純化時為尺寸上勻質者。

圖5顯示針對下列融合蛋白與hCD86-Ig之結合的典型BiacoreTM分析：Orencia®融合蛋白、LEA29Y-Ig及D3-IgG2。該分析之解離相起始於以箭頭標記之時間。該Orencia®融合蛋白（其係由融合突變hIgG1 Fc域多肽之野生型人類CTLA-4 ECD多肽構成）可有效作為野生型人類CTLA-4-Ig控制組。本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白（諸如，D3-IgG2，其具有大於Orencia®融合蛋白之較高CD86-Ig結合性）具有小於Orencia®融合蛋白之離開CD86-Ig的較慢解離速率。

圖6係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白（D3-04-IgG2、D3-11-IgG2、D3-12-IgG2、D3-14-IgG2）之PBMC增殖抑制分析（使用抗-CD3抗體刺激）結果的圖示。此等分析顯示，相較於Orencia®及LEA29Y-Ig，本發明之突變CTLA-4-Ig融合蛋白顯著較為強效而可在活體外抑制T細胞增殖。

圖7係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之$CD4^+$ T細胞增殖抑制分析（使用抗-CD3刺激及hB7.2-依賴性共刺激）的圖示。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。

圖8係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白組之

PBMC增殖抑制分析（使用PPD抗原刺激）的圖示。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig作為控制組以進行比較。

圖9係涉及例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白D3-IgG2之單向混合淋巴細胞反應（MLR）增殖抑制分析的圖示。其包括Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白作為控制組以進行比較。

圖10係顯示例示性本發明突變CTLA-4-Ig融合蛋白之結構的圖式。其圖示兩個相同之單體突變CTLA-4-Ig融合蛋白，其各包含一個成熟突變CTLA-4 ECD，其在C-端融合人類IgG2 Fc多肽之N-端。各個人類IgG2 Fc多肽包括IgG2之鉸鏈區、CH2域及CH3域。其亦顯示存在於該ECD與Ig Fc多肽接合處之例示性胺基酸殘基。根據該突變CTLA-4 ECD多肽序列及/或Ig多肽序列，位在此等組成份接合處之胺基酸殘基可各有不同。此種二聚體融合蛋白係由至少一個雙硫鍵之形成而產生，該雙硫鍵係在位於該兩個單體中類似位置之半胱胺酸殘基間形成。該等潛在涉及兩單體間雙硫鍵形成之半胱胺酸（C）殘基以星號標記。各個單體融合蛋白之信號肽一般而言係在細胞加工過程中受到切割，並因此該分泌（成熟）融合蛋白一般而言並不包括該信號肽序列。

圖11係涉及hCTLA-4-IgG2、Orencia®及LEA29Y-Ig融合蛋白之CD4+ T細胞增殖抑分析（使用抗-CD3刺激及hB7.2-依賴性共刺激）的圖示。

圖12A-12F表示野生型人類CTLA-4胞外域之多肽序列（在該圖中稱為"hCTLA4ECD"）、該LEA29Y多肽之多肽序列（在該圖中稱為"LEA29YECD"）、以及本發明突變CTLA-4 ECD多肽之多肽序列的排比。此等本發明突變CTLA-4 ECD多肽之純系名稱示於左側。與野生型人類CTLA-4 ECD多肽中者相同之胺基酸殘基以句點（.）指明。

圖13表示BLOSUM62矩陣。

圖14A-14D顯示兩胺基酸序列之例示性排比及由人工計

算所判定之排比評分。

圖15A-15B顯示在大鼠體內，使用單一（A）靜脈（IV）團藥或（B）皮下（SC）注射形式，以1 mg/kg投與之Orencia®融合蛋白、人類CTLA-4-IgG2及代表性本發明突變CTLA-4-IgG2融合蛋白的藥物動力學（PK）特性。

序列表

<110> Maxygen, Inc.
Karrer, Erik E.
Paidhungat, Madan M.
Bass, Steven H.
Neighbors, Margaret
Punnonen, Juha
Chapin, Steven J.
Viswanathan, Sridhar
Larsen, Brent R.

<120> 免疫抑制性多肽及核酸

<130> 0364.210TW

<150> US 12/251,960
<151> 2008-10-15

<150> PCT/US08/79981
<151> 2008-10-15

<150> US 60/984,631
<151> 2007-11-01

<150> US 61/051,215
<151> 2008-05-07

<160> 228

<170> FastSEQ for Windows 4.0版

<210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-1

<400> 1

Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
1				5				10					15		
Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Asn	Glu	Ile

```
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-2

<400> 2

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 3
<211> 124

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-3

<400> 3

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-4

<400> 4

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
```

Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 5
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-5

<400> 5
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 6
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-6

<400> 6

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-7

<400> 7

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-8

<400> 8
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-9

<400> 9
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro

```
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 10
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-11

<400> 10

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-12

<400> 11

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 12
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-14

<400> 12

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
```

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 13
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-15

<400> 13
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 14
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-16

<400> 14
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 15
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-17

<400> 15

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 16
<211> 124
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-19

<400> 16
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 17
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-20

<400> 17
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

```
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-21

<400> 18

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 19
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-22

<400> 19

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 20
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-23

<400> 20

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 21
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-24

<400> 21
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 22
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-25

<400> 22
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60

```
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 23
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-26

<400> 23

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 24
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-27

<400> 24
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 25
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-28

<400> 25
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 26
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-29

<400> 26
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 27
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-30

<400> 27
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

```
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 28
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-31

<400> 28

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 29
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-32

<400> 29
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 30
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-33

<400> 30
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 31
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-34

<400> 31
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 32
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-39

<400> 32
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15

```
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 33
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-50

<400> 33

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 34

<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-52

<400> 34
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 35
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-53

<400> 35
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 36
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-54

<400> 36
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 37
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-55

<400> 37

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 38
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-56

<400> 38

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-57

<400> 39
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 40
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-58

<400> 40
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45

```
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 41
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-59

<400> 41

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 42
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-60

<400> 42
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 43
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-61

<400> 43
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

```
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 44
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-62

<400> 44

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 45
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-63

<400> 45

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
```

```
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 46
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-64

<400> 46

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 47
<211> 124

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-65

<400> 47
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 48
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-66

<400> 48
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

```
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-68

<400> 49

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-69

<400> 50

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 51
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-70

<400> 51

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-71

<400> 52
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 53
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-72

<400> 53
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro

```
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 54
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-73

<400> 54

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 55
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-74

<400> 55

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-75

<400> 56

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
```

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 57
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-76

<400> 57
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1

<400> 58
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Thr Glu Ile
20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 59
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1T

<400> 59
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 60
<211> 124
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D2

<400> 60
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3

<400> 61
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

```
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 62
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D4

<400> 62

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ser Pro Gly Lys Ala Asp Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Ser Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Glu Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Thr Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 63
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D5

<400> 63

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 64
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D6

<400> 64

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 65
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D20

<400> 65
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Thr Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D21

<400> 66
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ala Pro His Asn Ala Asp Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Ser Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Glu Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60

Thr Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 67
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D23

<400> 67
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ala Pro His Asn Ala Ala Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 68
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D24

<400> 68

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 69
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D26

<400> 69

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Glu Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Val Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
```

115 120

<210> 70
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D27

<400> 70
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Glu Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Val Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 71
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D28

<400> 71
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

```
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 72
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D29

<400> 72

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Lys Ala Asp Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 73
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D31

<400> 73
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ala Pro His Asn Ala Asp Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Val Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Lys Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120

<210> 74
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-12-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 74
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95

```
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 75
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-14-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 75
```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 76
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-17-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 76

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
```

```
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 77
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-20-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 77

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
```

```
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 78
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-27-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 78

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
```

```
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 79
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-29-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 79
```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
```

```
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 80
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-1 編碼序列

<400> 80
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 81
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-2 編碼序列

<400> 81
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccacc gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 82
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-3 編碼序列

<400> 82

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 83
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-4 編碼序列

<400> 83
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 84
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-5 編碼序列

<400> 84
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctgcg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 85
<211> 372

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-6 編碼序列

<400> 85
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga tgggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 86
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-7 編碼序列

<400> 86
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 87
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-8 編碼序列

<400> 87
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180

cttgacgatt ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 88
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-9 編碼序列

<400> 88
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 89
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-11 編碼序列

<400> 89
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 90
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-12 編碼序列

<400> 90
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 91
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-14 編碼序列

<400> 91
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 92
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體

<400> 92
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360

cctgattctg at 372

<210> 93
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-16 編碼序列

<400> 93
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 94
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-17 編碼序列

<400> 94
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 95
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-19 編碼序列

<400> 95
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 96
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-20 編碼序列

<400> 96
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 97
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-21 編碼序列

<400> 97
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 98

<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-22 編碼序列

<400> 98
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 99
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-23 編碼序列

<400> 99
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 100
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-24 編碼序列

<400> 100
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120

ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 101
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-25 編碼序列

<400> 101
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 102
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-26 編碼序列

<400> 102
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 103
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-27 編碼序列

<400> 103
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 104
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-28 編碼序列

<400> 104
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
ctcgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 105
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-29 編碼序列

<400> 105
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300

ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 106
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-30 編碼序列

<400> 106
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 107
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-31 編碼序列

<400> 107
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 108
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-32 編碼序列

<400> 108
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 109
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-33 編碼序列

<400> 109
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 110
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-34 編碼序列

<400> 110
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 111
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-39 編碼序列

<400> 111
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 112
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-50 編碼序列

<400> 112
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 113
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-52 編碼序列

<400> 113
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60

tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 114
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-53 編碼序列

<400> 114
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 115
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-54 編碼序列

<400> 115
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 116
<211> 372
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-55 編碼序列

<400> 116
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 117
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-56 編碼序列

<400> 117
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 118
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-57 編碼序列

<400> 118
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240

ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 119
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-58 編碼序列

<400> 119
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 120
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-59 編碼序列

<400> 120
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 121
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-60 編碼序列

<400> 121
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 122
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-61 編碼序列

<400> 122
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 123
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-62 編碼序列

<400> 123
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 124
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-63 編碼序列

<400> 124
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctgcg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 125
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-64 編碼序列

<400> 125
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga tggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 126
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-65 編碼序列

<400> 126

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 127
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-66 編碼序列

<400> 127
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 128
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-68 編碼序列

<400> 128
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 129
<211> 372

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-69 編碼序列

<400> 129
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 130
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-70 編碼序列

<400> 130
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 131
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-71 編碼序列

<400> 131
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180

cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 132
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-72 編碼序列

<400> 132
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 133
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-73 編碼序列

<400> 133
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 134
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-74 編碼序列

<400> 134
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 135
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-75 編碼序列

<400> 135
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 136
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3-76 編碼序列

<400> 136
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360

cctgattctg at 372

<210> 137
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1 編碼序列

<400> 137
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccacc gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 138
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D1T 編碼序列

<400> 138
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 139
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D2 編碼序列

<400> 139
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactacc tgggtatggg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 140
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D3 編碼序列

<400> 140
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 141
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D4 編碼序列

<400> 141
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatata gctcacccgg gaaagccgac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
tctagtcaag tcacagaagt ctgcgctatg acatacatgg agggagatga actaaccttc 180
cttgacgacc ccacctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgtcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc tgggtttcgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 142

<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D5 編碼序列

<400> 142
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg catcccccgg aaaagccact gaagttagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 143
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D6 編碼序列

<400> 143
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg catcccccgg aaaagccact gaaattagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 144
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D20 編碼序列

<400> 144
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcccccca caaagccact gaaattagag tcacagtgct ccgccaggct 120

gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 145
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D21 編碼序列

<400> 145
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatt ccgccccca caacgccgac gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
tcttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg aagaagatga actcaccttc 180
ctcgacgacc ccacctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgtcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc tgggtttcgg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 146
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D23 編碼序列

<400> 146
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatt ccgccccca caacgccgcc gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 147
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D24 編碼序列

<400> 147
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 148
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D26 編碼序列

<400> 148
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgcgaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 149
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D27 編碼序列

<400> 149
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgcgaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300

ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 150
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D28 編碼序列

<400> 150
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggatcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 151
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D29 編碼序列

<400> 151
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccgat gaaattagag tcacagtcct ccgcaaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 152
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 ECD 突變體 D31 編碼序列

<400> 152
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg aggcccccca caacgccgat gaaatcagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacaagt caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 153
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-12-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 153
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cggaagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgcggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 154
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-14-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 154
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgcggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 155
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-17-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 155
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 156
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-20-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 156
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 157
<211> 1170

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-27-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 157
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 158
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-29-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 158
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420

ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 159
<211> 124
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 野生型人類 CTLA-4 ECD

<400> 159

Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
1				5				10					15		
Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val
		20					25					30			
Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys
	35					40					45				
Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser
50					55					60					
Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
65				70					75					80	
Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
			85					90					95		
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
		100					105					110			
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp				
	115					120									

<210> 160
<211> 223
<212> PRT

<213> 人類

<220>
<223> 野生型人類全長 CTLA-4

<400> 160

```
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1               5                  10                  15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
            20                  25                  30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
        35                  40                  45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65                  70                  75                  80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
                85                  90                  95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
            100                 105                 110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
        115                 120                 125
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
    130                 135                 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145                 150                 155                 160
Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
                165                 170                 175
Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
            180                 185                 190
Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
        195                 200                 205
Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
    210                 215                 220
```

<210> 161
<211> 389
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 WT 人類 CTLA4-IgG2 融合蛋白

<400> 161

```
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1               5                  10                  15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
            20                  25                  30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
        35                  40                  45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65                  70                  75                  80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
                85                  90                  95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
            100                 105                 110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
        115                 120                 125
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
    130                 135                 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145                 150                 155                 160
Asp Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
                165                 170                 175
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            180                 185                 190
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        195                 200                 205
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    210                 215                 220
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
225                 230                 235                 240
Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
                245                 250                 255
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        275                 280                 285
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    290                 295                 300
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
305                 310                 315                 320
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                325                 330                 335
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
```

340 345 350
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
355 360 365
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
370 375 380
Leu Ser Pro Gly Lys
385

<210> 162
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類成熟 CTLA4-IgG2 融合蛋白

<400> 162
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
115 120 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180 185 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195 200 205

```
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 163
<211> 1167
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CTLA4-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 163

```
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaagccac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcacaa 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
cttggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
```

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1167

<210> 164
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Orencia (R) (Bristol-Myers Squibb Co.)

<400> 164
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
115 120 125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
130 135 140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165 170 175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

225 230 235 240
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350
Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 165
<211> 394
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 LEA29Y-Ig 融合蛋白

<400> 165
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60
Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly
130 135 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser
165 170 175
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
180 185 190
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
195 200 205
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
210 215 220
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
225 230 235 240
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
245 250 255
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
260 265 270
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
275 280 285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
290 295 300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
325 330 335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
340 345 350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
355 360 365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
370 375 380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 166
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 成熟 LEA29Y-Ig 融合蛋白

<400> 166

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
        115                 120                 125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
    130                 135                 140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145                 150                 155                 160
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                165                 170                 175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
            180                 185                 190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
    210                 215                 220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225                 230                 235                 240
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                245                 250                 255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
            260                 265                 270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
        275                 280                 285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
    290                 295                 300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305                 310                 315                 320
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                325                 330                 335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
```

340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 167
<211> 1182
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LEA29Y-Ig 融合蛋白編碼序列

<400> 167
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc atcccagttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaatatac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcacaa 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcattgacc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatcaggagc ccaaatcttc tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa 540
ctcctgggtg gatcgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 600
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 660
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 720
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 780
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 840
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 900
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 960
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1020
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1080
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1140
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1182

<210> 168
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LEA29Y ECD

<400> 168

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
        115                 120
```

<210> 169
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LEA29Y ECD 編碼序列

<400> 169
atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtt 60
tgtgaatatg catcccccgg aaaatatact gaagttagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatatatga tgggcaacga actcaccttc 180
ctcgacgact caatttgcac aggtacctcc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtacccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

<210> 170
<211> 476
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 WT 人類 CD80-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 170

```
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 Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350
```

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
355 360 365
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
370 375 380
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385 390 395 400
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
405 410 415
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
420 425 430
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
450 455 460
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 171
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 成熟 WT 人類 CD80-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 171
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
Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 172
<211> 1428
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CD80-人類 IgG1 融合蛋白編碼序列

<400> 172
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa cgaagcaaga gcattttcct 720
gataacgggg tgaccccaaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 780
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 840
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 900
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 960
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1020
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1080
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1140
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1200
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1320
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1428

<210> 173
<211> 726
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CD80 信號肽及 WT 人類 CD80 ECD 之編碼序列

<400> 173
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240

atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa cgaagcaaga gcattttcct 720
gataac 726

<210> 174
<211> 208
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> WT 人類 CD80 ECD

<400> 174

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> 175
<211> 329
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 預測全長 WT 人類 CD86

<400> 175

```
Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
 1               5                  10                  15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
            20                  25                  30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
        35                  40                  45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
    50                  55                  60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65                  70                  75                  80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
                85                  90                  95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
            100                 105                 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
        115                 120                 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
    130                 135                 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145                 150                 155                 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
                165                 170                 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
            180                 185                 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
        195                 200                 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
    210                 215                 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225                 230                 235                 240
Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
                245                 250                 255
```

Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
260 265 270
Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
275 280 285
Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
290 295 300
Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
305 310 315 320
Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
325

<210> 176
<211> 987
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全長 WT 人類 CD86 編碼序列

<400> 176
atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840
aaatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtgttt ttaaaagttc gaagacatct 960
tcatgcgaca aaagtgatac atgtttt 987

<210> 177
<211> 477
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 預測 WT 人類 CD86-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 177

```
Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
 1               5                  10                  15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
            20                  25                  30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
        35                  40                  45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
    50                  55                  60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65                  70                  75                  80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
                85                  90                  95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
            100                 105                 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
        115                 120                 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
    130                 135                 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145                 150                 155                 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
                165                 170                 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
            180                 185                 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
        195                 200                 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
    210                 215                 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225                 230                 235                 240
Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320
```

```
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 178
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 成熟 WT 人類 CD86-人類 IgG1 融合蛋白

<400> 178

```
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1               5                  10                  15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
            20                  25                  30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
        35                  40                  45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
    50                  55                  60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65                  70                  75                  80
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
                85                  90                  95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
```

```
            100                 105                 110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
        115                 120                 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
    130                 135                 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145                 150                 155                 160
Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
                165                 170                 175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
            180                 185                 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro
    210                 215                 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        355                 360                 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
```

<210> 179
<211> 1431
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CD86-人類 IgG1 融合蛋白編碼序列

<400> 179
atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag gggtgacccc aaagagctgc gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 780
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 840
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 900
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 960
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1020
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1080
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1140
ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1200
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1260
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1320
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1380
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1431

<210> 180
<211> 220
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> WT 人類 CD86 ECD

<400> 180

```
Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1               5                  10                  15
Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
            20                  25                  30
Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
        35                  40                  45
Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
    50                  55                  60
Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65                  70                  75                  80
Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
                85                  90                  95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
            100                 105                 110
Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
        115                 120                 125
Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
    130                 135                 140
Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145                 150                 155                 160
Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
                165                 170                 175
Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
            180                 185                 190
Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205
Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro
    210                 215                 220
```

<210> 181
<211> 105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WT 人類 CTLA-4 信號肽編碼序列

<400> 181

```
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgt                 105
```

<210> 182
<211> 35
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> WT 人類 CTLA-4 信號肽

<400> 182
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1   5   10   15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
            20   25   30
Val Phe Cys
        35

<210> 183
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽 （具C-端離胺酸） 之編碼序列

<400> 183
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

<210> 184
<211> 228
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽 （具C-端離胺酸）

<400> 184
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> 185
<211> 231
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 人類 IgG1 Fc 多肽

<400> 185

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 1               5                  10                  15
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            20                  25                  30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        35                  40                  45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    50                  55                  60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65                  70                  75                  80
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                85                  90                  95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        115                 120                 125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
    130                 135                 140
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145                 150                 155                 160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                165                 170                 175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            180                 185                 190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        195                 200                 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    210                 215                 220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 186
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變 IgG1 Fc 多肽

<400> 186

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

```
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser 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> 187
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 187
ctattgctac ggccgctatg gccmtkcacg tcgctcaacc agccgtcgta ctcgcgtcc 59

<210> 188
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 188
gtgatggtga tggtgtgcgg ccgcatcaga 30

<210> 189
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 189
aagctgtcac cggtggatcg atcccgaacc ctgccctgat tctgatgagc gcaaatgttg 60
tgtcgagtgc ccaccgt 77

<210> 190
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 190
cagaattcat tatttacccg gagacaggga gaggctcttc tg 42

<210> 191
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 191
ggaataccgg ttttttgtaa agccatgcac gtcgctcaac cagccgtcgt actc 54

<210> 192
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 192
ggcactcaga tctacgtcat cgatcccgaa 30

<210> 193
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CTLA-4 ECD 編碼序列

<400> 193
atgcacgtgg cccagcctgc tgtggtactg gccagcagcc gaggcatcgc cagctttgtg 60
tgtgagtatg catctccagg caaagccact gaggtccggg tgacagtgct tcggcaggct 120
gacagccagg tgactgaagt ctgtgcggca acctacatga tggggaatga gttgaccttc 180
ctagatgatt ccatctgcac gggcacctcc agtggaaatc aagtgaacct cactatccaa 240
ggactgaggg ccatggacac gggactctac atctgcaagg tggagctcat gtacccaccg 300
ccatactacc tgggcatagg caacggaacc cagatttatg taattgatcc agaaccgtgc 360
ccagattctg ac 372

<210> 194
<211> 672
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全長人類 CTLA-4 編碼序列

<400> 194
atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcagctga acctggctac caggacctgg 60
ccctgcactc tcctgttttt tcttctcttc atccctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120
gcccagcctg ctgtggtact ggccagcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180
gcatctccag gcaaagccac tgaggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc tgacagccag 240
gtgactgaag tctgtgcggc aacctacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300
tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcactatcca aggactgagg 360
gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgtacccacc gccatactac 420
ctgggcatag gcaacggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480
gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggt tgtttttta tagctttctc 540

ctcacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa gccctcttac aacaggggtc 600
tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660
cccatcaatt ga 672

<210> 195
<211> 288
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 預測全長人類 CD80

<400> 195

```
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> 196
<211> 867
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全長人類 CD80 編碼序列

<400> 196

```
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
agaagggaaa gtgtacgccc tgtataa                                    867
```

<210> 197
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-54-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 197

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
```

```
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 198

<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-56-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 198

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
```

```
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 199
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-69-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 199

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
```

```
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 200
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-75-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 200

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
```

```
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 201
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-54-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 201
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180

gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccatctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 202
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-56-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 202
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 203
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-69-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 203
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 204
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-75-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 204
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60

ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 205
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-12-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 205
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys

```
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 206
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-14-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 206

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
```

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 207
<211> 351

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-17-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 207

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
```

```
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 208
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-20-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 208

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
```

```
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 209
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-27-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 209

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
```

```
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 210
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-29-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 210

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
```

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 211
<211> 351

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-54-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 211

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
```

```
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 212
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-56-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 212

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
```

```
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 213
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-69-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 213

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
```

```
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 214
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-75-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 214

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
```

```
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 215
<211> 111

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含全長 hCTLA-4 蛋白胺基酸殘基 1-37 之 WT hCTLA-4 信號肽序列的編碼序列

<400> 215
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc c 111

<210> 216
<211> 37
<212> PRT
<213> 人類

<220>
<223> 包含全長 hCTLA-4 蛋白胺基酸殘基 1-37 之 WT hCTLA-4 信號肽序列

<400> 216
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala
35

<210> 217
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽之編碼序列

<400> 217
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 480

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

<210> 218
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IgG2 Fc 多肽 （不具C-端離胺酸）

<400> 218
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
225

<210> 219
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-71-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 219

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
```

260 265 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275 280 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290 295 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305 310 315 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325 330 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340 345 350

<210> 220
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-71-IgG2 融合蛋白 （具C-端離胺酸）

<400> 220
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
115 120 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175

```
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 221
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-76-IgG2 融合蛋白 （不具C-端離胺酸）

<400> 221

```
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1               5                  10                  15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
            20                  25                  30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
        35                  40                  45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
    50                  55                  60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
```

```
                85                  90                  95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
            100                 105                 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
        115                 120                 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
    130                 135                 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
        195                 200                 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
    290                 295                 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

<210> 222
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-76-IgG2 融合蛋白 （具 C-端離胺酸）

<400> 222

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
20 25 30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
50 55 60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
115 120 125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180 185 190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195 200 205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
210 215 220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225 230 235 240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
245 250 255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260 265 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275 280 285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290 295 300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305 310 315 320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325 330 335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345 350

<210> 223
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-71-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 223
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 224
<211> 1170
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> D3-76-IgG2 融合蛋白編碼序列

<400> 224
atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180

gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccatctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtacccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcatcgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 600
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

<210> 225
<211> 485
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD86-小鼠 Ig 融合蛋白

<400> 225
Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
35 40 45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
50 55 60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65 70 75 80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
85 90 95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
100 105 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
115 120 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile

130 135 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145 150 155 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
165 170 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
180 185 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
195 200 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
210 215 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225 230 235 240
Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys
245 250 255
Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly
260 265 270
Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
275 280 285
Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
290 295 300
Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
305 310 315 320
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
325 330 335
Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
340 345 350
Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile
355 360 365
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val
370 375 380
Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser
385 390 395 400
Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp
405 410 415
Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr
420 425 430
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
435 440 445
Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val
450 455 460
His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser
465 470 475 480
Leu Gly Lys Ser Gly

<210> 226
<211> 484
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD80-小鼠 Ig 融合蛋白

<400> 226

```
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 Gly Val Thr Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro
                245                 250                 255
```

```
Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly
            260                 265                 270
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
        275                 280                 285
Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
    290                 295                 300
Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
305                 310                 315                 320
Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
                325                 330                 335
Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
            340                 345                 350
Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu
        355                 360                 365
Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
    370                 375                 380
Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu
385                 390                 395                 400
Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp
                405                 410                 415
Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val
            420                 425                 430
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln
        435                 440                 445
Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His
    450                 455                 460
Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu
465                 470                 475                 480
Gly Lys Ser Gly
```

<210> 227
<211> 1458
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD86-小鼠 Ig 融合蛋白編碼序列

<400> 227
atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180

gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag gggtgacccc cagagtgccc ataacacaga acccctgtcc tccactcaaa 780
gagtgtcccc catgcgcagc tccagacctc ttgggtggac catccgtctt catcttccct 840
ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tggtcacatg tgtggtggtg 900
gatgtgagcg aggatgaccc agacgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta 960
cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt 1020
gccctcccca tccagcacca ggactggatg agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac 1080
aacagagccc tcccatcccc catcgagaaa accatctcaa aacccagagg gccagtaaga 1140
gctccacagg tatatgtctt gcctccacca gcagaagaga tgactaagaa agagttcagt 1200
ctgacctgca tgatcacagg cttcttacct gccgaaattg ctgtggactg gaccagcaat 1260
gggcgtacag agcaaaacta caagaacacc gcaacagtcc tggactctga tggttcttac 1320
ttcatgtaca gcaagctcag agtacaaaag agcacttggg aaagaggaag tcttttcgcc 1380
tgctcagtgg tccacgaggg tctgcacaat caccttacga ctaagaccat ctcccggtct 1440
ctgggtaaat ccggataa 1458

<210> 228
<211> 1455
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 CD80-小鼠 Ig 融合蛋白編碼序列

<400> 228
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720

gataacgggg tgacccccag agtgcccata acacagaacc cctgtcctcc actcaaagag 780
tgtcccccat gcgcagctcc agacctcttg ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca 840
aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agccccatgg tcacatgtgt ggtggtggat 900
gtgagcgagg atgacccaga cgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 960
acagctcaga cacaaaccca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc 1020
ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 1080
agagccctcc catcccccat cgagaaaacc atctcaaaac ccagagggcc agtaagagct 1140
ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagca gaagagatga ctaagaaaga gttcagtctg 1200
acctgcatga tcacaggctt cttacctgcc gaaattgctg tggactggac cagcaatggg 1260
cgtacagagc aaaactacaa gaacaccgca acagtcctgg actctgatgg ttcttacttc 1320
atgtacagca agctcagagt acaaaagagc acttgggaaa gaggaagtct tttcgcctgc 1380
tcagtggtcc acgagggtct gcacaatcac cttacgacta agaccatctc ccggtctctg 1440
ggtaaatccg gataa 1455

200936607

98年5月20日 補正

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

C07K	16/28	2006.01
C07K	14/705	2006.01
A61K	39/395	2006.01
A61P	37/00	2006.01

※ 申請案號：97141645

※ 申請日：97.10.29　※IPC 分類：

一、發明名稱：（中文/英文）

免疫抑制性多肽及核酸

IMMUNOSUPPRESSIVE POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS

二、中文發明摘要：

本發明提供免疫抑制性多肽以及編碼此等多肽之核酸。在一態樣中，本發明提供突變CTLA-4多肽以及編碼突變CTLA-4多肽之核酸。其亦提供組合物以及使用此等多肽及核酸之方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides immunosuppressive polypeptides and nucleic acids encoding such polypeptides. In one aspect, the invention provides mutant CTLA-4 polypeptides and nucleic acids encoding mutant CTLA-4 polypeptides. Compositions and methods for utilizing such polypeptides and nucleic acids are also provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種分離或重組之CTLA-4多肽，其包含與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有最多15個胺基酸殘基差異之多肽序列，其中該分離或重組之CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

2. 根據請求項1之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:36之多肽序列具有至少90%之序列相同性。

3. 根據請求項2之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:36之多肽序列具有至少95%之序列相同性。

4. 根據請求項3之分離或重組多肽，其包含SEQ ID NO:36之多肽序列。

5. 根據請求項1之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:50之多肽序列具有至少90%之序列相同性。

6. 根據請求項5之分離或重組多肽，其與SEQ ID NO:50之多肽序列具有至少95%之序列相同性。

7. 根據請求項6之分離或重組多肽，其包含SEQ ID NO:50之多肽序列。

8. 根據前述請求項中任一項之多肽，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

9. 根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

10. 根據前述請求項中任一項之多肽，其包含一個胺基酸取代，該取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

11. 根據前述請求項中任一項之多肽，其包含兩個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

12.根據前述請求項中任一項之多肽，其包含三個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

13.根據前述請求項中任一項之多肽，其包含四個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

14.根據請求項10至13中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代。

15.根據請求項14之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代係S70F。

16.根據請求項10至15中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代。

17.根據請求項16之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代係L104E。

18.根據請求項10至17中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代。

19.根據請求項18之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N/D/A。

20.根據請求項19之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N。

21.根據請求項10至20中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代。

22.根據請求項21之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代係S64P。

23.根據請求項10至22中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代。

24.根據請求項23之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代係A50M。

25.根據請求項10至24中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代。

26.根據請求項25之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K/V。

27.根據請求項26之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K。

28.根據請求項10-17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代。

29.根據請求項28之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代係I65S。

30.根據請求項10至17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代。

31.根據請求項30之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代係N56D。

32.根據請求項10至17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代。

33.根據請求項32之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代係G55E。

34.根據請求項10至17中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代。

35.根據請求項30之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代係M85A。

36.根據請求項10-17中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代。

37.根據請求項36之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E/S。

38.根據請求項37之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E。

39.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD86或其胞外域之結合親和力，其係約等於或大於單體人類

CTLA-4胞外域對於CD86或CD86胞外域之結合親和力。

40.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD80或其胞外域之結合親和力，其係大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD80或CD80胞外域之結合親和力。

41.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制免疫反應之能力。

42.根據前述請求項中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

43.一種分離或重組之多肽多聚體，其包含至少兩個根據前述請求項中任一項之多肽。

44.一種分離或重組之融合蛋白，其包含（a）根據請求項1至42中任一項之多肽，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，且其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

45.一種分離或重組之二聚體融合蛋白，其包含兩個根據請求項44之單體融合蛋白。

46.一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列（編碼根據請求項1至42中任一項之之多肽）、根據請求項43之多聚體、根據請求項44之融合蛋白或是根據請求項45之二聚體融合蛋白。

47.一種載體，其包含根據請求項46之核酸。

48.一種分離或重組之宿主細胞，其包含：

（a）根據請求項1至42中任一項之多肽；

（b）根據請求項43之多聚體；

（c）根據請求項44之融合蛋白；

（d）根據請求項45之二聚體融合蛋白；

（e）根據請求項46之核酸；及/或

（f）根據請求項47之載體。

49.一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體以及一或多種之下列所述者：

（a） 根據請求項1-42中任一項之多肽；

（b） 根據請求項43之多聚體；

（c） 根據請求項44之融合蛋白；

（d） 根據請求項45之二聚體融合蛋白；

（e） 根據請求項46之核酸；

（f） 根據請求項47之載體；及/或

（g） 根據請求項48之宿主細胞。

50.一種抑制免疫反應之方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項1至42中任一項之多肽；

（b）根據請求項43之多聚體；

（c）根據請求項44之融合蛋白；

（d）根據請求項45之二聚體融合蛋白；

（e）根據請求項46之核酸；

（f）根據請求項47之載體；及/或

（g）根據請求項48之宿主細胞，

以抑制免疫反應，其中該免疫反應因而受到抑制。

51.根據請求項1至42中任一項之多肽、根據請求項43之多聚體、根據請求項44之融合蛋白、根據請求項45之二聚體融合蛋白、根據請求項46之核酸、根據請求項47之載體及/或根據請求項48之宿主細胞，其係用於抑制免疫反應。

52.一種根據請求項1至42中任一項之多肽、根據請求項43之多聚體、根據請求項44之融合蛋白、根據請求項45之二聚體融合蛋白、根據請求項46之核酸、根據請求項47之載體及/或根據請求項48之宿主細胞於製造用於抑制免疫反應之藥物的用途。

53.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域及/或具有壓抑或抑制免疫反應之能力。

54.根據請求項53之多肽，其中CD80係人類CD80且CD86

係人類CD86。

55.根據請求項53至54中任一項之多肽，其中該多肽具有壓抑或抑制免疫反應之能力。

56.根據請求項53至55中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化之能力。

57.根據請求項53至55中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞增殖之能力。

58.根據請求項53至57中任一項之多肽，其中該多肽具有大於CTLA-4之較大能力以壓抑或抑制免疫反應。

59.根據請求項53之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力，其係大於人類CTLA-4抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

60.根據請求項53之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力，其係大於人類CTLA-4胞外域抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

61.根據請求項53至57中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制免疫反應之能力，其係大於包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列的LEA29Y多肽抑制免疫反應之能力。

62.根據請求項53至61中任一項之多肽，其中該多肽包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少96%、97%、98%或99%之序列相同性。

63.根據請求項53至62中任一項之多肽，其中該多肽包含選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列。

64.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1-73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽可結合單體人類CD80或單體人類CD86或是其任一者之胞外域。

65.根據請求項64之多肽，其中該多肽具有對於單體人類CD86之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4對於單體人類CD86之結合親和力。

66.根據請求項64之多肽，其中該多肽具有對於單體人類CD80之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4對於單體人類CD80之結合親和力。

67.根據請求項65之多肽，其中該多肽具有對於單體人類CD80之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4對於單體人類CD80之結合親和力。

68.根據請求項64至67中任一項之多肽，其中該多肽具有大於單體人類CTLA-4的抑制免疫反應之較大能力、抑制T細胞活化之較大能力及/或抑制T細胞增殖之較大能力。

69.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽具有對於人類CD86胞外域或人類CD80胞外域之結合親和力，其係約等於或大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域或人類CD80胞外域之結合親和力，且其中該多肽視情況具有抑制免疫反應之能力。

70.根據請求項69之多肽，其中該多肽具有對於人類CD86胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD86胞外域之結合親和力。

71.根據請求項70之多肽，其中該多肽具有對於人類CD80胞外域之結合親和力，其係大於人類CTLA-4胞外域對於人類CD80胞外域之結合親和力。

72.根據請求項69至71中任一項之多肽，其中該多肽具有大於人類CTLA-4胞外域的抑制免疫反應之較大能力、抑制T細胞活化之較大能力及/或抑制T細胞增殖之較大能力。

73.根據請求項53之多肽，其中該突變多肽包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

74.一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其包含多肽序列，其

(a)與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過11個、不超過10個、不超過9個、不超過8個、不

超過7個或不超過6個胺基酸殘基之差異，以及

（b）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，

其中該突變CTLA-4多肽具有結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

75.根據請求項74之多肽，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

76.根據請求項74之多肽，其中該突變多肽包含長度為124胺基酸殘基之多肽序列。

77.根據請求項74之多肽，其包含兩個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70、85或104之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

78.根據請求項74之多肽，其包含三個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70、85或104之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

79.根據請求項74之多肽，其包含四個胺基酸取代，該等取代係位在選自由對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70、85或104之胺基酸位置所組成之群的胺基酸位置。

80.根據請求項74之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代。

81.根據請求項80之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置70之胺基酸取代係S70F。

82.根據請求項74至81中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代。

83.根據請求項82之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置104之胺基酸取代係L104E。

84.根據請求項74至83中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代。

85.根據請求項84之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N/D/A。

86.根據請求項85之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置30之胺基酸取代係T30N。

87.根據請求項74至86中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代。

88.根據請求項87之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置64之胺基酸取代係S64P。

89.根據請求項74至88中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代。

90.根據請求項89之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置50之胺基酸取代係A50M。

91.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代。

92.根據請求項91之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K/V。

93.根據請求項92之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置54之胺基酸取代係M54K。

94.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代。

95.根據請求項94之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置65之胺基酸取代係I65S。

96.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代。

97.根據請求項96之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置56之胺基酸取代係N56D。

98.根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代。

99.根據請求項98之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置55之胺基酸取代係G55E。

100. 根據請求項74至83中任一項之多肽，其包含位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代。

101. 根據請求項100之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置85之胺基酸取代係M85A。

102. 根據請求項74至83中任一項之多肽，其尚包含位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代。

103. 根據請求項102之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E/S。

104. 根據請求項103之多肽，其中該位在相對SEQ ID NO:159之位置24之胺基酸取代係A24E。

105. 根據請求項74至104中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD86或其胞外域之結合親和力，其係約等於或大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD86或CD86胞外域之結合親和力。

106. 根據請求項74至105中任一項之多肽，其中該多肽具有對於CD80或其胞外域之結合親和力，其係大於單體人類CTLA-4胞外域對於CD80或CD80胞外域之結合親和力。

107. 根據請求項74至106中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制免疫反應之能力。

108. 根據請求項74至107中任一項之多肽，其中該多肽具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之能力。

109. 一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，包含（i）與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之至少95%序列相同性，以及（ii）位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，

其中該多肽具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

110. 根據請求項109之多肽，其中該多肽包含下列一或多

者：

位在對應位置24之胺基酸位置的麩胺酸殘基；

位在對應位置30之胺基酸位置的天冬醯胺殘基；

位在對應位置32之胺基酸位置的異白胺酸殘基；

位在對應位置50之胺基酸位置的甲硫胺酸殘基；

位在對應位置54之胺基酸位置的離胺酸殘基；

位在對應位置55之胺基酸位置的麩胺酸殘基；

位在對應位置56之胺基酸位置的天冬胺酸殘基；

位在對應位置64之胺基酸位置的脯胺酸殘基；

位在對應位置65之胺基酸位置的絲胺酸殘基；以及

位在對應位置104之胺基酸位置的麩胺酸殘基。

111. 一種分離或重組之突變CTLA-4多肽，其可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可壓抑或抑制免疫反應，其中該多肽包含多肽序列，其：

（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域多肽之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及

（b）包含至少一個胺基酸取代，其中該至少一個胺基酸取代包含S70F，其中該胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:159而編號。

112. 根據請求項111之多肽，該多肽進一步包含至少一個胺基酸取代，選自由A24E、T30N、V32I、D41G、A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S、M85A、L104E及I106F所組成之群。

113. 一種分離或重組之多肽，其包含選自由SEQ ID NOS:1至79所組成之群的多肽序列，或是任何該等多肽序列之片段，其中該片段可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有壓抑或抑制免疫反應之能力。

114. 根據請求項113之多肽，其中該片段可結合人類CD80及人類CD86以及/或是其分別之胞外域。

115. 根據請求項53至114中任一項之多肽，其中該多肽係可溶性多肽。

116. 一種分離或重組之蛋白，其包含：

（a）根據請求項53至115中任一項之多肽，以及

（b）可協助該多肽分泌之肽。

117. 根據請求項116之蛋白，其中該肽係信號肽。

118. 根據請求項117之蛋白，其中該信號肽包含胺基酸序列，其與SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列具有至少95%之序列相同性。

119. 根據請求項118之蛋白，其中該信號肽包含SEQ ID NO:182或SEQ ID NO:216之胺基酸序列。

120. 一種分離或重組之蛋白，其包含根據請求項53至115中任一項之多肽，以及穿膜域。

121. 根據請求項120之蛋白，其中該穿膜域包含胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基162至182的胺基酸序列具有至少95%之相同性。

122. 根據請求項121之蛋白，其中該穿膜域包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基162至182。

123. 根據請求項120之蛋白，其尚包含胞質域。

124. 根據請求項122之蛋白，其中該胞質域包含胺基酸序列，其與包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基183至223的胺基酸序列具有至少95%之相同性。

125. 根據請求項124之蛋白，其中該穿膜域包含SEQ ID NO:160之胺基酸殘基183至223。

126. 根據請求項120至125中任一項之蛋白，其尚包含信號肽。

127. 根據請求項53至115中任一項之多肽或是根據請求項116至126中任一項之蛋白，其中該多肽之一或多個胺基酸殘基經糖基化。

128. 根據請求項53至115或127中任一項之多肽或是根據請求項116至127中任一項之蛋白，其中該多肽之一或多個胺基酸殘基經聚乙二醇化。

129. 一種分離或重組之多肽多聚體，其包含至少兩個根

據請求項53至115中任一項之多肽或是至少兩個根據請求項116至128中任一項之蛋白。

130. 根據請求項129之多聚體，其中所有之該至少兩個多肽皆係相同。

131. 根據請求項129之多聚體，其中該多聚體可壓抑或抑制免疫反應。

132. 根據請求項129之多聚體，其中該多聚體可抑制T細胞活化或T細胞增殖。

133. 根據請求項129之多聚體，其中該多聚體包含四個多肽。

134. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽。

135. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體係同型二聚體。

136. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體係異型二聚體。

137. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體可壓抑或抑制免疫反應。

138. 根據請求項134之二聚體，其中該二聚體可抑制T細胞活化或T細胞增殖。

139. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體具有對於人類CD86或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD86或其胞外域之結合性。

140. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體具有對於人類CD80或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD80或其胞外域之結合性。

141. 根據請求項139之二聚體，其中該二聚體具有對於人類CD80或其胞外域之結合性，其係分別約等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體對於人類CD80或其胞外域之結合性。

142. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體具有對於人類CD86或其胞外域之結合性，其係分別大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體對於人類CD86或其胞外域之結合性，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

143. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以小於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體自結合之人類CD86或其胞外域解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域解離。

144. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以小於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體自結合之人類CD86或其胞外域解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域解離，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

145. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體與人類CD86或其胞外域結合之速率而與人類CD86或其胞外域結合。

146. 根據請求項140之二聚體，其中該二聚體分別係以大於包含兩個LEA29Y多肽之二聚體與人類CD86或其胞外域結合之速率而與人類CD86或其胞外域結合，其中各個LEA29Y多肽包含示於SEQ ID NO:168之多肽序列。

147. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體相較於包含兩個人類CTLA-4胞外域或兩個LEA29Y多肽之二聚體具有抑制免疫反應之較大能力。

148. 根據請求項147之二聚體，其中該二聚體相較於包含兩個人類CTLA-4胞外域之二聚體具有抑制T細胞活化或T細胞增殖之較大能力。

149. 一種分離或重組之多肽二聚體，其包含兩個根據請

求項53至115中任一項之多肽，其中該二聚體具有小於包含兩個人類CTLA-4胞外域或兩個LEA29Y多肽之二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

150. 一種分離或合成之複合物，其包含：

（a）根據請求項1至115中任一項之多肽；以及

（b）連附於該多肽上之非多肽分子部分。

151. 根據請求項150之複合物，其中該複合物可結合CD80或CD86或是其任一者之胞外域。

152. 根據請求項151之複合物，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

153. 根據請求項150之複合物，其包含至少兩個非多肽分子部分。

154. 根據請求項153之複合物，其中該非多肽分子部分係糖分子。

155. 根據請求項154之複合物，其中該糖分子係連附於N-糖基化位點。

156. 根據請求項150之複合物，其中該非多肽分子部分係聚合物。

157. 根據請求項156之複合物，其中該聚合物係聚乙二醇分子部分。

158. 根據請求項157之複合物，其中該聚乙二醇分子部分係共價連附於該多肽之半胱胺酸殘基。

159. 根據請求項157之複合物，其包含共價連附於該多肽離胺酸殘基之聚乙二醇分子部分。

160. 根據請求項159之複合物，其包含共價連附於該多肽N-端胺基之聚乙二醇分子部分。

161. 一種分離或重組之融合蛋白，其包含（a）第多肽，其包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80

及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

162. 根據請求項161之融合蛋白，其中該融合蛋白可調節或調控T細胞之活化或增殖或是細胞因子之生成。

163. 根據請求項161或162之融合蛋白，其中該第二多肽係直接融合該第多肽。

164. 根據請求項161或162之融合蛋白，其中該第二多肽係融合連接子胺基酸序列，該序列係融合該第多肽。

165. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽係融合該第多肽之C-端。

166. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽包含Ig重鏈恆定區之一或多個蛋白域。

167. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽包含Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。

168. 根據請求項161之融合蛋白，其中該Ig Fc多肽係野生型人類Ig Fc多肽或是突變Ig Fc多肽。

169. 根據請求項161之融合蛋白，其中該第二多肽包含人類Ig多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。

170. 根據請求項169之融合蛋白，其中人類Ig多肽係人類IgG多肽，該人類IgG2多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

171.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a）多肽，其包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86以及/或是CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

172.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含：（1）多肽，其包

含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，且其中在該多肽序列中位於位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，以及（2）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可抑制免疫反應。

173.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，其中各個此種單體融合蛋白包含：（1）突變CTLA-4胞外域多肽，其包含多肽序列，其（i）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，及（ii）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置24、30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置；以及（2）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白二聚體可結合CD80及/或CD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。

174.一種分離或重組之突變CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體，其包含兩個突變CTLA-4-Ig融合蛋白單體，其中各個突變CTLA-4-Ig融合單體包含：（1）突變CTLA-4-ECD多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，及（b）在相對SEQ ID NO:159之胺基酸位置包含一或多個取代，選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群；以及（2）Ig Fc多肽，該Ig Fc多肽視情況係IgG2 Fc多肽，其中該突變CTLA-4-Ig二聚體可結合hCD80或hCD86，及/或可壓抑或抑制免疫反應。

175.一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個根據請求項161至171及314至316中任一項之單體融合蛋白，其中該兩個單體融合蛋白係經由下列者連接：（i）至少一個在兩個半胱胺酸殘基間所形成之雙硫鍵，其中各個半胱胺酸殘基係存在於該兩個第多肽之一者中，及/或（ii）至少一個在兩個半胱胺

酸殘基間所形成之雙硫鍵，其中各個半胱胺酸殘基係存在於該兩個第二多肽之一者中。

176. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別大於包含兩個單體融合蛋白（其各包含融合Ig多肽之野生型人類CTLA-4胞外域）之融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性。

177. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別大於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其中該CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體包含兩個單體CTLA-4-IgG2融合蛋白，各個CTLA-4-IgG2融合蛋白包含SEQ ID NO:162之多肽序列。

178. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別至少等於或大於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

179. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其係分別至少等於或大於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體對於人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之結合性，其中該LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體包含兩個單體LEA29Y-Ig融合蛋白，各包含SEQ ID NO:166之多肽序列。

180. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其係至少等於或大於包含兩個單體融合蛋白（其各包含融合Ig多肽之野生型人類CTLA-4胞外域）之融合

蛋白二聚體之能力。

181. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其係至少等於或大於包含兩個單體融合蛋白（其各具有SEQ ID NO:162之多肽序列）之CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力。

182. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其係至少等於或大於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體抑制免疫反應、抑制T細胞活化或抑制T細胞增殖之能力，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

183. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於包含兩個人類CTLA-4胞外域之融合蛋白二聚體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離。

184. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離。

185. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

186. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別小於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚

體自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig解離，其中該LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白，其各具有SEQ ID NO:166之序列。

187. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於包含兩個人類CTLA-4胞外域之融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig。

188. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域（或hCD86-Ig）之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig。

189. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig，其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

190. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體係以分別至少等於或大於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig之速率而結合人類CD86或其胞外域或hCD86-Ig。

191. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有小於包含兩個人類CTLA-4胞外域之融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

192. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有小於CTLA-4-IgG2融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

193. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，

其中該融合蛋白二聚體具有小於人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D），其中該人類CTLA-4-Ig融合蛋白二聚體包含兩個融合蛋白單體，各個此種單體包含SEQ ID NO:164之多肽序列。

194. 根據請求項171、172、173或174之融合蛋白二聚體，其中該融合蛋白二聚體具有小於LEA29Y-Ig融合蛋白二聚體之CD86平衡解離常數（K_D）的CD86平衡解離常數（K_D）。

195. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼根據請求項53至115中任一項之多肽、根據請求項161至171及314至316中任一項之單體融合蛋白或根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體，或是其互補聚核苷酸序列。

196. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

197. 根據請求項196之核酸，其中該核酸編碼多肽，其具有分別大於人類CTLA-4單體或其胞外域之對於人類CD86或其胞外域之較大結合親和性。

198. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼融合蛋白，該融合蛋白包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NOS:74至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

199. 一種分離或重組之核酸，其包含：(a) 聚核苷酸序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:80至158、201至204、223

及224所組成之群的聚核苷酸序列具有至少95%之序列相同性；(b) (a)之互補聚核苷酸序列；或是（c）(a)或(b)之任何聚核苷酸序列之片段，其中該核酸編碼多肽，該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力。

200.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，其（a）與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有不超過10、9、8、7或6個胺基酸殘基之差異，且（b）其中在該多肽序列中位於位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸殘基係與位於該選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

201.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:159之人類CTLA-4胞外域之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，及（b）包含至少一個胺基酸取代，該取代係位在對應於相對SEQ ID NO:159之位置30、32、50、54、55、56、64、65、70或85之胺基酸位置，其中該多肽具有結合CD80及/或CD86以及/或是其任一者之胞外域的能力，及/或具有壓抑或抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

202. 根據請求項201之核酸，其中該核酸包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，選自由A50M、M54K、G55E、N56D、S64P、I65S及S70F所組成之群，且視情況進一步包含至少一個相對SEQ ID NO:159之胺基酸取代，選自由L104E/D、T30N/D/A及V32I所組成之群。

203. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼多肽，該多肽包含多肽序列，具有（i）與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之至少95%相同性，以及（ii）

位在對應於該選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列之位置70的胺基酸位置之苯丙胺酸殘基，其中該多肽可結合hCD80/或hCD86或是其ECD，及/或可抑制免疫反應，其中該胺基酸取代視情況包含S70F，或是其互補聚核苷酸序列。

204. 一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼重組多肽二聚體，其包含兩個多肽，其中各個此種多肽包含多肽序列，與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的序列具有至少95%之相同性，其中該二聚體可結合hCD80及/或hCD86，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

205.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，其編碼融合蛋白，該融合蛋白包含（a）多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b）Ig多肽，其中該融合蛋白可結合CD80及/或CD86，及/或具有抑制免疫反應的能力，或是其互補聚核苷酸序列。

206. 根據請求項205之核酸，其中該核酸編碼融合蛋白二聚體。

207. 根據請求項196之核酸，其中該核酸編碼多肽，其具有大於人類CTLA-4單體或其胞外域之較大能力以抑制免疫反應。

208. 根據請求項207之核酸，其中該核酸編碼多肽，其具有大於人類CTLA-4單體或其胞外域之較大能力以抑制T細胞活化或T細胞增殖。

209. 根據請求項196之核酸，其中該核酸編碼多肽，其係以小於人類CTLA-4單體或其胞外域自結合之人類CD86或其胞外域解離之速率而自結合之人類CD86或其胞外域解離。

210. 一種分離或重組之核酸，其包含：

（a）聚核苷酸序列，與RNA聚核苷酸序列具有至少95%之序列相同性，其中該RNA聚核苷酸序列包含DNA序列，選自由SEQ ID NOS:80至158、201至204、223及224所組成之群，其中該DNA

序列中所有之胸腺嘧啶核苷酸殘基經尿嘧啶核苷酸殘基置換；

（b）(a)之互補聚核苷酸序列；或是

（c）(a)或(b)之任何聚核苷酸序列之片段，

其中該核酸編碼多肽，其（i）可結合CD80及/或CD86及/或其任一或兩者之胞外域，以及/或是（ii） 具有抑制免疫反應之能力，該免疫反應視情況包含T細胞活化及/或T細胞增殖。

211. 根據請求項195至210中任一項之核酸，其尚包含編碼信號肽之核苷酸序列。

212.一種分離或重組之核酸，其包含聚核苷酸序列，編碼多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b）包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應，或是其互補聚核苷酸序列。

213.一種載體，其包含根據請求項143至160中任一項之核酸、編碼根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽的核酸、編碼根據請求項129至133中任一項之多肽多聚體的核酸、編碼根據請求項134至149中任一項之多肽二聚體的核酸、編碼根據請求項150至160中任一項之複合物的核酸、編碼根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白的核酸或編碼根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體的核酸。

214. 根據請求項213之載體，其中該載體係DNA載體。

215. 根據請求項213之載體，其中該載體係RNA載體。

216. 根據請求項213之載體，其中該核酸係以可操作之方

式連結啟動子。

217. 根據請求項213之載體，其中該載體係表現載體。

218. 根據請求項217之載體，其中該表現載體包含示於圖1C之質體表現載體。

219. 根據請求項213之載體，其中該載體係病毒載體、酵母菌載體、植物載體、細菌載體或昆蟲載體。

220. 根據請求項219之載體，其中該病毒載體係腺病毒載體。

221. 根據請求項213之載體，其中該載體係質體載體。

222. 根據請求項213至221中任一項之載體，其中該載體尚包含可選擇性標記。

223. 一種表現載體，其包含：(i) 第一聚核苷酸序列，其編碼第多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，其中該第多肽可結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，及/或可抑制免疫反應，以及（ii）第二聚核苷酸序列，其編碼第二多肽，該多肽包含免疫球蛋白（Ig）多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

224. 一種分離或重組之宿主細胞，其包含：

（a） 根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b） 根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c） 根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d） 根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e） 根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；及/或

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體。

225. 一種分離或重組之宿主細胞，其經根據請求項143至160中任一項之核酸轉染或轉形。

226. 一種分離或重組之宿主細胞，其經編碼融合蛋白之核酸轉染，該核酸包含：

（i）第一核苷酸序列，編碼第多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，其中該第多肽具有結合人類CD86及/或人類CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或具有抑制免疫反應的能力；以及

（ii）第二核苷酸序列，編碼第二多肽，其包含免疫球蛋白（Ig）多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽，

其中該宿主細胞可表現該融合蛋白。

227. 一種分離或重組之分離宿主細胞，其包含根據請求項213至223中任一項之載體。

228. 一種分離之宿主細胞，其經根據請求項213至223中任一項之載體轉染或轉形。

229. 根據請求項224至228中任一項之宿主細胞，其中該宿主細胞係真核細胞。

230. 根據請求項229之宿主細胞，其中該宿主細胞係中國倉鼠卵巢（CHO）細胞或COS細胞。

231. 一種無限增殖化細胞系，其包含：

（a） 根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b） 根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c） 根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d） 根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e） 根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i） 根據請求項224至230中任一項之細胞。

232. 一種組合物，其包含賦形劑或載體，以及下列之一或多者：

（a） 根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b） 根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c） 根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d） 根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e） 根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體；

（i） 根據請求項224至230中任一項之細胞；及/或

（j） 根據請求項231之細胞系。

233. 一種醫藥組合物，其包含醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，以及下列之一或多者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；及/或

（j）根據請求項231之細胞系。

234. 一種抑制免疫反應之方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

以抑制免疫反應，其中該免疫反應因而受到抑制。

235. 根據請求項234之方法，其中該受到抑制之免疫反應係T細胞反應。

236. 根據請求項234之方法，其中該方法包含使B7-陽性細胞接觸該多肽，其中該多肽可結合表現於B7-陽性細胞上之B7-1，以及/或是結合表現於B7-陽性細胞上之B7-2。

237. 一種調控表現CD28及/或CTLA-4之T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚

體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

以調控B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用，其中B7-陽性細胞與CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞之作用因此受到調控。

238. 一種抑制CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含使B7-陽性細胞接觸有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

其中CD28-陽性T細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用因此受到抑制。

239. 根據請求項238之方法，其中係抑制T細胞之活化或增殖。

240. 根據請求項238之方法，其中該B7-陽性細胞係抗原呈遞細胞。

241. 一種抑制對象體內CD28-陽性T細胞與B7-陽性細胞之作用的方法，該方法包含對一對象投予有效量之下列至少一者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

其中該對象體內之內源性CD28-陽性T細胞與內源性B7-陽性細胞之作用受到抑制。

242. 根據請求項241之方法，其中係抑制內源性CD28-陽性T細胞與表現B7-2（CD86）或B7-1（CD80）之內源性B7-陽性細胞之作用。

243. 根據請求項241之方法，其中係抑制表現B7-2（CD86）及/或B7-1（CD80）之B7-陽性細胞以及B7-2（CD86）及/或B7-1（CD80）與CD28-陽性T細胞之作用。

244. 根據請求項243之方法，其中係抑制B7-2（CD86）及B7-1（CD80）與CD28-陽性T細胞之作用。

245. 一種在對象體內抑制免疫反應之方法，其包含對需要該方法之對象投予治療有效量之下列一或多者：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚

體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而在該對象體內抑制免疫反應。

246. 根據請求項245之方法，其中可溶性融合蛋白二聚體係以包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至約100毫克每公斤（mg/kg）該對象體重之治療有效量而對該對象進行投與。

247. 根據請求項246之方法，其中該可溶性融合蛋白二聚體之治療有效量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25或50 mg/kg該對象體重。

248. 根據請求項245之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在醫藥可接受之賦形劑或載體中對該對象進行投與。

249. 根據請求項245之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係經腸外、皮下或靜脈內而進行投與。

250. 根據請求項245之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係每個月一、二、三或四次而經皮下進行投與。

251. 根據請求項245至250中任一項之方法，其中可溶性融合蛋白二聚體係在醫藥可接受之賦形劑或載體中，以自約0.01 mg/ml至約200 mg/ml、約0.1 mg/ml至約200 mg/ml、約1至約200 mg/ml、約1至約100 mg/ml、約5至約75 mg/ml、約10至約50 mg/ml、約25至約50 mg/ml或約50 mg/ml至約100 mg/ml之濃度對該對象進行投與。

252. 根據請求項245之方法，其中該多肽係可溶性多肽，

該融合蛋白係可溶性融合蛋白，該二聚體係可溶性二聚體，該多聚體係可溶性多聚體，且該融合蛋白二聚體係可溶性融合蛋白二聚體。

253. 一種在對象體內抑制免疫反應之方法，其包含對需要該方法之對象投予治療有效量之第一免疫抑制劑或化合物，該第一免疫抑制劑包含：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而在該對象體內抑制免疫反應。

254. 根據請求項253之方法，其進一步包含投與有效量之至少一種其他之免疫抑制劑或療劑。

255. 根據請求項254之方法，其中該至少一種其他之免疫抑制劑或療劑係選自由疾病修飾性抗風溼藥物（DMARD）、類固醇化合物、非類固醇化合物、水楊酸鈉或鎂、伊布洛芬（ibuprofen）、乙醯水楊酸、乙醯胺苯酚、抗體、可阻斷抗炎細胞因子生成之生物劑、依法利珠（efalizumab）、抗炎試劑或化合物及非類固醇抗炎藥物（NSAID）所組成之群。

256. 根據請求項254或255之方法，其中該至少一種其他之免疫抑制劑或療劑係在醫藥可接受之賦形劑或載體中對該對象進行投與。

257. 根據請求項253至256中任一項之方法，其中該多

肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係至少每天一次、至少每週一次、至少每雙週一次或至少每月一次進行投與。

258. 根據請求項253至257中任一項之方法，其中該至少一種其他之免疫抑制劑或療劑係（i）與該第一免疫抑制劑或化合物之投與同時；(ii)在該第一免疫抑制劑或化合物之投與後；或（iii）在該第一免疫抑制劑或化合物之投與前而進行投與。

259. 一種治療具有由內源性T細胞與表現CD80及/或CD86之內源性細胞之作用所調控之免疫系統疾病或病症之對象的方法，該方法包含對需要此種治療之對象投予治療有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

其中在該內源性T細胞與表現該CD80及/或該CD86之內源性細胞間之該（等）作用受到抑制，因而治療該對象體內之免疫系統疾病或病症。

260. 根據請求項259之方法，其中CD80係人類CD80且CD86係人類CD86。

261. 根據請求項259之方法，其中係抑制表現CD28之內源性T細胞與表現CD86之內源性細胞及/或表現CD80之內源性細胞間的作用。

262. 根據請求項261之方法，其中CD80係人類CD80，CD86係人類CD86，且CD28係人類CD28。

263. 根據請求項259至262中任一項之方法，其中該免疫系統疾病或病症係自體免疫疾病或病症。

264. 根據請求項263之方法，其中該免疫系統疾病或病症係選自由關節炎、類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、全身性紅斑狼瘡（SLE）、牛皮癬、乾癬性關節炎、糖尿病、幼年型糖尿病、第一型糖尿病、多發性硬化、克隆氏病（Crohn's disease）、全身性硬皮症、潰瘍性結腸炎、炎症性腸病（IBD）、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis）、愛迪生氏症（Addison's Disease）、葛瑞夫茲氏病（Grave's disease）、肌風濕病、風濕性疾病、僵直性脊椎炎、重症肌無力及ANCA-相關性脈管炎所組成之群。

265. 根據請求項259至264中任一項之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係係在醫藥可接受之賦形劑或載體中對該對象進行投與。

266. 根據請求項259中任一項之方法，其中可溶性融合蛋白二聚體係以包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約100 mg/kg該對象體重之治療有效量而進行投與。

267. 根據請求項266之方法，其中該可溶性融合蛋白二聚體之治療有效量包含至少約0.001、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75或100 mg/kg該對象體重。

268. 根據請求項266之方法，其中該可溶性融合蛋白二聚體之治療有效量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至至少約0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75或100 mg/kg該對象體重。

269. 根據請求項259至268中任一項之方法，其中該多

肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係至少每天一次、至少每週一次、至少每雙週一次或至少每月一次進行投與。

270.一種製備多肽之方法，其包含在培養基中培養 根 據請求項224至230中任一項之宿主細胞，以及回收由該細胞所表現之該多肽。

271.一種製備多肽之方法，其包含：

（a）在一種群之細胞中引入根據請求項195至212中任一項之核酸，其中該核酸以可操作之方式連結可有效生產由該核酸所編碼之多肽的調控序列；

（b）在培養基中培養該等細胞以生產該多肽；以及

（c）自該等細胞或培養基中分離該多肽。

272.一種經培養之細胞，其中已引入根據請求項213至223中任一項之載體。

273.一種經培養之細胞，其中已引入根據請求項161至171中任一項之表現載體。

274.一種製備融合蛋白之方法，該方法包含：

（1）在培養基中培養經一核酸轉形之宿主細胞，其中該核酸包含:(i)第一核苷酸序列,編碼第多肽,其與選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，該多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是CD86或CD80中任一者之胞外域，以及（ii）第二核苷酸序列，其編碼Ig多肽，包含鉸鏈區、CH2域及CH3域，該Ig多肽視情況係人類IgG2 Fc，因而表現該核酸並產生融合蛋白；以及

（2）回收該融合蛋白。

275. 根據請求項274之方法，其中該核酸尚包含第三核苷酸序列，編碼分泌或信號肽，以可操作之方式連結該融合蛋白，且該融合蛋白係以包含相同第一及第二融合蛋白之雙硫鍵結融合蛋白二聚體形式而自該宿主細胞分泌，且其自該培養基中回收該雙硫鍵結融合蛋白二聚體。

276. 根據請求項275之方法，其中該雙硫鍵結融合蛋白二聚體係經由該第一融合蛋白之半胱胺酸殘基與該第二融合蛋白之半胱胺酸殘基間的共價雙硫鍵而形成。

277. 根據請求項274之方法，其中該融合蛋白係自該培養基、宿主細胞或宿主細胞周質而回收。

278.一種分離或重組之核酸，其包含核苷酸序列，其編碼(i)第多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一個選自由SEQ ID NOS:1至73所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該第多肽可結合CD86及/或CD80以及/或是其任一或兩者之胞外域，以及（ii）第二多肽，其包含IgG多肽之鉸鏈區、CH2域及CH3域。

279. 根據請求項278之核酸分子，其中該第二多肽包含SEQ ID NO:184之多肽序列。

280.一種表現載體，其包含根據請求項278或279之核酸。

281. 根據請求項280之表現載體，其尚包含第三核苷酸序列，可協助該第多肽及該第二多肽之表現。

282. 根據請求項280之表現載體，其尚包含第四核苷酸序列，可協助該第二多肽之表現，其中該第三及第四核苷酸序列係相同或不同。

283.一種宿主細胞，其包含根據請求項280、281或282之表現載體。

284.一種製備融合蛋白二聚體之方法，該方法包含培養根據請求項283之宿主細胞。

285. 根據請求項284之方法，其中該融合蛋白二聚體係自該宿主細胞培養基中回收。

286. 根據請求項285之方法，其中該二聚體係自該宿主細胞回收。

287. 根據請求項285之方法，其中該二聚體係自該宿主細胞周質回收。

288. 一種抑制接受者對象對於來自捐贈者之組織、細

胞、移植物或器官移植之排斥的方法，該方法包含對於需要該方法之接受者對象投予治療有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g）根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h）根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i）根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而抑制接受者對象對於該組織、細胞、移植物或器官移植之排斥。

289. 根據請求項288之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在組織、細胞、移植物或器官移植之前、同時或之後而對該接受者對象投與。

290. 根據請求項288之方法，其中該捐贈者及該接受者對象係相同生物種。

291. 根據請求項288之方法，其中該捐贈者及該接受者對象係不同生物種。

292. 根據請求項290之方法，其中該捐贈者及該接受者對象係係人類。

293. 根據請求項288之方法，其中該有效量包含自約0.001 mg/kg該對象體重至約200 mg/kg該對象體重。

294. 根據請求項293之方法，其中該有效量包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、

4、5、10、15、25、50、75、100、125、150或175毫克每公斤（mg/kg）該對象體重。

295. 根據請求項294之方法，其中該有效量包含自約0.001毫克每公斤（mg/kg）該對象體重至至少約0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.25、0.5、1、2、3、4或5毫克每公斤（mg/kg）該對象體重。

296. 根據請求項288之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在組織、細胞、移植物或器官移植之第二天且在移植後至少每週一次或至少每月一次，隨需要，直到12、24或36個月或以上而進行投與。

297. 根據請求項288之方法，其中該器官移植係腎臟移植、肝臟移植、肺移植或心臟移植。

298. 一種在對象體內治療組織、細胞、移植物或器官移植排斥之方法，該方法包含對於需要此種治療之對象投予治療有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；

（f） 根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體；

（g） 根據請求項195至212中任一項之核酸；

（h） 根據請求項213至223中任一項之載體；及/或

（i） 根據請求項224至230中任一項之細胞；

因而減少或減輕該對象之組織、細胞、移植物或器官移植排斥。

299. 根據請求項298之方法，其中該多肽、融合蛋白、二聚體、多聚體、融合蛋白二聚體、核酸、載體及/或細胞係在組織、細胞、移植物或器官移植之前、同時或之後而對該對象投

與。

300. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於在哺乳動物體內抑制或壓抑免疫反應之藥物的用途。

301. 根據請求項300之用途，其中該免疫反應係T細胞反應。

302. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於治療免疫系統疾病或病症之藥物的用途。

303. 根據請求項302之用途，其中該免疫系統疾病或病症係由哺乳動物體內之T細胞與CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞作用中介。

304. 根據請求項303之用途，其中該免疫系統疾病或病症係自體免疫疾病或自體免疫病症。

305. 根據請求項302之用途，其中該免疫系統疾病或病症係選自由關節炎、類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、全身性紅斑狼瘡（SLE）、牛皮癬、乾癬性關節炎、糖尿病、幼年型糖尿病、第一型糖尿病、多發性硬化、克隆氏病（Crohn's disease）、全身性硬皮症、潰瘍性結腸炎、炎症性腸病（IBD）、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis）、愛迪

生氏症（Addison's Disease）、葛瑞夫茲氏病（Grave's disease）、肌風濕病、風濕性疾病、僵直性脊椎炎、重症肌無力及ANCA-相關性脈管炎所組成之群。

306. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於在哺乳動物體內治療組織或器官移植排斥之藥物的用途。

307. 一種使用根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽、根據請求項129至133中任一項之多聚體、根據請求項134至149中任一項之二聚體、根據請求項150至160中任一項之複合物、根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白、根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體、根據請求項195至212中任一項之核酸、根據請求項213至223中任一項之載體或根據請求項224至230中任一項之細胞於製造用於抑制CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞與CD28-陽性細胞及/或CTLA-4-陽性T細胞作用之藥物的用途。

308. 根據請求項172之多肽，其中位於胺基酸位置24、30、32、41、50、54、55、56、64、65、70、85、104及106之胺基酸殘基係與位於該所選多肽序列對應位置之胺基酸殘基相同。

309. 一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，各個此種單體融合蛋白包含多肽序列，與至少一種選自由SEQ ID NOS:74至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其胞外域，及/或可抑制免疫反應。

310.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其（a）與示於SEQ ID NO:31之多肽序列具有不超過6個胺基酸殘基之差異，以及（b）包含下列至少一者：位在對應於SEQ ID NO:31位置50之位置的甲硫胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置54之位置的離胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置55之位置的麩胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置64之位置的脯胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置65之位置的絲胺酸殘基、位在對應於SEQ ID NO:31位置70之位置的苯丙胺酸殘基，其中該等胺基酸殘基位置係根據SEQ ID NO:31而編號，且該多肽可結合CD80及/或CD86以及/或是其任一或兩者之ECD，及/或可抑制免疫反應。

311.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其包含（i）與選自由SEQ ID NOS:36至46及55所組成之群的多肽序列之至少95%序列相同性，以及（ii）位在該所選多肽序列胺基酸位置55之麩胺酸殘基，其中該多肽（i）可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或（ii）可抑制免疫反應。

312.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:56所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽（i）可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，及/或（ii）可抑制免疫反應。

313.一種分離或重組之多肽，其包含多肽序列，其與選自由SEQ ID NOS:74至79、197至200、205至214及219至222所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，其中該多肽（i）可結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域，（ii）可結合CD80-Ig融合蛋白及/或CD86-Ig融合蛋白，及/或（iii）可抑制免疫反應。

314. 根據請求項161之分離或重組之融合蛋白，該融合蛋白包含（a）第多肽，該多肽包含多肽序列，其與至少一種選自由SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:50

及SEQ ID NO:56所組成之群的多肽序列具有至少95%之序列相同性，及（b）第二多肽，其中該第二多肽係Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有結合CD80及/或CD86或是其任一或兩者之胞外域的能力，及/或調節或調控免疫反應的能力。

315. 根據請求項314之融合蛋白，其中該Ig Fc多肽係野生型人類Ig Fc多肽或是突變Ig Fc多肽。

316. 根據請求項314之融合蛋白，其中該Ig Fc多肽係人類IgG Fc多肽，該人類IgG2 Fc多肽視情況係人類IgG2 Fc多肽。

317. 一種分離或重組之融合蛋白二聚體，其包含兩個單體融合蛋白，經由至少一個雙硫鍵而連結，該雙硫鍵係在存在於各個單體突變融合蛋白中之兩個半胱胺酸殘基間形成，其中各個單體融合蛋白包含（a）多肽，其包含多肽序列，與至少一個選自由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199及SEQ ID NO:200所組成之群的多肽序列具有至少95%之相同性，以及（b）Ig Fc多肽，其中該融合蛋白具有（i）結合CD80及/或CD86以及/或是CD80及/或CD86之胞外域的能力，（ii）結合CD80-Ig及/或CD86-Ig的能力，及/或（iii）具有抑制或壓抑免疫反應的能力。

318. 根據請求項263之方法，其中該免疫系統疾病或病症係選自由愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、貝西氏症候群（Behcet's syndrome）、伯格氏症（Berger's Disease）、大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經

炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿病、

第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應所組成的群。

319. 根據請求項232或233之組合物，其包含有效量之：

（a）根據請求項53至128及312至313中任一項之多肽；

（b）根據請求項129至133中任一項之多聚體；

（c）根據請求項134至149中任一項之二聚體；

（d）根據請求項150至160中任一項之複合物；

（e）根據請求項161至171及314至316中任一項之融合蛋白；或

（f）根據請求項172至194及317中任一項之融合蛋白二聚體。

320. 根據請求項232、233或319之組合物，其包含可使該組合物之pH維持在介於約pH 3至約pH 10之緩衝劑、水、視情況之非離子性清潔劑、視情況之鹽及視情況之糖醇、單醣、雙醣或多醣。

321. 根據請求項319至320中任一項之組合物，其中該組合物係在生理pH下。

322. 根據請求項319至321中任一項之組合物，其中該組合物具有自約4至約7.5之pH值。

323. 根據請求項319至322中任一項之組合物，其中該組合物具有自約5.0至約7.5之pH值。

324. 根據請求項319至323中任一項之組合物，其中該組合物具有約6.4之pH值。

325. 根據請求項319至323中任一項之組合物，其中該組合物具有約pH 7.4或7.5之pH值。

326. 根據請求項319至325中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以自約1 mM至約100 mM或是1 mM至約50 mM之濃度存在。

327. 根據請求項319至326中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以約5 mM至約35 mM之濃度存在。

328. 根據請求項319至327中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以約10 mM至約25 mM之濃度存在。

329. 根據請求項319至328中任一項之組合物，其中該緩衝劑係以約20 mM之濃度存在。

330. 根據請求項319至329中任一項之組合物，其中該緩衝劑係選自HEPES緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、琥珀酸緩衝劑、醋酸緩衝劑、檸檬酸緩衝劑、順丁烯二酸緩衝劑、磷酸緩衝劑及Tris緩衝劑。

331. 根據請求項319至330中任一項之組合物，其中該緩衝劑係選自HEPES緩衝劑、檸檬酸鈉緩衝劑及琥珀酸鈉緩衝劑。

332. 根據請求項319至331中任一項之組合物，其中該pH係約6.0至約6.7，且該緩衝劑係琥珀酸鈉或檸檬酸鈉。

333. 根據請求項319至332中任一項之組合物，其中該pH係約7.0至約7.7，且該緩衝劑係HEPES。

334. 根據請求項319至333中任一項之組合物，其中該組合物包含糖醇或醣類，其中該醣類係單醣、雙醣或多醣。

335. 根據請求項319至334中任一項之組合物，其中雙醣係蔗糖或海藻糖。

336. 根據請求項319至335中任一項之組合物，其中該組合物包含以約1 mM至約50 mM濃度存在之鹽。

337. 根據請求項319至336中任一項之組合物，其中該組合物包含以約20 mM濃度存在之鹽。

338. 根據請求項319至337中任一項之組合物，其中該組合物包含非離子性清潔劑。

339. 根據請求項319至338中任一項之組合物，其中該組合物包含選自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群的非離子性清潔劑。

340. 根據請求項319至339中任一項之組合物，其中該多

肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約1 mg/ml（w/v）至約200 mg/ml（w/v）之濃度存在。

341. 根據請求項319至340中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約25 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）之濃度存在。

342. 根據請求項319至342中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體係以介於約50 mg/ml至約300 mg/ml之濃度存在，視情形約在介於約50 mg/ml（w/v）至約100 mg/ml（w/v）之範圍。

343. 根據請求項319至342中任一項之組合物，其中該組合物中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約0.1 mg/kg至約15 mg/kg，且該組合物係對哺乳動物進行投與。

344. 根據請求項319至343中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約0.5 mg/kg至約10 mg/kg，且該組合物係經由腸外進行投與。

345. 根據請求項319至344中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約0.5 mg/kg至約5 mg/kg（且視情形為約0.5 mg/kg），且該組合物係經由皮下進行投與。

346. 根據請求項319至345中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體之有效量係自約5 mg/kg至約15 mg/kg（且視情形為約10 mg/kg），且該組合物係經由靜脈內進行投與。

347. 根據請求項319至346中任一項之組合物，其中該多肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。

348. 根據請求項319至346中任一項之組合物，其中該多

肽、多聚體、二聚體、複合物、融合蛋白或融合蛋白二聚體包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性。

349. 根據請求項319至348中任一項之組合物，其中該組合物係無菌。

350. 根據請求項319至349中任一項之組合物，其中該組合物係與血液等滲透壓。

351. 根據請求項319至350中任一項之組合物，其中該組合物係液體組合物。

352. 根據請求項319至351中任一項之組合物，其中該組合物係為液體或乾燥形式，其中該乾燥形式係選自由凍乾形式、風乾形式及噴霧乾燥形式所組成之群。

353. 根據請求項319至352中任一項之組合物，其中該組合物係為凍乾形式。

354. 一種醫藥組合物，其包含：(a) 多肽，其包含選自由所組成之群SEQ ID NOS:36及50所組成之群的多肽序列，其濃度係介於約1至約200 mg/ml (w/v) 範圍；(b) 緩衝劑，其具有介於約pH 5.0及約pH 8.0間之緩衝能力，濃度為約5 mM至約50 mM；(c) 醫藥可接受之稀釋劑，以使該組合物成為指定之體積；(d) 糖，其濃度係以重量計約0.5%至約10%；(e) 鹽，其濃度約1 mM至約200 mM；(f) 該pH係在介於約pH 5.0至約pH 8.0之範圍；及 (g) 視情形之清潔劑。

355. 根據請求項354之組合物，其中 (a) 該多肽包含SEQ ID NO:36之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；(b) 該緩衝劑係HEPES緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；(c) 該醫藥可接受之稀釋劑係水；(d) 該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；(e) 該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM：(f) 該pH係約7.4；及 (g) 其視情況存在清潔劑，其中該清潔劑係選自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml。

356. 根據請求項354之組合物，其中（a）該多肽包含SEQ ID NO:50之多肽序列，以介於約50 mg/ml至約100 mg/ml範圍之濃度存在；（b）該緩衝劑係檸檬酸鈉緩衝劑，以約20 mM之濃度存在；（c）該醫藥可接受之稀釋劑係水；（d）該糖係蔗糖或海藻糖，濃度為以重量計2%；（e）該鹽係氯化鈉，濃度為約100 mM；（f）該pH係約6.5；及（g）其視情況自由Tween®-80、Tween®-60、Tween®-20或pluronic F-68所組成之群選擇清潔劑，其濃度為小於或等於約0.1 mg/ml。

357. 一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，其包含一胺基酸序列，與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）HEPES緩衝劑。

358. 一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，該多肽包含胺基酸序列，其與SEQ ID NO:36之胺基酸序列具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約7至約8之pH值。

359. 根據請求項358之醫藥組合物，其中該組合物具有約7.4之pH值。

360. 根據請求項358或359之醫藥組合物，其包含HEPES緩衝劑。

361. 一種醫藥組合物，其包含（a）多肽，其包含胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）檸檬酸鈉緩衝劑。

362.一種醫藥組合物，其包含：（a）多肽，其包含一胺基酸序列，與選自SEQ ID NO:50之胺基酸序列具有至少97%、至少98%或至少99%之序列相同性；及（b）醫藥可接受之賦形劑或醫藥可接受之載體，其中該組合物具有自約6至約7之pH值。

363. 根據請求項362之醫藥組合物，其中該組合物具有約6.5之pH值。

364. 根據請求項362或363之醫藥組合物，其包含檸檬酸鈉緩衝劑。

365. 根據請求項302之方法，其中該免疫系統疾病或病症係選自由愛迪生氏症（Addison's Disease）、過敏、斑禿、阿茲海默症、抗嗜中性細胞胞質抗體（ANCA）-相關性脈管炎、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群（休斯症候群（Hughes Syndrome））、關節炎、氣喘、動脈硬化、動脈粥樣硬化斑塊、自體免疫疾病（如，狼瘡、RA、MS、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）等）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性心肌炎、自體免疫性卵巢炎、自體免疫性睪丸炎、無精症、貝西氏症（Behcet's Disease）、貝西氏症候群（Behcet's syndrome）、伯格氏症（Berger's Disease）、大皰性類天皰瘡、心肌症、心血管疾病、乳糜瀉、慢性疲勞免疫功能障礙症候群（CFIDS）、慢性自發性多發神經炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經疾病（CIPD）、慢性復發性多發性神經病變（吉蘭-巴雷症候群（Guillain-Barré syndrome））、丘格-史特勞斯症候群（Churg-Strauss Syndrom）（CSS）、瘢痕性類天皰瘡、冷凝集素病（CAD）、COPD、CREST症候群、克隆氏病（Crohn's disease）、皰疹樣皮炎、皮肌炎、糖尿病、盤狀狼瘡、濕疹、後天性大皰性表皮鬆解症、原發性混合型冷凝球蛋白血症、伊凡氏症候群（Evan's Syndrome）、眼球突出症、纖維肌痛、古德巴斯德症候群（Goodpasture's Syndrome）、移植物相關性疾病或病症、葛瑞夫茲氏病（Graves' disease）、GVHD、橋本甲狀腺炎、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（ITP）、IgA腎病、免疫增生疾病或病症（如，牛皮癬）、炎症性腸病（IBD）、胰島素依賴型糖尿病（IDDM）、間質性肺病、幼年型糖尿病、幼年型關節炎、幼年型特發性關節炎（JIA）、川崎氏症、蘭伯特-伊頓肌無力症候群（Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome）、扁平苔蘚、狼瘡、狼瘡性腎炎、淋巴細胞性垂體炎、梅尼爾氏症（Ménière's

Disease）、米勒費雪症候群（Miller Fish Syndrome）/急性播散性腦脊髓脊神經根病、混合性結締組織病、多發性硬化症（MS）、肌風濕病、肌痛性腦脊髓炎（ME）、重症肌無力、眼部炎症、落葉型天皰瘡、尋常型天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群（懷塔克症候群（Whitaker's syndrome））、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性無γ球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化/自體免疫性膽道疾病、牛皮癬、乾癬性關節炎、雷諾氏徵（Raynaud's Phenomenon）、萊特氏症候群（Reiter's Syndrome）/反應性關節炎、血管再狹窄、風濕熱、風濕性疾病、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特氏症候群（Schmidt's syndrome）、硬皮症、修格連氏症候群（Sjörgen's Syndrome）、實體器官移植排斥（腎臟、心臟、肝臟、肺等）、漸凍人症候群、全身性紅斑狼瘡（SLE）、全身性硬皮症、高安氏動脈炎、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、甲狀腺炎、第一型糖尿病、第二型糖尿病、潰瘍性結腸炎、眼色素層炎、脈管炎、白斑症、韋格納氏肉芽腫（Wegener's Granulomatosis），以及預防或抑制與接受者對象對於捐贈者組織、細胞、移植物或器官移植之排斥相關之免疫反應所組成的群。

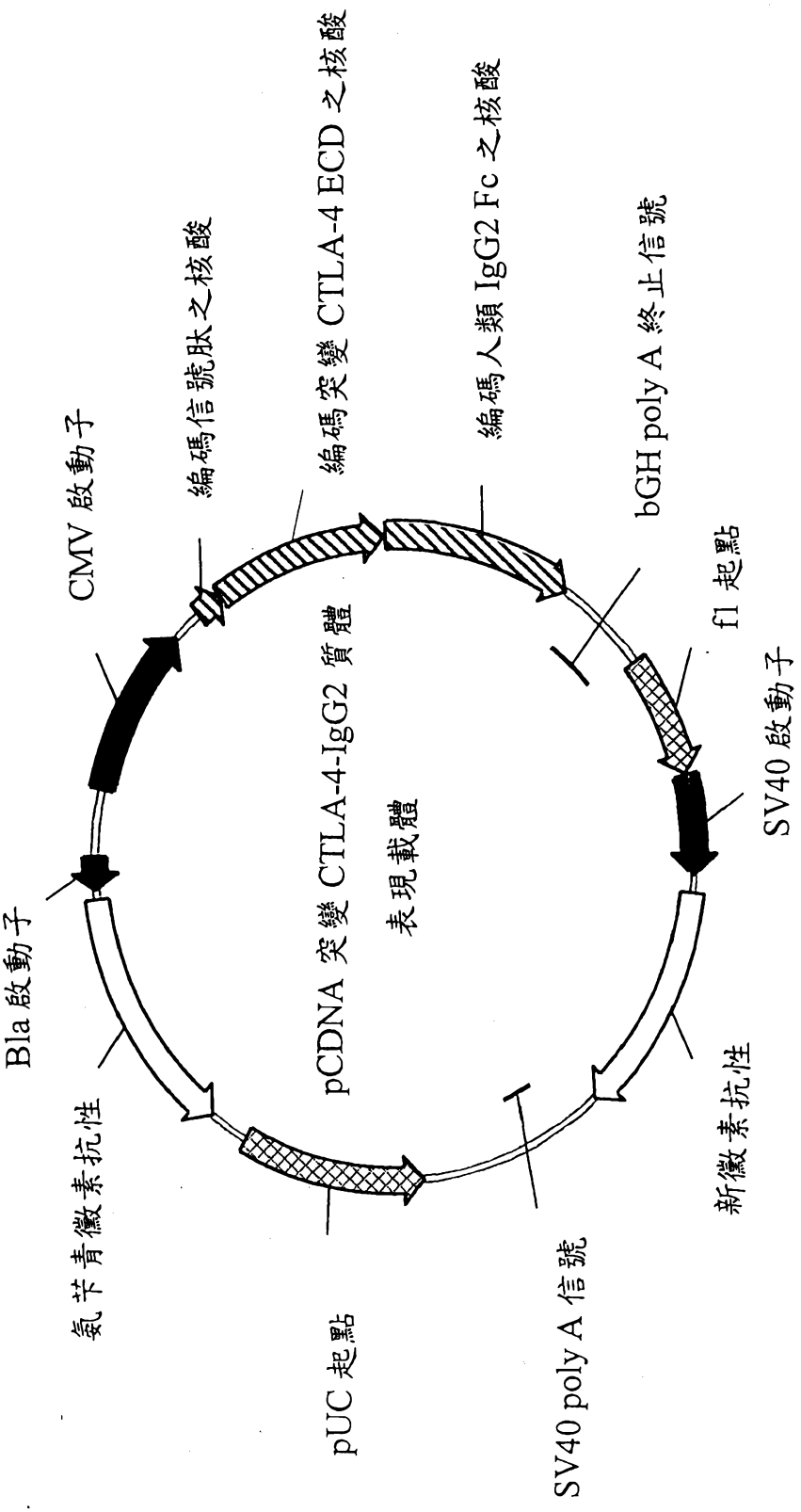

CMV 啟動子
編碼信號肽之核酸
編碼突變 CTLA-4 ECD 之核酸
編碼人類 IgG2 Fc 之核酸
bGH poly A 終止信號
f1 起點
SV40 啟動子
新黴素抗性
SV40 poly A 信號
pUC 起點
氨苄青黴素抗性
Bla 啟動子
pCDNA 突變 CTLA-4-IgG2 質體
表現載體

圖 1

200936607

圖 2A

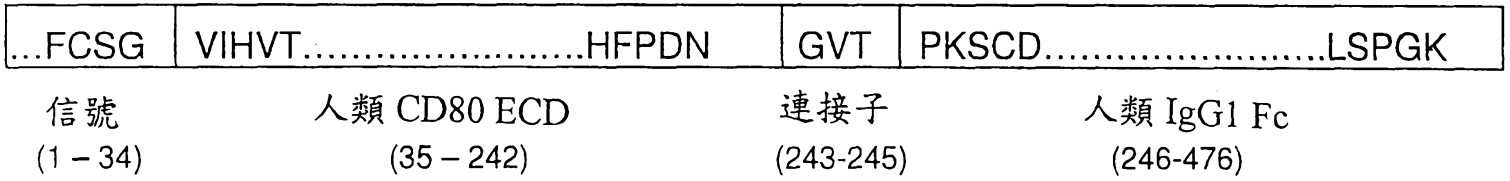


圖 2B

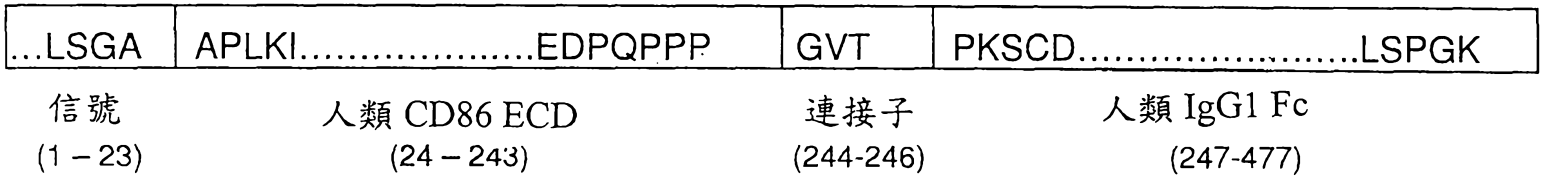


圖 2C

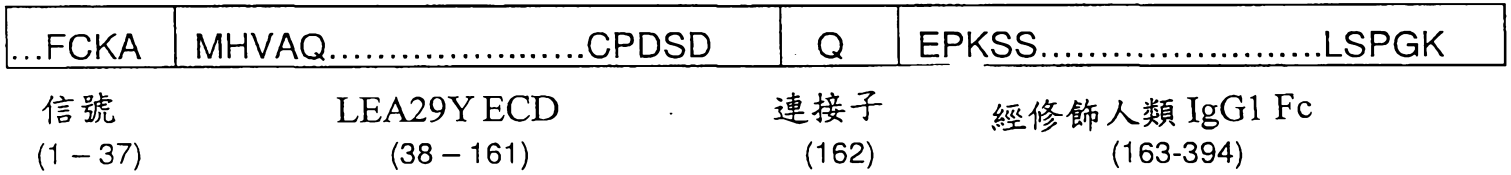
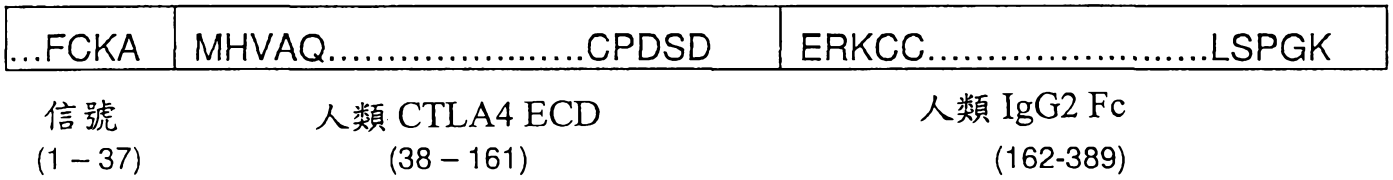

...FCKA
MHVAQ.....CPDSD
Q
EPKSS.....LSPGK
信號
(1 – 37)
LEA29Y ECD
(38 – 161)
連接子
(162)
經修飾人類 IgG1 Fc
(163-394)

圖 2D


...FCKA
MHVAQ.....CPDSD
ERKCC.....LSPGK
信號
(1 – 37)
人類 CTLA4 ECD
(38 – 161)
人類 IgG2 Fc
(162-389)

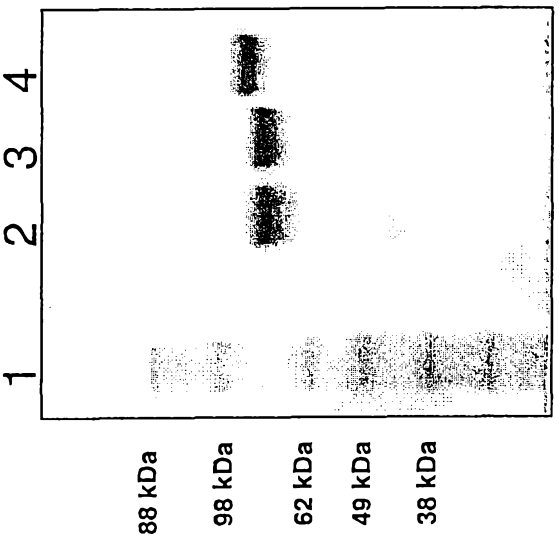


圖 3

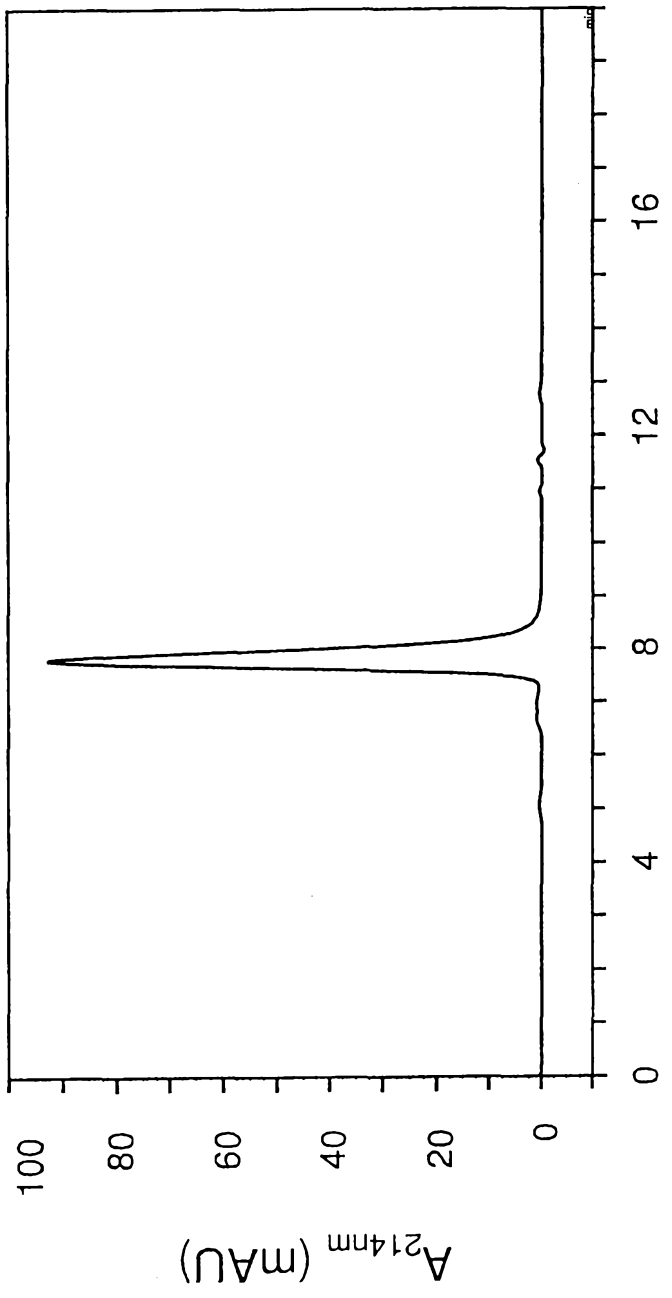


圖 4

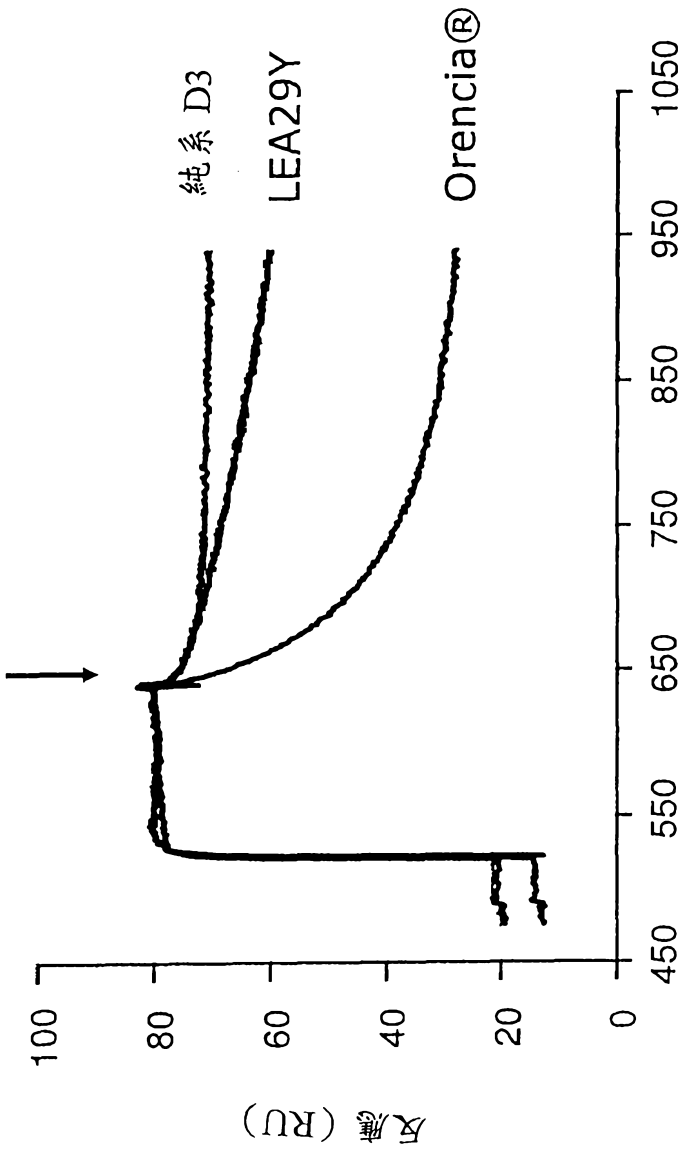

純系 D3
LEA29Y
Orencia®
反應 (RU)
100
80
60
40
20
0
450
550
650
750
850
950
1050
時間 (s)

圖 5

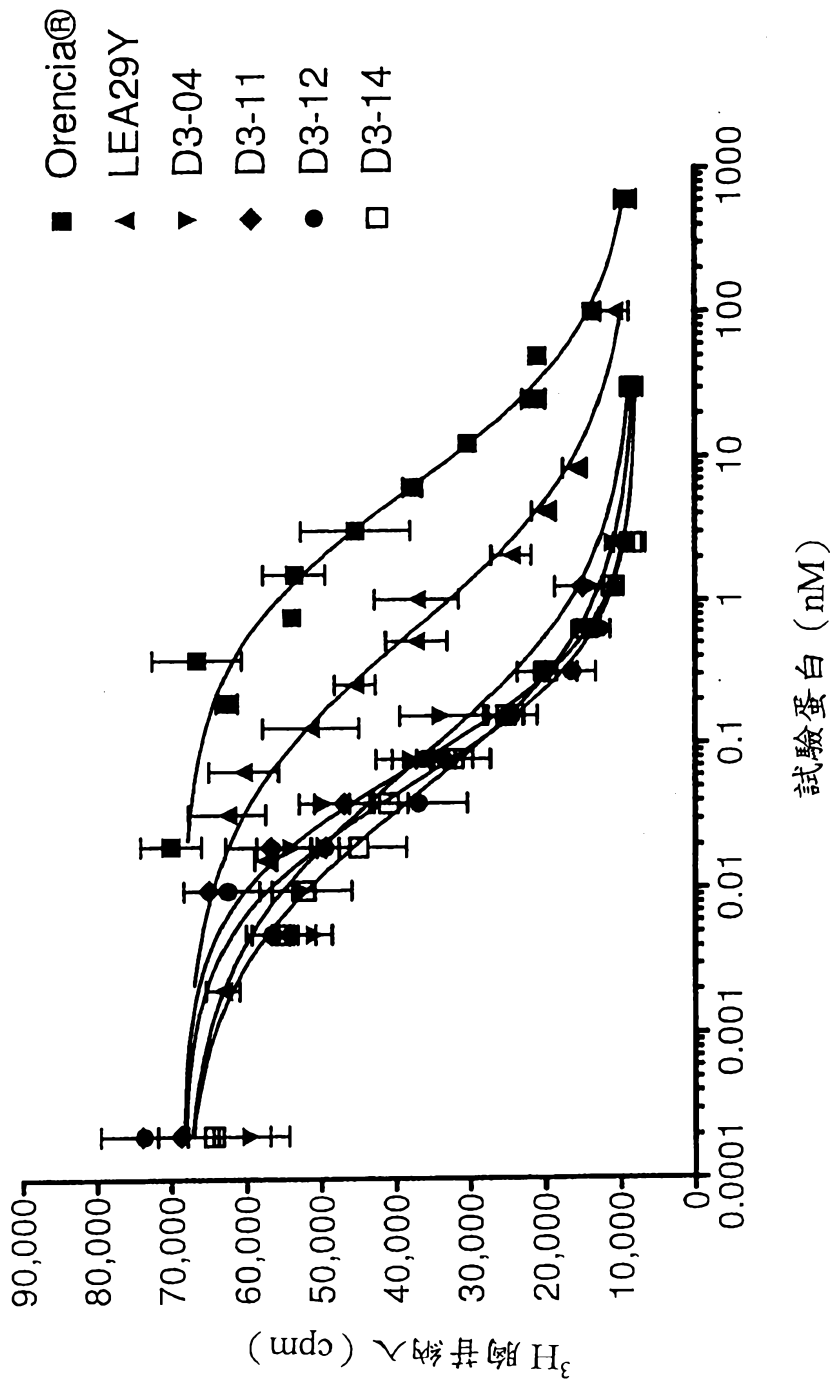

Orencia®
LEA29Y
D3-04
D3-11
D3-12
D3-14
90,000
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
3H 胸苷納入 (cpm)
試驗蛋白 (nM)

圖 6

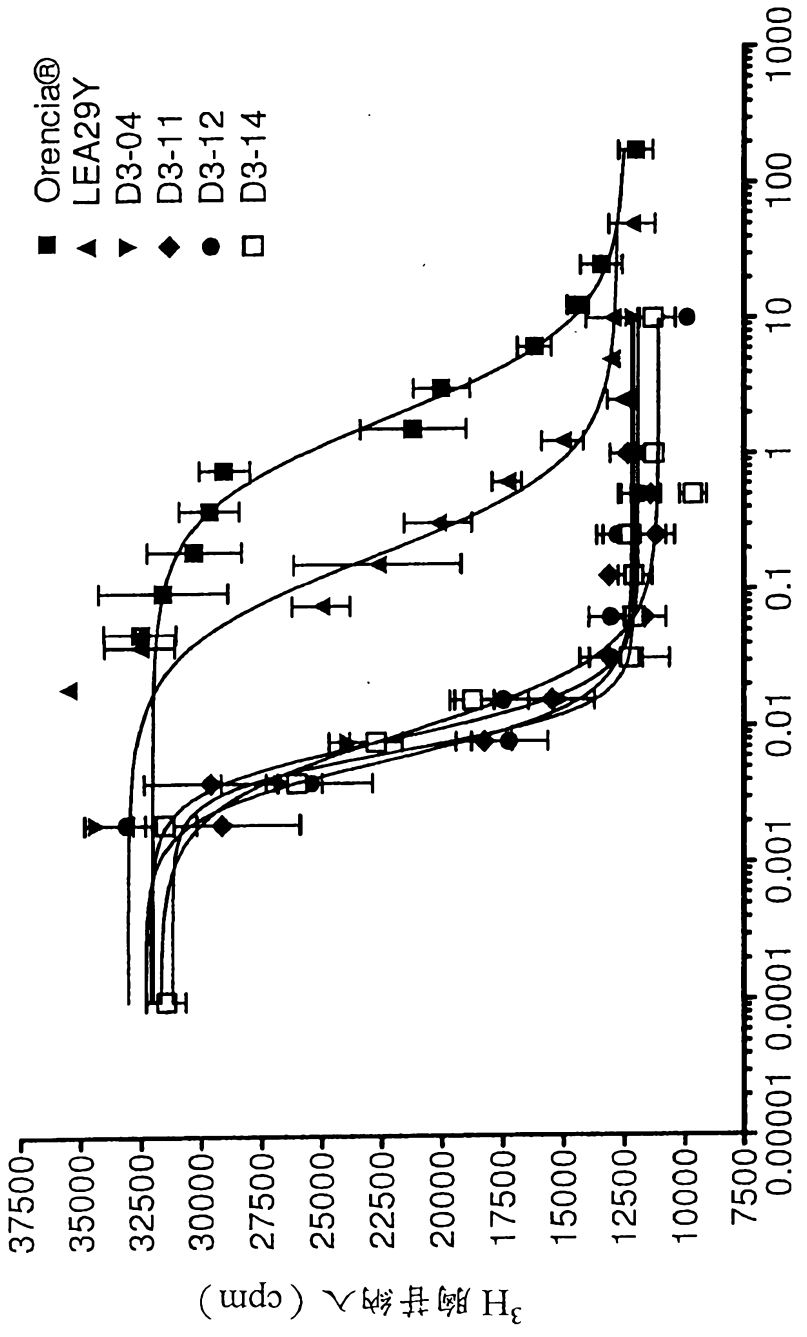

Orencia®
LEA29Y
D3-04
D3-11
D3-12
D3-14
37500
35000
32500
30000
27500
25000
22500
20000
17500
15000
12500
10000
7500
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
試驗蛋白（nM）
3H 胸苷結入（cpm）

圖 7

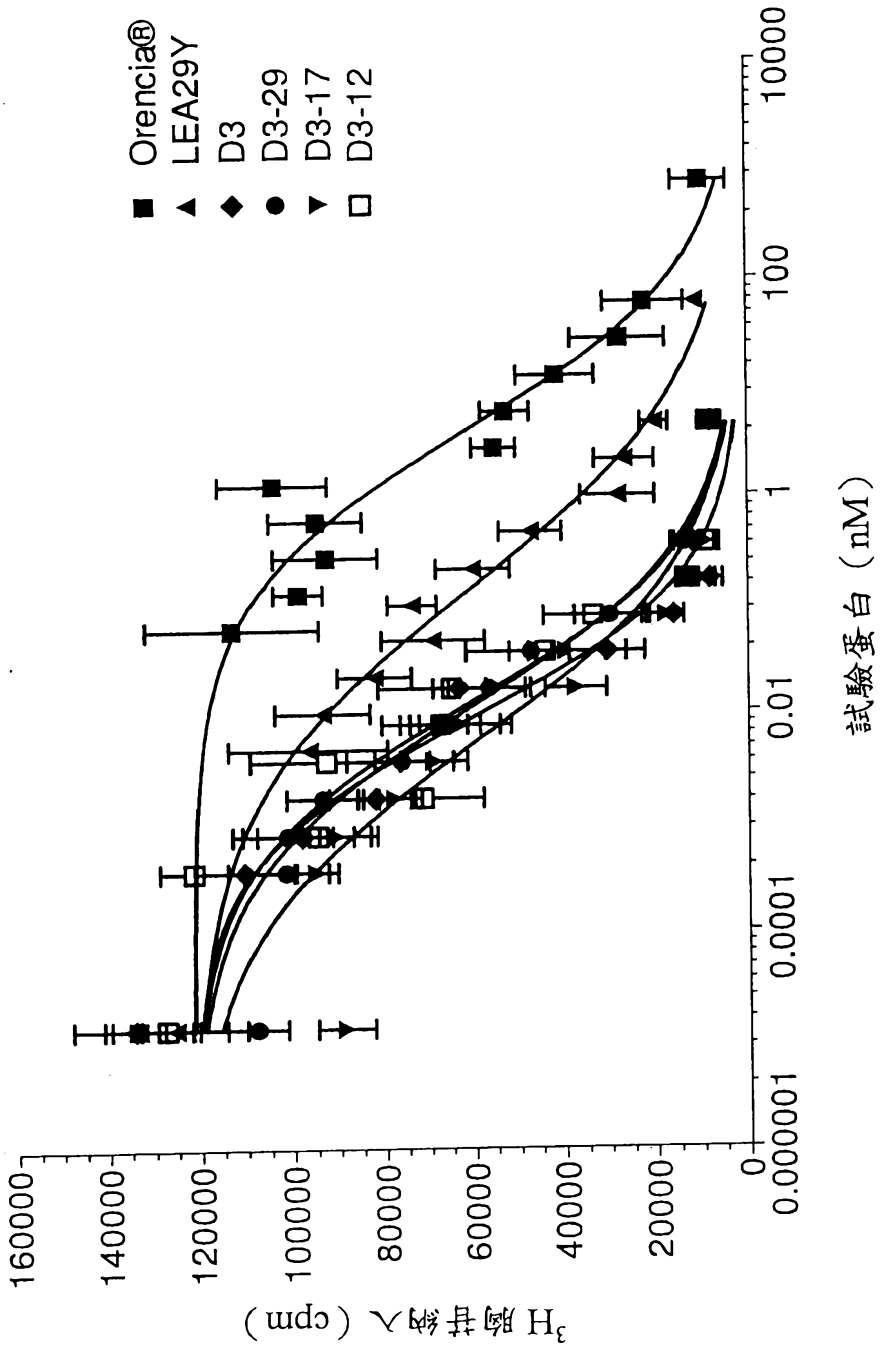

Orencia®
LEA29Y
D3
D3-29
D3-17
D3-12
^{3}H 胸苷納入（cpm）
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
試驗蛋白（nM）

圖 8

200936607

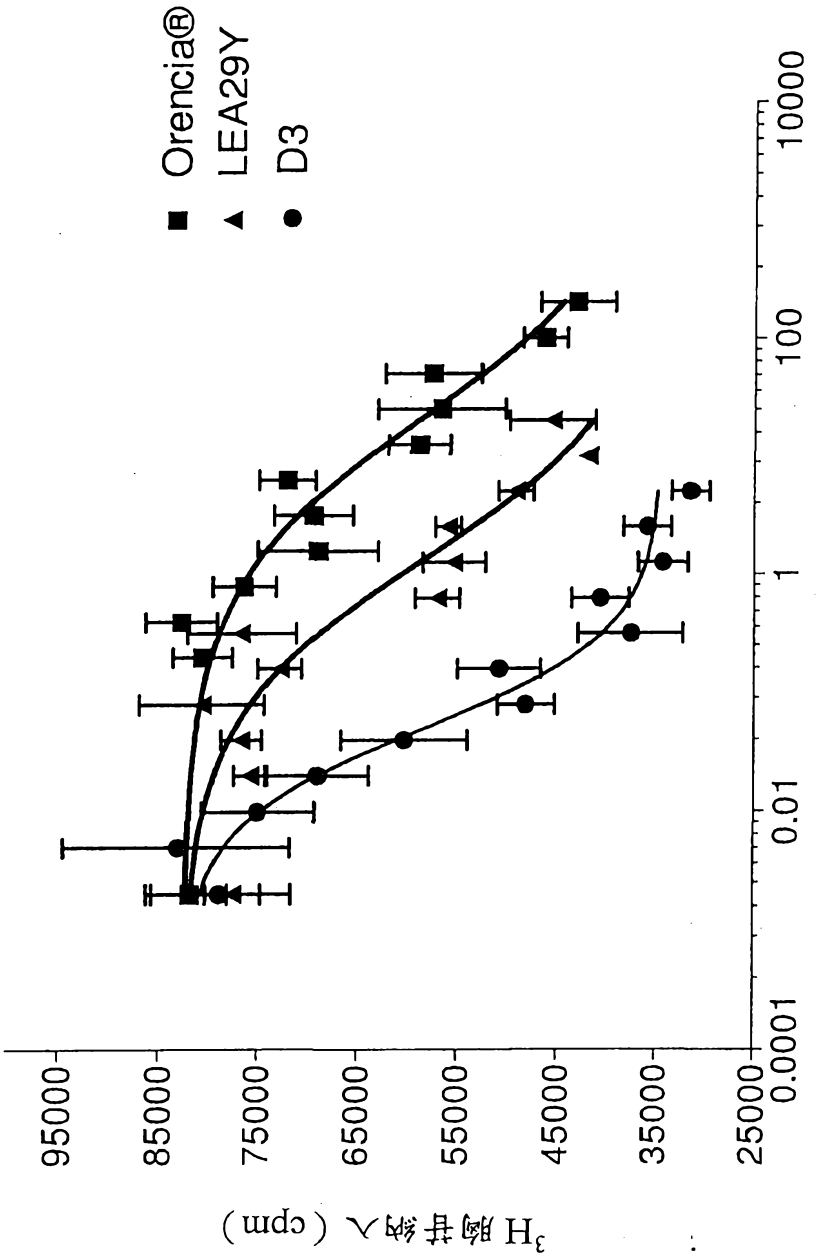


圖 9

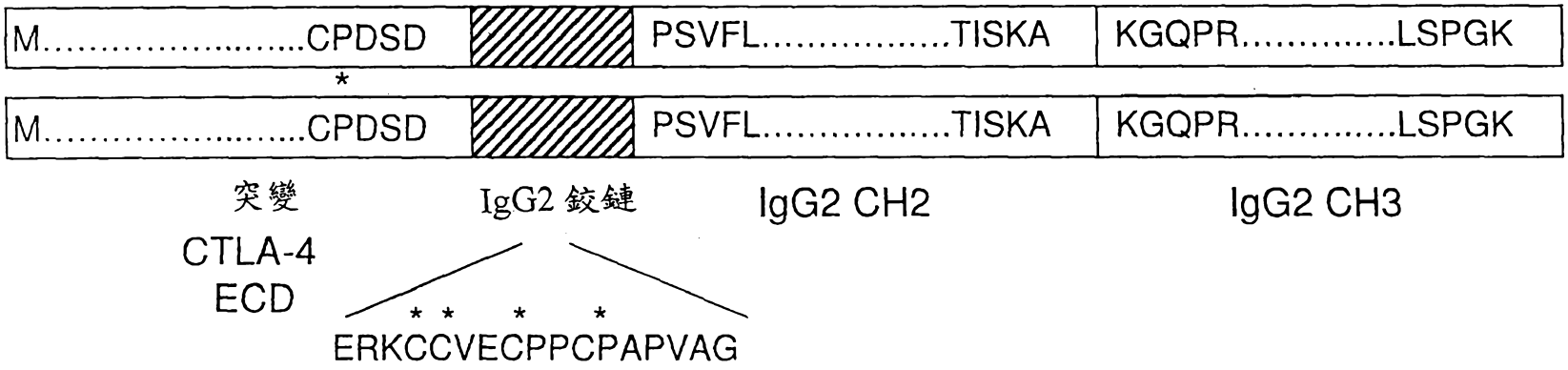

M.....CPDSD
PSVFL.....TISKA
KGQPR.....LSPGK
*
M.....CPDSD
PSVFL.....TISKA
KGQPR.....LSPGK
突變
CTLA-4
ECD
IgG2 鉸鏈
IgG2 CH2
IgG2 CH3
* * * *
ERKCCVECPPCPAPVAG

圖 10

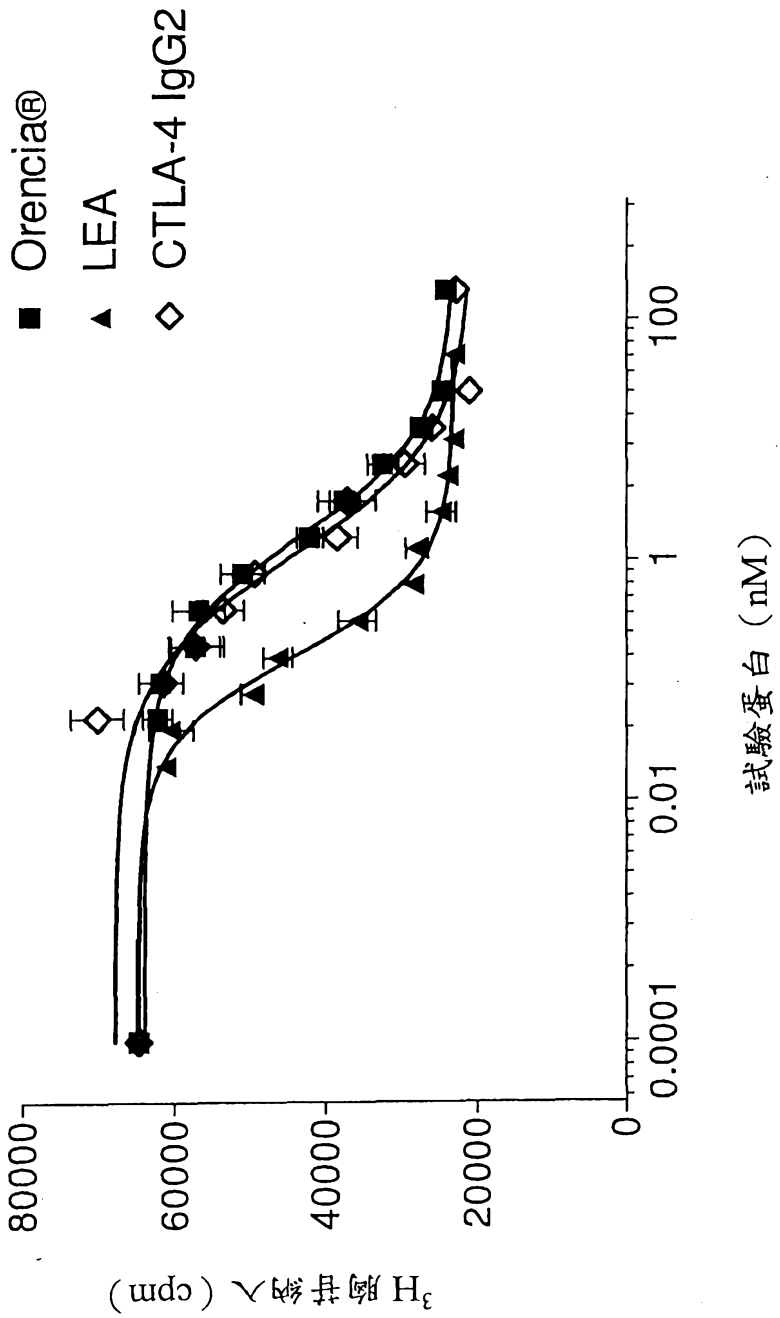

Orencia®
LEA
CTLA-4 IgG2
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.01
1
100
試驗蛋白（nM）
3H 胸苷納入（cpm）

圖 11

```
                    *         20        *         40        *         60
hCTLA4ECD  : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI  :  65
LEA29YECD  : ............................Y.................................... :  65
D3-1       : ............................N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-2       : ........................E.......I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-3       : ........................E.....N..........G........M...K.D.......PS :  65
D3-4       : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-5       : ........................E.....N.I........G............K.D.......PS :  65
D3-6       : ........................E.....N.I........G........M.....D.......PS :  65
D3-7       : ........................E.....N.I........G........M...K.........PS :  65
D3-8       : ........................E.....N.I........G........M...K.D........S :  65
D3-9       : ........................E.....N.I........G........M...K.D.......P. :  65
D3-11      : ........................E.....N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-12      : ........................E.....N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-14      : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-15      : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-16      : ........................E.....N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-17      : ........................E.....N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-19      : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-20      : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-21      : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-22      : ........................E.....N.I........G........M...K.........PS :  65
D3-23      : ........................E.....N.I................M...K.........PS :  65
D3-24      : ........................E.....N.I........G........M...K.........PS :  65
D3-25      : ........................E.....N.I........G........M...K.........PS :  65
D3-26      : ............................N.I................M...K.........PS :  65
D3-27      : ........................E.....N..................M...K.........PS :  65
D3-28      : ........................E.....N.I................M...K.........P. :  65
D3-29      : ............................N.I................M...K.D.......PS :  65
D3-30      : ........................E.....N.I................M...K.D.......P. :  65
D3-31      : ........................E.....N.I................M...KED.......PS :  65
```

圖 12A

```
                    *         20        *         40        *         60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI :  65
LEA29YECD :                            Y                                     :  65
D3-32     :                       E.....N.I......K.........M...K.D.......PS :  65
D3-33     :                       E.....N.I......K.........M...KED.......PS :  65
D3-34     :                            N.....................M...K.........PS :  65
D3-39     :                       E.....N.....................M...K.........P. :  65
D3-50     :                            N.....................M...K.D.......P. :  65
D3-52     :                            N.I...................M...K.........P. :  65
D3-53     :                       E.....N.I........G........M...K.D.......PS :  65
D3-54     :                            N.....................M...KE........P. :  65
D3-55     :                       E.....N.....................M...KE........P. :  65
D3-56     :                            N.....................M...KE........PS :  65
D3-57     :                            N.I...................M...KED.......P. :  65
D3-58     :                            N.....................M...KED.......PS :  65
D3-59     :                       E.....N.I...................M...KE........P. :  65
D3-60     :                            N.I...................M...KE........PS :  65
D3-61     :                       E.....N.I...................M...KE........PS :  65
D3-62     :                            N.I...................M...KED.......PS :  65
D3-63     :                            N.....................KE........P. :  65
D3-64     :                            N.....................M....E........P. :  65
D3-65     :                            N.....................M...K.........PS :  65
D3-66     :                            N.....................M...K.D.......P. :  65
D3-68     :                       E.....N.I...................M...K.D.......PS :  65
D3-69     :                       E.....N.I...................M...K.D.......PS :  65
D3-70     :                       E.....N.....................M...K.........PS :  65
D3-71     :                            N.I...................M...K.D.......PS :  65
D3-72     :                       E.....N.I...................M...K.........PS :  65
D3-73     :                       E.....N.....................M...K.........P. :  65
D3-74     :                            N.I...................M...K.........P. :  65
D3-75     :                       E.....N.....................M...KE........PS :  65
D3-76     :                            N.....................M...KED.......P. :  65
```

圖 12B

```
                    *         20        *         40        *         60
hCTLA4ECD  : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI  :  65
LEA29YECD  : ..........................Y.....................................  :  65
D1         : ......................E..H....I........N........M...K.D.......PF  :  65
D1T        : ......................E..H..N.I........N........M...K.D.......PF  :  65
D2         : ......................E..H..N.I........N........M...K.D.......PF  :  65
D3         : ......................E.....N.I........G........M...K.D.......PS  :  65
D4         : ......................S.....D.I........S........M...E.D.......PT  :  65
D5         : ..................................................D.......P.  :  65
D6         : ...........................I..................M.....D.......P.  :  65
D20        : ......................E..H....I..................M....ED.......P.  :  65
D21        : ......................SA.HN.D.I......K.S........M...EED.......PT  :  65
D23        : ......................SA.HN.A.I......K.G........M...KED.......PS  :  65
D24        : ......................E.....N.I......K.G........M...KED.......PS  :  65
D26        : ......................EA.H..N........E.G........M...VED.......PS  :  65
D27        : ......................E.....N........E.G........M...VED.......PS  :  65
D28        : ......................EA.H..N..........G........M....ED.......PS  :  65
D29        : ......................EA.H..D.I......K..........M....ED.......PS  :  65
D31        : ......................EA.HN.D.I........G........M...VED......K..  :  65
```

圖 12C

```
                  *         80          *        100         *        120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD : ....................................E.................... : 124
D3-1      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-2      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-3      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-4      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-5      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-6      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-7      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-8      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-9      : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-11     : ....F.....................................F.................. : 124
D3-12     : ....F.............A....................................... : 124
D3-14     : ....F.............A....................................... : 124
D3-15     : ....F.....................................F.................. : 124
D3-16     : ....F.................................................... : 124
D3-17     : ....F.................................................... : 124
D3-19     : ....F.............A....................................... : 124
D3-20     : ....F.................................................... : 124
D3-21     : ....F.....................................F.................. : 124
D3-22     : ....F.................................................... : 124
D3-23     : ....F.............A.....................F.................. : 124
D3-24     : ....F.....................................F.................. : 124
D3-25     : ....F.............A....................................... : 124
D3-26     : ....F.................................................... : 124
D3-27     : ....F.................................................... : 124
D3-28     : ....F.................................................... : 124
D3-29     : ....F.................................................... : 124
D3-30     : ....F.................................................... : 124
D3-31     : ....F.............A....................................... : 124
```

圖 12D

```
                 *        80         *       100         *       120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD : ..........................................E..................... : 124
D3-32     : ....F.............A..................................... : 124
D3-33     : ....F.............A..................................... : 124
D3-34     : ....F.................................................... : 124
D3-39     : ....F.................................................... : 124
D3-50     : ....F.................................................... : 124
D3-52     : ....F.................................................... : 124
D3-53     : ....F.............A..................E..................... : 124
D3-54     : ....F.................................................... : 124
D3-55     : ....F.................................................... : 124
D3-56     : ....F.................................................... : 124
D3-57     : ....F.................................................... : 124
D3-58     : ....F.................................................... : 124
D3-59     : ....F.................................................... : 124
D3-60     : ....F.................................................... : 124
D3-61     : ....F.................................................... : 124
D3-62     : ....F.................................................... : 124
D3-63     : ....F.................................................... : 124
D3-64     : ....F.................................................... : 124
D3-65     : ....F..................................E..................... : 124
D3-66     : ....F..................................E..................... : 124
D3-68     : ....F.............A....................E..................... : 124
D3-69     : ....F..................................E..................... : 124
D3-70     : ....F..................................E..................... : 124
D3-71     : ....F..................................E..................... : 124
D3-72     : ....F..................................E..................... : 124
D3-73     : ....F..................................E..................... : 124
D3-74     : ....F..................................E..................... : 124
D3-75     : ....F.................................................... : 124
D3-76     : ....F.................................................... : 124
```

圖 12E

```
                 *         80         *        100         *        120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD :                                      E                     : 124
D1        :    F            A                                          : 124
D1T       :    F            A                                          : 124
D2        :    F            A                   M                      : 124
D3        :    F            A                   F                      : 124
D4        :    F            V                   F                      : 124
D5        :    F                                                       : 124
D6        :    F                                                       : 124
D20       :    F                                                       : 124
D21       :    F            V                   F                      : 124
D23       :    F            A                   L                      : 124
D24       :    F            A                   L                      : 124
D26       :    F            A                   L                      : 124
D27       :    F            A                   L                      : 124
D28       :    F            A                   L                      : 124
D29       :    F                                L                      : 124
D31       :    F                                                       : 124
```

圖 12F

BLOSUM62 替換矩陣

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	B	Z	X	*
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0	-2	-1	0	-4
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3	-1	0	-1	-4
N	-2	0	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3	3	0	-1	-4
D	-2	-2	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3	4	1	-1	-4
C	0	-3	-3	-3	9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1	-3	-3	-2	-4
Q	-1	1	0	0	-3	5	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2	0	3	-1	-4
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	1	4	-1	-4
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-1	-4
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3	0	0	-1	-4
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4	2	-3	1	0	-3	-2	-1	-3	-1	3	-3	-3	-1	-4
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	-1	1	-4	-3	-1	-4
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	0	1	-1	-4
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5	0	-2	-1	-1	-1	-1	1	-3	-1	-1	-4
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6	-4	-2	-2	1	3	-1	-3	-3	-1	-4
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7	-1	-1	-4	-3	-2	-2	-1	-2	-4
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4	1	-3	-2	-2	0	0	0	-4
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5	-2	-2	0	-1	-1	0	-4
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11	2	-3	-4	-3	-2	-4
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1	-3	-2	-1	-4
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4	-3	-2	-1	-4
B	-2	-1	3	4	-3	0	1	-1	0	-3	-4	0	-3	-3	-2	0	-1	-4	-3	-3	4	1	-1	-4
Z	-1	0	0	1	-3	3	4	-2	0	-3	-3	1	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	1	4	-1	-4
X	0	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-2	0	0	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-4
*	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	1

圖 13

A.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 40-54）

```
 Q   A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
 A   G   S   Q   V   T   E   V   C   A   M   T   Y   M   K
-1   0   0   0  -2   0  -1  -2  -1   0  -1   0  -2  -1  -1
                                                        = -12
```

B.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 41-55）

```
Q   A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
    A   G   S   Q   V   T   E   V   C   A   M   T   Y   M   K
    4  -1   4   5   4   5   5   4   9   4  -1   5   7   5
                                                        = 59
```

C.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 41-55，其中胺基酸 49-50 刪除）

```
Q   A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
    A   G   S   Q   V   T   E   V   C   T   Y   M   K
    4  -1   4   5   4   5   5   4   9   0  -2  -1  -2
                                                        = 34
```

D.

（上排：hCTLA-4 ECD 之胺基酸 39-53）
（下排：D3 之胺基酸 41-55，其中胺基酸 49-50 刪除）

```
Q   A   D   S   Q   V   T   E   V   C   A   A   T   Y   M
    A   G   S   Q   V   T   E   V   C   -   -   T   Y   M   K
    4  -1   4   5   4   5   5   4   9 -12  -1   5   7   5
                                                        = 43
```

圖 14

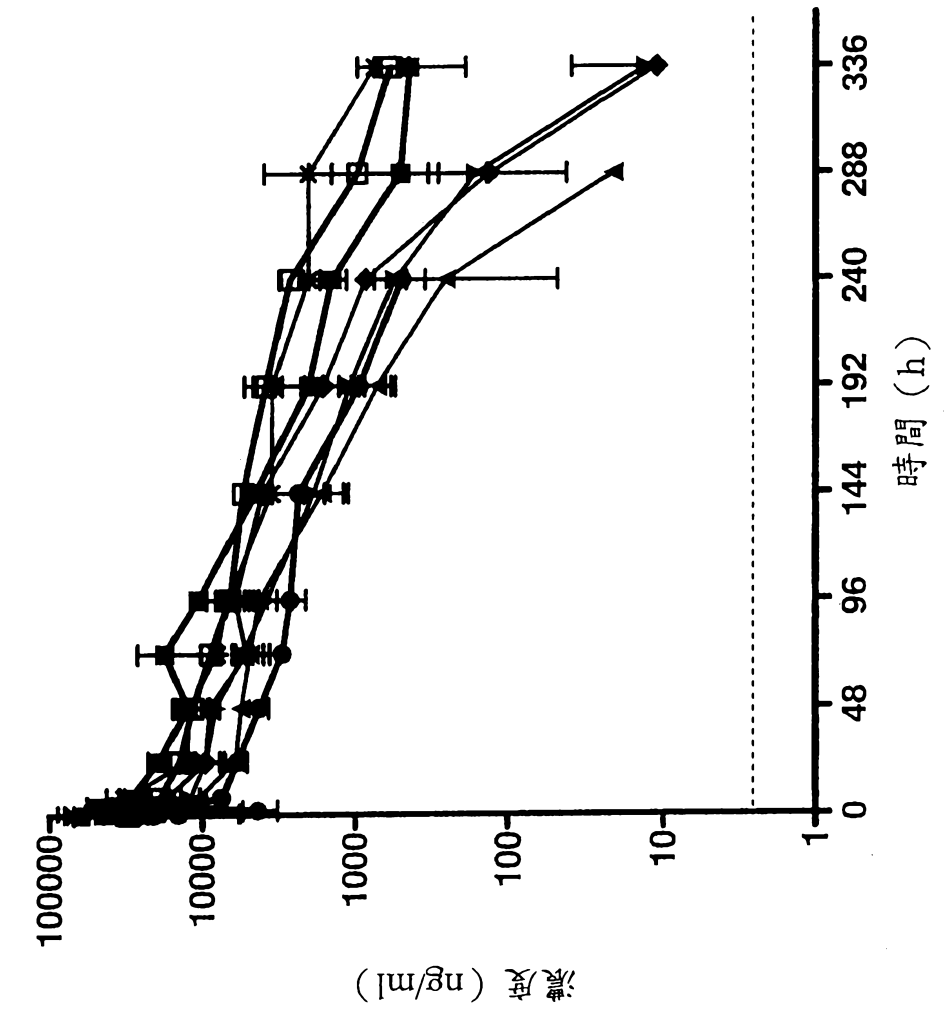

Orencia®
CTLA-4IgG2
D3-29-IgG2
D3-54-IgG2
D3-56-IgG2
D3-69-IgG2
D3-75-IgG2
濃度（ng/ml）
100000
10000
1000
100
10
1
0
48
96
144
192
240
288
336
時間（h）

圖 15A

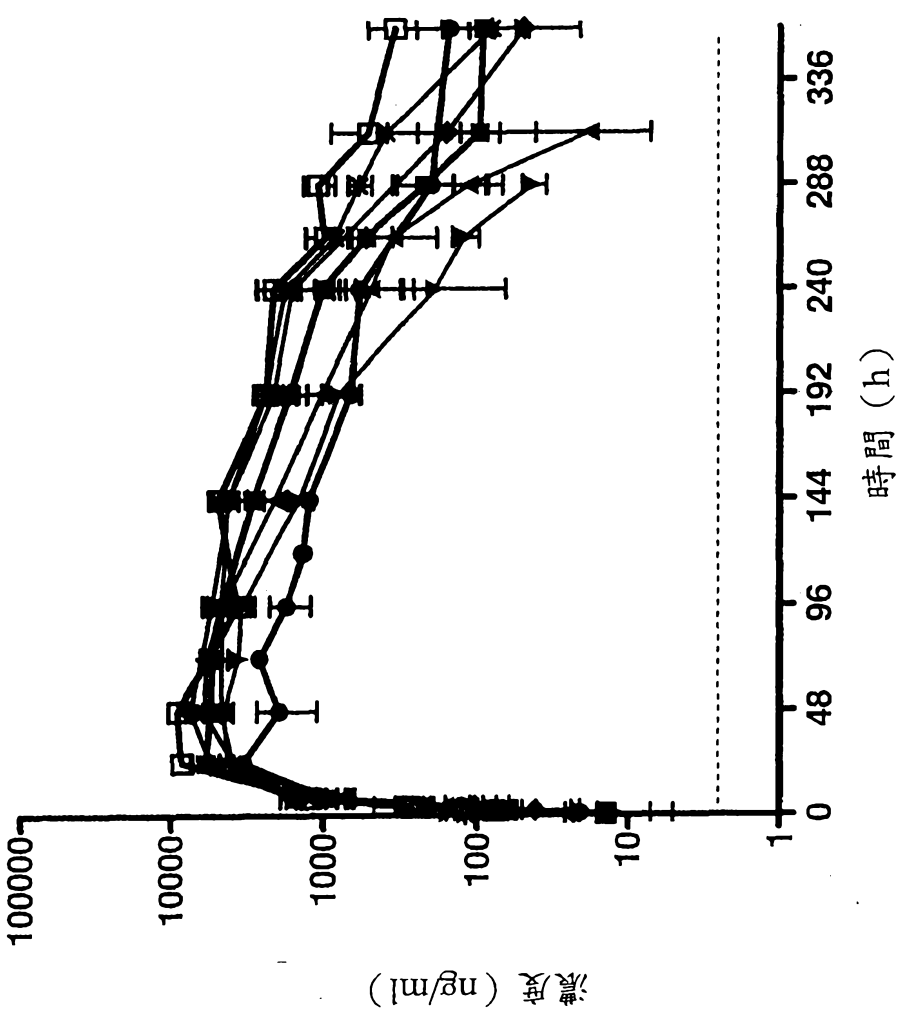

Orencia®
CTLA-4IgG2
D3-29-IgG2
D3-54-IgG2
D3-56-IgG2
D3-69-IgG2
D3-75-IgG2
濃度（ng/ml）
100000
10000
1000
100
10
1
0
48
96
144
192
240
288
336
時間（h）

圖 15B

四、指定代表圖：

（一）本案指定代表圖為：第（ 6 ）圖。

（二）本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）