



(21)申請案號：109105614

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 21 日

(51)Int. Cl. :

C07K16/28 (2006.01)A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/22美國62/809,319

2019/03/07美國62/815,249

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

美國

(72)發明人：芭比蘇珊娜 BARBEE, SUSANNAH D. (US)；布倫南湯瑪斯 BRENNAN, THOMAS (US)；珊尼諾芭芭拉 SENNINO, BARBARA (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無申請專利範圍項數：61 項圖式數：5共 66 頁

(54)名稱

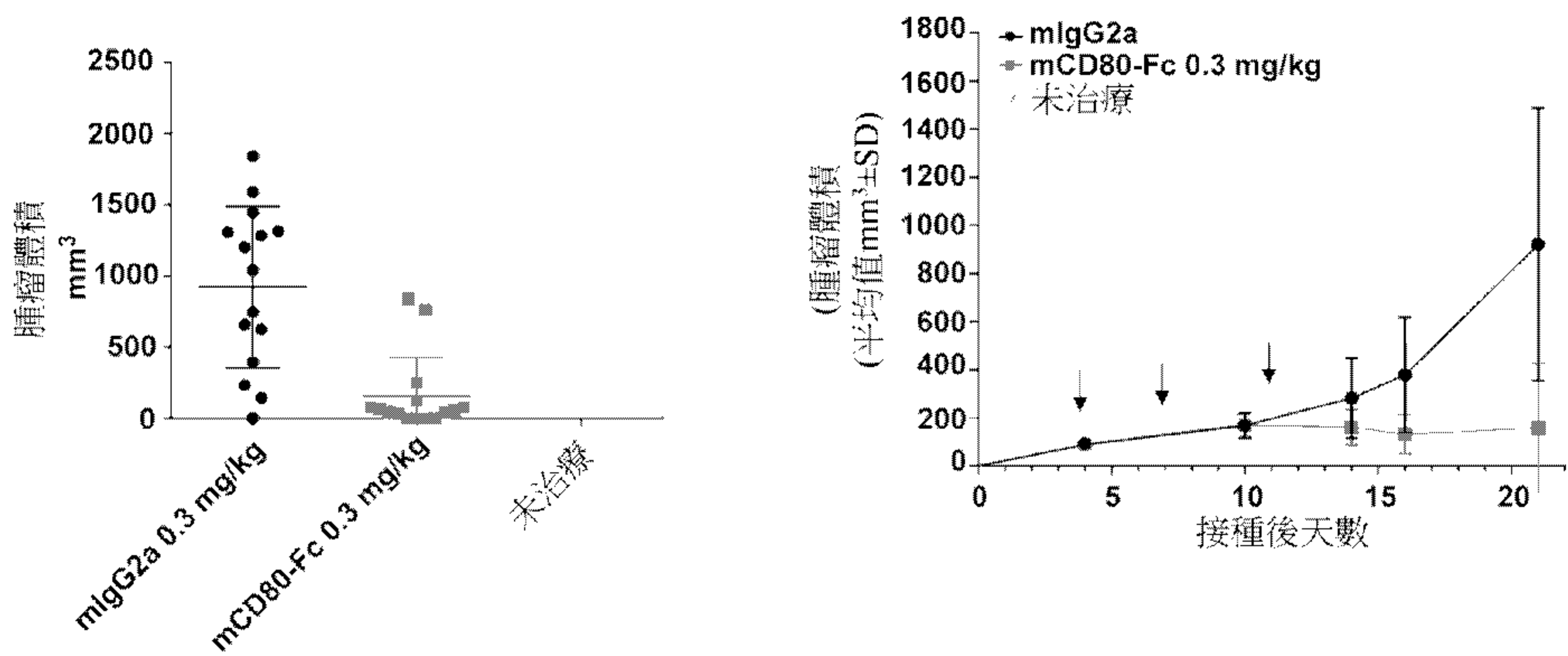
用於治療 P D－L 1 陰性腫瘤之 C D 8 0 胞外結構域 F c 融合蛋白

(57)摘要

本揭露提供治療 PD-L1 陰性腫瘤之方法，該等方法包含投與融合蛋白，該等融合蛋白包含人類分化抗原簇 80(CD80)之胞外域及人類免疫球蛋白 G1(IgG1)之可結晶片段(Fc)域。

The present disclosure provides methods of treating PD-L1 negative tumors, the methods comprising administering fusion proteins comprising the extracellular domain of human cluster of differentiation 80 (CD80) and the fragment crystallizable (Fc) domain of human immunoglobulin G 1 (IgG1).

指定代表圖：



【圖 5】



202045544

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療 P D - L 1 陰性腫瘤之 C D 8 0 胞外結構域
F c 融合蛋白

【英文發明名稱】

CD80 EXTRACELLULAR DOMAIN FC FUSION PROTEINS FOR
TREATING PD-L1 NEGATIVE TUMORS

【中文】

本揭露提供治療 PD-L1 陰性腫瘤之方法，該等方法包含投與融合蛋白，該等融合蛋白包含人類分化抗原簇 80 (CD80) 之胞外域及人類免疫球蛋白 G1 (IgG1) 之可結晶片段 (Fc) 域。

【英文】

The present disclosure provides methods of treating PD-L1 negative tumors, the methods comprising administering fusion proteins comprising the extracellular domain of human cluster of differentiation 80 (CD80) and the fragment crystallizable (Fc) domain of human immunoglobulin G 1 (IgG1).

【指定代表圖】第(5)圖。
【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療PD-L1陰性腫瘤之CD80胞外結構域Fc融合蛋白

【英文發明名稱】

CD80 EXTRACELLULAR DOMAIN FC FUSION PROTEINS FOR
TREATING PD-L1 NEGATIVE TUMORS

【技術領域】

【0001】本申請案證明包含CD80(B7-1)胞外域(ECD)及免疫球蛋白可結晶片段(Fc)域之融合蛋白可有效治療腫瘤，不論PD-L1狀態為何。因此，此類融合蛋白可有利地用於治療PD-L1陰性腫瘤。

【先前技術】

【0002】PD-1(計畫性細胞死亡蛋白質1)為在活化T細胞上表現之免疫學檢查點。PD-1途徑在腫瘤微環境中為重要的，其中由腫瘤表現之PD-L1(計畫性細胞死亡蛋白1配位體)與PD-1相互作用以抑制T細胞效應功能，由此克服免疫監視及腫瘤細胞殺傷。除了腫瘤細胞以外，PD-L1亦可藉由腫瘤微環境中之抗原呈遞細胞來表現。PD-1及PD-L1拮抗劑已經批准用於治療癌症。

【0003】PD-L1已經報道可結合CD80(B7-1)並且在不

存在CD80之CD28及CTLA-4受體的情況下誘導雙向抑制性信號傳導(Li等人，*JBC* 292:6799-6809(2017)。)因此，已提出CD80蛋白可藉由拮抗抑制性PD-L1/PD-1途徑以便驅動有效抗腫瘤免疫來起到治療作用(Swanson等人，*Cancer Research* 78:Abstract 4550(2018)。)事實上，CD80胞外域(ECD)-Fc融合蛋白已經證明可引起有效抗腫瘤活性。

【0004】然而，PD-L1不在所有腫瘤上表現。因此，為了使用PD-1或PD-L1之抑制劑來治療某些適應症，需要進行PD-L1測試，以使得不表現PD-L1之腫瘤可能不適合於治療。因此，需要治療PD-L1陰性腫瘤之方法。

【發明內容】

【0005】如在本文中證明，藉由包含人類分化抗原簇80(CD80)之胞外域(ECD)及人類免疫球蛋白G1(IgG1)之可結晶片段(Fc)域之融合蛋白所引起之抗腫瘤效應經由CD28及CTLA-4，而非經由PD-L1來介導。因此，此等融合蛋白令人驚訝地能夠治療腫瘤，不論其PD-L1狀態為何。因此，本文提供治療PD-L1陰性腫瘤之方法，其包含投與包含CD80 ECD及人類IgG1之Fc域之融合蛋白。

【0006】在某些態樣中，治療個體之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向個體投與包含CD80胞外域(ECD)融合分子之組成物。在某些態樣中，在投與之前，腫瘤已經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，方法進一步包含在投與之前，確定腫瘤為PD-L1陰性的。

【0007】在某些態樣中，選擇患有腫瘤之個體以使用包含CD80 ECD融合分子之組成物來治療的方法包含確定自個體獲得之腫瘤樣品是否為PD-L1陰性的並且若腫瘤樣品經確定為PD-L1陰性的，則選擇該個體來用組成物治療。

【0008】在某些態樣中，包含CD80 ECD融合分子之組成物用於治療個體之PD-L1陰性癌症腫瘤。在所使用之組成物之某些態樣中，藉由確定自個體獲得之腫瘤樣品為PD-L1陰性的，選擇個體來治療。

【0009】在某些態樣中，包含CD80 ECD融合分子之組成物用於治療個體之腫瘤，其中腫瘤已經確定為PD-L1陰性的。

【0010】在某些態樣中，用於鑑別患有對於使用包含CD80 ECD融合分子之組成物之治療作出反應之腫瘤的個體之活體外方法包含確定自個體獲得之腫瘤樣品是否為PD-L1陰性，其中若腫瘤樣品經確定為PD-L1陰性的，則個體經鑑別為對於使用CD80 ECD融合分子之治療作出反應。

【0011】在某些態樣中，至少一種能夠確定腫瘤樣品為PD-L1陰性之劑的體外用途為鑑別患有對於使用包含CD80 ECD融合分子之組成物之治療作出反應之腫瘤的個體。

【0012】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，腫瘤使用能夠偵測PD-L1蛋白之劑已確定或經確

定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，劑為特異性結合至PD-L1蛋白之抗體。在某些態樣中，腫瘤藉由西方墨點法(Western blot)已確定或經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，腫瘤藉由螢光活化細胞分選(FACS)已確定或經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，腫瘤藉由免疫組織化學(IHC)已確定或經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，樣品為石蠟包埋樣品。

【0013】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，腫瘤使用能夠偵測PD-L1 mRNA之劑已確定或經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，腫瘤藉由定量反轉錄酶(RT)-聚合酶鏈反應(PCR)已確定或經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，腫瘤使用RNA-Seq已確定或經確定為PD-L1陰性的。在某些態樣中，腫瘤使用微陣列已確定或經確定為PD-L1陰性的。

【0014】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，腫瘤為實體腫瘤。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，個體患有選自由以下組成之群的癌症：結直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑素瘤、頭頸鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌、及子宮內膜癌。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，個體患有在由手術、化學療法、輻射療法、或其組合組成之療法之後復發或進展的癌症。

【0015】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，CD80 ECD融合分子包含人類CD80 ECD及人類

IgG1 Fc域。

【0016】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，組成物包含唾液酸化CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白至少15莫耳之唾液酸(SA)。在某些態樣中，唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白15-60莫耳之SA。在某些態樣中，唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白15-40莫耳之SA。在某些態樣中，唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白15-30莫耳之SA。在某些態樣中，唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白20-30莫耳之SA。

【0017】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，CD80 ECD融合分子包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:1之人類CD80 ECD。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，CD80 ECD融合分子包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:3之人類IgG1 Fc域。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，人類IgG1之Fc域係連接至人類CD80之ECD之羧基末端。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，CD80 ECD融合分子包含胺基酸序列SEQ ID NO:5。

【0018】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，PD-L1陰性腫瘤具有少於5%或少於1%之TPS評分。

【0019】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些

態樣中，單獨組成物不導致干擾素 γ 或TNF α 自活體外T-細胞中大量釋放。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，與單獨TGN1412相比，單獨組成物導致干擾素 γ 或TNF α 更少自活體外T-細胞中釋放。在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，與單獨TGN1412相比，單獨組成物誘導干擾素 γ 或TNF α 釋放之有效性少至少1000倍。在本文提供之方法、組成物、或之某些態樣中，在投與0.3至0.6mg/kg之單一劑量之組成物之後，組成物能夠在至少一週、10天、兩週、或三週之時段內在至少一種小鼠同基因癌症模型中實現至少90%腫瘤生長抑制。在某些態樣中，小鼠同基因癌症模型為CT26腫瘤模型。

【0020】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，治療包含投與約0.07mg至約70mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約7.0mg至約70mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約70mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約42mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約21mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約7mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約2.1mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約0.7mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約0.21mg之CD80 ECD融合分子。在某些態樣中，治療包含投與約0.07mg之CD80 ECD融合分子。

【0021】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，治療包含每三週投與一次。

【0022】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，治療包含靜脈內投與CD80 ECD融合分子。

【0023】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，個體未接受使用PD-1/PD-L1拮抗劑之先前療法。

【0024】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，個體已接受使用至少一種抗血管生成劑之先前療法。在某些態樣中，抗血管生成劑為舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)、替沃紫尼(tivozanib)、雷莫昔單抗(ramucirumab)、或貝伐單抗(bevacizumab)。在某些態樣中，抗血管生成劑係在晚期或轉移性情形中投與。

【0025】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，個體患有具有BRAF突變之黑素瘤。在某些態樣中，個體已接受使用至少一種BRAF抑制劑之先前療法。在某些態樣中，BRAF抑制劑為維莫非尼(vemurafenib)或達拉菲尼(dabrafenib)。在某些態樣中，BRAF抑制劑係在晚期或轉移性情形中投與。

【0026】在本文提供之方法、組成物、或用途之某些態樣中，腫瘤在選自手術、化學療法、輻射療法、及其組合之療法之後復發或進展。

【0027】在某些態樣中，治療人類患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與包含約0.07mg至約70mg含有

胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CD80 胞外域 (ECD) 融合分子的組成物。在某些態樣中，在投與之前，腫瘤已藉由 IHC 確定為 PD-L1 陰性的。在某些態樣中，組成物包含唾液酸化 CD80 ECD 融合分子並且唾液酸化 CD80 ECD 融合分子包含每莫耳融合蛋白 15-60 莫耳之 SA。

【圖式簡單說明】

【0028】[圖 1A 及 1B]：針對 mCD80-Fc 接合及受體佔用來評估小鼠脾細胞。(A) 藉由流動式細胞測量術，將脾免疫細胞子集鑑別為 CD11b+DC(B220-Thy1.2-CD49b-CD11c+CD11b+)、CD11b-DC(B220-Thy1.2-CD49b-CD11c+CD11b-)、巨噬細胞(B220-Thy1.2-CD49b-CD11c-CD11b+)、NK 細胞(B220-Thy1.2-CD49b+)、及 T 細胞(CD3+CD4+或 CD3+CD8+)。代表性流動式細胞測量術圖描述閘控策略。(B) 遞增濃度之 mCD80-Fc 與小鼠脾細胞(BALB/c 品系頂部列；C57B1/6 品系底部列) 一起培育，並且經由生物素標記之抗-mIgG，繼之以鏈黴親和素 Alexa488(「結合藥物」)，且藉由用列舉為抗體結合能力(ABC)值之競爭 Ab 純系(「游離」PD-L1 或 CD28)偵測 CD80 配位體兩者來量測 mCD80-Fc 接合。在所評估的任何免疫細胞上未偵測到 CTLA-4(資料未展示)。L.D.，ABC 之偵測極限。圖表描述在技術重複物中量測之 n=3 個動物/品系的平均值±SD。針對相比於無藥物(0 μg/mL)之藥物濃度來執行基於 ANOVA 之統計測試，其中 *p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001 被視為顯著的。(參

見實例1。)

【0029】[圖2A及2B]：hCD80-Fc受體佔用實驗在表現人類CTLA-4、PD-L1、CD28、或所有三種CD80配位體(CHO-CTLA4/PDL1/CD28；「CHO-3」)之慢病毒轉導之CHO細胞上執行。母體未轉導CHO細胞用作陰性對照。(A)在CHO細胞株中藉由流動式細胞測量術來評估CD80配位體表現。展示代表性交錯直方圖，並且確定每個細胞之Ab結合位點之數目的抗體結合能力(ABC)值在條形圖右側列舉。(B)CHO細胞與遞增濃度之hCD80-Fc(實心形狀)或hIgG1-Fc對照(空心形狀)一起培育。經由生物素標記之抗-hIgG-Fc，繼之以鏈黴親和素BV605(「結合藥物」)，且藉由用競爭Ab純系(「游離」CTLA-4、PD-L1、CD28)偵測CD80配位體兩者來偵測hCD80-Fc結合。L.D.，ABC之偵測極限。圖表描述技術重複物之平均值 $\pm$ SEM。針對相比於無藥物(0 μ g/mL)之藥物濃度來執行基於ANOVA之統計測試，其中 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 被視為顯著的。(參見實例2。)

【0030】[圖3A及3b]：針對hCD8-Fc接合及受體佔用來評估PBMC。(A)藉由流動式細胞測量術，將外周免疫細胞子集鑑別為B細胞(CD19+)、單核細胞(CD14+)、NK細胞(CD56+CD3-)、及T細胞(CD56-CD3+及CD4+或CD8+)。代表性流動式細胞測量術圖描述閘控策略。(B)遞增濃度之hCD80-Fc與PBMC一起培育，並且經由生物素標記之抗-hIgG-Fc，繼之以鏈黴親和素Alexa488(「結合藥物」)，且

藉由用列舉為抗體結合能力(ABC)值之競爭Ab純系(「游離」PD-L1或CD28)偵測CD80配位體兩者來量測hCD80-Fc接合。在所評估的任何免疫細胞上未偵測到CTLA-4(資料未展示)。L.D.，ABC之偵測極限。圖表描述n=3個供體之平均值 $\pm$ SD。針對相比於無藥物(0 μ g/mL)之藥物濃度來執行基於ANOVA之統計測試，其中 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 被視為顯著的。(參見實例2。)

【0031】[圖4A及4b]：對活體外擴增之CD4+Teff及CD4+Treg的hCD80-Fc接合及受體佔用來進行評估。(A)CD80配位體表現藉由流動式細胞測量術來評估。展示在未染色T細胞、CD4+Teff及CD4+Treg之間對配位體表現進行比較的代表性直方圖。(B)將遞增濃度之hCD80-Fc與T細胞一起培育，並且經由生物素標記之抗-hIgG-Fc結合，繼之以鏈黴親和素Alexa488(「結合藥物」)，且藉由用列舉為抗體結合能力(ABC)值之競爭Ab純系(「游離」CTLA-4、PD-L1或CD28)偵測CD80配位體兩者來量測hCD80-Fc接合。L.D.，ABC之偵測極限。圖表描述n=2-3個供體之平均值 $\pm$ SD。針對相比於無藥物(0 μ g/mL)之藥物濃度來執行基於ANOVA之統計測試，其中 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 被視為顯著的。(參見實例2。)

【0032】[圖5]展示所有組中之平均腫瘤生長及第21天之個別腫瘤體積。將具有免疫能力之BALB/c小鼠用CT26 PD-L1 KO腫瘤細胞接種。接種後4天，當腫瘤達到大約80mm³時，開始治療。在第4天、第7天、及第11天，小

鼠用 0.3 mg/kg 之 mCD80-Fc 治療。mCD80-Fc 顯著抑制腫瘤生長(相對於 mIgG2a 對照， $p=0.0004$ ；相對於未治療組， $p<0.0001$)。(參見實例 3。)

【實施方式】

特定實施例之描述

1. 定義

【0033】除非另外定義，否則與本發明關聯使用之科學及技術術語將具有由一般技藝人士通常所理解之含義。此外，除非另外為上下文所需，否則單數術語將包括複數且複數術語將包括單數。

【0034】除非特別說明或自上下文顯而易知，如本文使用之術語「或」應理解為包含性的。如用於本文中之片語諸如「A 及 / 或 B」中之術語「及 / 或」意欲包括「A 及 B」、「A 或 B」、「A」、及「B」兩者。同樣地，如用於片語諸如「A、B、及 / 或 C」中之術語「及 / 或」意欲涵蓋以下實施例中之每一者：A、B、及 C；A、B、或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 及 C；A 及 B；B 及 C；A(單獨)；B(單獨)；及 C(單獨)。

【0035】術語「多肽」、「肽」、及「蛋白」可互換地用來指代胺基酸殘基之聚合物，並且不限於最小長度。此等胺基酸殘基聚合物可含有天然或非天然胺基酸殘基，且包括但不限於由胺基酸殘基組成之肽、寡肽、二聚體、三聚體及多聚體。全長蛋白質與其片段兩者均由該定義涵

蓋。術語亦包括多肽之表現後修飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化及其類似修飾。此外，出於本發明之目的，「多肽」係指包括對天然序列之修飾，諸如缺失、添加及取代(在自然界中通常為保守性的)之蛋白質，只要該蛋白質保持所要活性即可。此等修飾可為故意的，如經由定點突變誘發，或可為偶然的，諸如經由產生蛋白質之宿主之突變或歸因於PCR擴增之錯誤。

【0036】如本文使用之「**融合分子**」係指由在自然界中不一起出現的共價或非共價連接以形成新分子的兩個或兩個以上不同分子組成的分子。例如，融合分子可包含多肽及聚合物諸如PEG，或兩個不同多肽。「**融合蛋白**」係指由在自然界中不以單一分子形式出現的兩種或兩種以上多肽組成的融合分子。

【0037】「**CD80胞外域**」或「**CD80 ECD**」係指CD80之胞外域多肽，包括其天然及工程化變異體。CD80 ECD可例如包含在SEQ ID NO:1或2中所示之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成、或由該胺基酸序列組成。

「**CD80 ECD融合分子**」係指包含CD80 ECD及融合配偶體之分子。融合配偶體可係共價連接至例如CD80 ECD之N-或C-末端或內部位置。「**CD80 ECD融合蛋白**」為包含CD80 ECD及另一種不天然地與CD80 ECD締合之多肽(諸如Fc域)的CD80 ECD融合分子。CD80 ECD融合蛋白可例如包含在SEQ ID NO:4或5中所示之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成、或由該胺基酸序列組成。

【0038】如本文所用之術語「**經分離**」係指分子已與至少一些其通常在自然界中與之一起發現之組分分離。舉例而言，當多肽與其經產生所處之細胞之至少一些組分分離時，其稱為「**經分離**」。當在表現之後多肽由細胞分泌時，使含有該多肽之上清液與產生其之細胞物理分離被視為「**分離**」該多肽。類似地，聚核苷酸在其不為其通常在自然界中經發現所處之較大聚核苷酸(在DNA聚核苷酸之情況下諸如基因組DNA或粒線體DNA)之一部分，或例如在RNA聚核苷酸之情況下，與其經產生所處之細胞之至少一些組分分離時稱為「**經分離**」。因此，在宿主細胞內部之載體中含有之DNA聚核苷酸可稱為「**經分離**」，只要彼聚核苷酸在自然界中不見於彼載體中即可。

【0039】術語「**個體**」與「**患者**」在本文中可互換用於代表人類。在一些實施例中，亦提供治療其他哺乳動物之方法，該等哺乳動物包括但不限於齧齒動物、猿、貓科動物、犬科動物、馬科動物、牛科動物、豬科動物、羊科動物、山羊科動物、哺乳動物實驗室動物、哺乳動物家畜、哺乳動物體育動物及哺乳動物寵物。

【0040】術語「**癌症**」在本文中用於係指展現異常高水準之增生及生長的一組細胞。癌症可為實體腫瘤，例如結直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、黑色素瘤、頭頸鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌、及子宮內膜癌。

【0041】術語諸如「**治療(treating)**」、「**治療(treatment)**」、

及「**治療(to treat)**」係指治癒病理性病狀或病症、減緩病理性病狀或病症、減輕病理性病狀或病症之症狀、及/或停止病理性病狀或病症之進展的治療性措施。因此，需要治療之彼等包括已經診斷患有或懷疑患有該病症之彼等。在某些實施例中，若患者顯示以下中之一或多者，則根據本發明之方法成功地「治療」個體之癌症：癌細胞數量之減少或完全不存在；腫瘤大小減小；癌細胞向周圍器官之浸潤，包括例如癌症向軟組織及骨骼之擴散受到抑制或不存在；腫瘤轉移受到抑制或不存在；腫瘤生長受到抑制或不存在；與特定癌症相關的一或多種症狀得到緩解；發病率及死亡率降低；生活品質得到改善；腫瘤之致瘤性、致瘤頻率或致瘤能力降低；腫瘤中癌症幹細胞之數量或頻率減小；致瘤細胞分化為非致瘤狀態；無進展生存期(PFS)、無病生存期(DFS)、總生存期(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)、穩定疾病(SD)增加、進展性疾病(PD)降低、進展時間(TTP)縮短或其任何組合。

【0042】如本文使用之術語「**投與(administer)**」、「**投與(administering)**」、「**投與(administration)**」及其類似術語係指可用於實現將藥物例如CD80 ECD融合蛋白遞送至所需生物作用位點的方法(例如，靜脈內投與)。可與本文描述之劑及方法一起使用之投與技術發現於例如 Goodman及 Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 現行版, Pergamon；及 Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, 現行版, Mack Publishing Co., Easton, Pa.中。

【0043】術語「**治療有效量**」係指有效治療個體之疾病或病症之藥物例如CD80 ECD融合蛋白之量。在癌症的情況下，藥物之治療有效量可以減少癌細胞之數量；減少腫瘤大小或負擔；在一定程度上抑制癌細胞向周圍器官之浸潤；在一定程度上抑制腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；在一定程度上緩解與癌症有關之一或多種症狀；及/或產生有利反應，例如無進展生存期(PFS)、無病生存期(DFS)、總生存期(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)、或者在一些情況下穩定疾病(SD)增加、進展性疾病(PD)降低、進展時間(TTP)縮短或其任何組合。

【0044】當在用治療劑治療之上下文中使用時，術語「**抗性**」或「**無反應**」意謂相對於個體在過去對於標準劑量之治療劑的反應，或相對於患有類似病症之類似個體對於標準劑量之治療劑的期望反應，個體對於標準劑量之治療劑表現出減少之反應或缺乏反應。因此，在一些實施例中，雖然先前未給予個體治療劑，但是個體可對於治療劑具有抵抗力，或個體在一或多個先前場合中對於各劑作出反應之後，可出現對於治療劑之抗性。

【0045】「**難治性**」癌症為即使向癌症患者投與抗腫瘤劑(諸如化療)亦進展之癌症。

【0046】「**復發性**」癌症為在對初始療法反應之後在初始部位或遠處部位處重新生長的癌症。

【0047】術語「**計畫性細胞死亡1配位體1**」及「**PD-L1**」係指在結合至PD-1後，下調T-細胞活化及細胞介素分

泌之兩種細胞表面醣蛋白配位體PD-1中之一者(另一者為PD-L2)。如本文使用之術語「PD-L1」包括人類PD-L1(hPD-L1)、hPD-1之天然存在之變異體及同功型、及hPD-L1之物種同源物。成熟hPD-L1序列作為SEQ ID NO:6來提供。

【0048】術語「**PD-L1陰性腫瘤**」係指不在細胞表面上顯著表現PD-L1的腫瘤。存在或不存在PD-L1可例如使用免疫組織化學來確定，可使用腫瘤比例評分(TPS)來定量。TPS(%)等於[PD-L1-染色之腫瘤細胞之數目/活腫瘤細胞之總數] x 100。因此，PD-L1陰性腫瘤可為具有少於5%或少於1%之TPS評分的腫瘤。

【0049】術語「**PD-1/PD-L1拮抗劑**」係指擾亂PD-1/PD-L1信號傳導途徑之部分。在一些實施例中，拮抗劑藉由結合至PD-1及/或PD-L1來抑制PD-1/PD-L1信號傳導途徑。在一些實施例中，PD-1/PD-L1拮抗劑亦結合至PD-L2。在一些實施例中，PD-1/PD-L1拮抗劑阻斷PD-1結合至PD-L1及視情況PD-L2。非限定性例示性PD-1/PD-L1拮抗劑包括PD-1拮抗劑，諸如結合至PD-1之抗體(例如，納武單抗(nivolumab)及帕姆單抗(pembrolizumab))；PD-L1拮抗劑，諸如結合至PD-L1之抗體(例如，阿特珠單抗(atezolizumab)、度伐魯單抗(durvalumab)及阿維魯單抗(avelumab))；融合蛋白，諸如AMP-224；及肽，諸如AUR-012。

【0050】「**抗血管生成劑**」或「**血管生成抑制劑**」係

指直接或間接地抑制血管生成、血管發生、或不當血管滲透性之劑，諸如小分子量物質、聚核苷酸(包括，例如，抑制性RNA(RNAi或siRNA))、多肽、分離蛋白、重組蛋白、抗體、或其結合物或融合蛋白。應瞭解，抗血管生成劑包括結合併阻斷血管生成因子或其受體之血管生成活性的彼等劑。例如，抗血管生成劑為血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如，VEGF-A(例如，貝伐單抗(Avastin®))或VEGF-A受體(例如，KDR受體或Flt-1受體)之抗體、抗-PDGFR抑制劑諸如Gleevec®(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate))、阻斷VEGF受體信號傳導之小分子(例如，PTK787/ZK2284、SU6668、Sutent®/SU11248(蘋果酸舒尼替尼(sunitinib malate))、AMG706、或在例如國際專利申請案WO2004/113304中描述之彼等)。抗血管生成劑亦包括原生血管生成抑制劑，例如，血管抑素、內皮抑素等。參見，例如，Klagsbrun及D'Amore(1991)*Annu.Rev. Physiol.* 53:217-39；Streit及Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (例如，列出惡性黑素瘤中之抗血管生成療法的表3)；Ferrara及Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364；Tonini 等人(2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (例如，列出已知抗血管生成因子之表2)；Sato (2003) *Int. J. Clin.Oncol.* 8:200-206 (例如，列出用於臨床試驗中之抗血管生成劑的表1)，及 Jayson (2016) *Lancet* 338(10043):518-529。

【0051】術語「**醫藥組成物**」係指以下製劑：其呈允許活性成分之生物活性有效的形式，且不含對將投與調配

物之個體具有不可接受毒性的另外組分。調配物可為無菌的。醫藥組成物可含有「**醫藥載劑**」，其係指在所使用之劑量及濃度下對於接受者無毒並且與調配物之其他成分相容的載劑。醫藥學上可接受之載劑應適於所用調配物。例如，若靜脈內投與治療劑，則載劑理想地不刺激皮膚並且不導致注射位點反應。

【0052】在用於限定數值或數字範圍時，如本文使用之術語「**大約**」及「**近似**」指示在值或範圍5%至10%以上及5%至10%以下之偏差仍然在所列值或範圍之規定含義內。

【0053】本文提供之任何組合物或方法可以與本文提供之任何其他組合物及方法中之一或多者組合。

2. CD80胞外域Fc融合蛋白

【0054】本文提供方法投與包含CD80 ECD及Fc域之CD80 ECD融合蛋白(「CD80 ECD Fc融合蛋白」)。例示性CD80 ECD融合蛋白提供於例如以全文引用方式併入本文之WO2017/079117中。

【0055】CD80 ECD可為例如人類CD80 ECD。在某些態樣中，人類CD80 ECD包含在SEQ ID NO:1中所示之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成、或由該胺基酸序列組成。

【0056】Fc域可為IgG之Fc域。Fc域可人類免疫球蛋白之Fc域。在某些態樣中，Fc域為人類IgG Fc域。在某些

態樣中，Fc域為人類IgG1 Fc域。在某些態樣中，人類IgG1 Fc域包含在SEQ ID NO:4中所示之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成、或由該胺基酸序列組成。

【0057】CD80 ECD及Fc域可直接連接以使得Fc域之N端胺基酸直接在胺基酸CD80 ECD之C端之後。在某些態樣中，CD80 ECD及Fc域自編碼CD80 ECD及Fc域兩者之編碼序列轉譯為單一多肽。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成、或由該胺基酸序列組成。

【0058】CD80 ECD Fc融合蛋白可取決於其製造方法而具有不同水準之特定糖基化修飾。例如，CD80 ECD Fc融合蛋白可唾液酸化並且可具有不同量之唾液酸(SA)殘基。

【0059】在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含10至60個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含15至60個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含10至40個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含

15至30個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含15至25個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含20至40個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含20至30個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含30至40個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含10、15、20、25、30、35、或40個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含至少15個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含至少20個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含至少25個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含至少30個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含至少35個SA分子。在某些態樣中，CD80 ECD Fc融合蛋

白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)包含至少40個SA分子。

3. 含有CD80胞外域Fc融合蛋白之醫藥組成物

【0060】本文提供投與醫藥組成物之方法，該等醫藥組成物包含例如在生理上可接受之載劑、賦形劑、或穩定劑中具有所需純度之CD80 ECD Fc融合蛋白(Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)。可接受之載劑、賦形劑、或穩定劑在所使用之劑量及濃度下對於接受者無毒。(參見例如Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 第20版 (2003); Ansel等人, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第7版, Lippencott Williams及Wilkins (2004); Kibbe等人, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, Pharmaceutical Press (2000))。有待用於活體內投與之組合物可為無菌的。此可藉由經例如無菌過濾膜過濾來輕易達成。

【0061】在某些態樣中，包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)之醫藥組成物經調配用於靜脈內投與。

【0062】在某些態樣中，醫藥組成物包含70mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含42mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類

CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含21mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含7mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含2.1mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含0.7mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含0.21mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含0.07mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。

【0063】在某些態樣中，醫藥組成物包含0.07至70mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。在某些態樣中，醫藥組成物包含7至70mg之CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)。

【0064】在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80

ECD Fc融合蛋白 10至60莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白15至60莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白10至40莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白15至30莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白15至25莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白20至40莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白20至30莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白30至40莫耳之SA。在

某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白10、15、20、25、30、35、或40莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白至少15莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白至少20莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白至少25莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白至少30莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白至少35莫耳之SA。在某些態樣中，醫藥組成物包含CD80 ECD Fc融合蛋白(例如，包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc域，或包含SEQ ID NO:5)，該等融合蛋白包含每莫耳CD80 ECD Fc融合蛋白至少40莫耳之SA。

4. CD80胞外域Fc融合蛋白之方法及用途

【0065】本文提供用於治療PD-L1陰性腫瘤(例如，在人類中)之方法，其包含向有需要之個體投與CD80 ECD Fc融合蛋白、或其醫藥組成物。CD80 ECD Fc融合蛋白可包含人類CD80之胞外域及人類IgG1之Fc域。在一些實施例中，CD80 ECD Fc融合蛋白包含序列SEQ ID NO:5。

【0066】存在或不存在PD-L1可使用能夠偵測PD-L1蛋白之劑，諸如抗-PD-L1抗體來確定。因此，在一些實施例中，可藉由使用此劑使腫瘤樣品經受西方墨點法、螢光活化細胞分選(FACS)、或免疫組織化學(IHC)來將腫瘤鑑別為PD-L1陰性腫瘤。

【0067】在一些實施例中，IHC可用於使用例如腫瘤比例評分(TPS)來將腫瘤樣品中之PD-L1之量定量。TPS(%)等於[PD-L1-染色之腫瘤細胞之數目/活腫瘤細胞之總數] x 100。如本文提供，PD-L1陰性腫瘤可為具有少於5%之TPS評分的腫瘤。如本文提供，PD-L1陰性腫瘤可為具有少於1%之TPS評分的腫瘤。

【0068】存在或不存在PD-L1可使用能夠偵測PD-L1 mRNA之劑來確定。因此，在一些實施例中，可藉由使腫瘤樣品經受定量反轉錄酶(RT)-聚合酶鏈反應(PCR)、RNA-Seq、或微陣列來將腫瘤鑑別為PD-L1陰性腫瘤。

【0069】在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約70mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週

一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約42mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約21mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約7mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約2.1mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約0.7mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約0.21mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約0.07mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。

【0070】在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與70mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一

次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與42mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與21mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與7mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與2.1mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與0.7mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與0.21mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與0.07mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。

【0071】在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約0.07mg至約70mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，

例如，每三週一次。在一態樣中，治療患者之PD-L1陰性腫瘤之方法包含向患者投與約7mg至約70mg之CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)，例如，每三週一次。

【0072】根據本文提供的方法，CD80 ECD融合蛋白(例如，包含在SEQ ID NO:5中所示之胺基酸序列)可靜脈內投與。

【0073】根據本文提供的方法，PD-L1陰性腫瘤可為例如實體腫瘤，包括例如晚期或轉移性實體腫瘤。在某些情況下，PD-L1陰性腫瘤並非原發性中樞神經系統腫瘤。

【0074】在某些情況下，PD-L1陰性腫瘤為腎細胞癌。

【0075】在某些情況下，PD-L1陰性腫瘤為黑素瘤。

【0076】在某些情況下，PD-L1陰性腫瘤為結直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、黑素瘤、頭頸鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌、及子宮內膜癌。

【0077】待根據本文提供之方法來治療之患者可已接受使用至少一種選自PD-1拮抗劑及PD-L1拮抗劑之PD-1/PD-L1拮抗劑的先前療法。PD-1/PD-L1拮抗劑可為例如納武單抗、帕姆單抗、阿特珠單抗、度伐魯單抗、或阿維魯單抗。PD-1/PDL-1拮抗劑可係在晚期或轉移性情形中投與。在一些實施例中，腫瘤對於此治療無反應或在此治療期間或之後復發。在其他情況下，待根據本文提供之方法

來治療之患者未接受使用PD-1/PDL-1拮抗劑之先前療法。

【0078】待根據本文提供之方法來治療之患者可接受使用抗血管生成劑之先前療法。抗血管生成劑可為例如舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、阿西替尼、替沃紫尼、雷莫昔單抗、或貝伐單抗。抗血管生成劑可係在晚期或轉移性情形中投與。

【0079】待根據本文提供之方法來治療之患者，例如患有黑素瘤之患者可具有BRAF突變。患者可接受使用BRAF抑制劑之先前療法。BRAF抑制劑可為例如維莫非尼及達拉菲尼。BRAF抑制劑可係在晚期或轉移性情形中投與。

【0080】待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可在選自手術、化學療法、輻射療法、及其組合之療法之後復發或進展。

【0081】待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可對於PD-1/PD-L1拮抗劑，諸如納武單抗、帕姆單抗、阿特珠單抗、度伐魯單抗、或阿維魯單抗具有抗性或無反應。待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可對於抗血管生成劑，諸如舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、阿西替尼、替沃紫尼、雷莫昔單抗、或貝伐單抗具有抗性或無反應。待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可對於BRAF抑制劑，諸如維莫非尼或達拉菲尼具有抗性或無反應。

【0082】待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可對於PD-1/PD-L1拮抗劑，諸如納武單抗、帕姆單抗、阿特珠單

抗、度伐魯單抗、或阿維魯單抗而言為難治性的。待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可對於抗血管生成劑，諸如舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、阿西替尼、替沃紫尼、雷莫昔單抗、或貝伐單抗而言為難治性的。待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可對於BRAF抑制劑，諸如維莫非尼或達拉菲尼而言為難治性的。

【0083】待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可在使用PD-1/PD-L1拮抗劑，諸如納武單抗、帕姆單抗、阿特珠單抗、度伐魯單抗、或阿維魯單抗之治療之後復發。待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可在使用抗血管生成劑，諸如舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、阿西替尼、替沃紫尼、雷莫昔單抗、或貝伐單抗之治療之後復發。待根據本文提供之方法來治療之腫瘤可在使用BRAF抑制劑，諸如維莫非尼或達拉菲尼之治療之後復發。

實例

【0084】以下論述之實例僅意欲示範本發明且不應視為以任何方式限制本發明。實例不意欲表示以下實驗為進行之全部或僅有實驗。已努力確保關於所用數值(例如量、溫度等)之準確性，但應考慮一些實驗誤差及偏差。除非另外指示，否則份數為重量份數，分子量為重量平均分子量，溫度以攝氏度計，且壓力為大氣壓或接近大氣壓。

實例 1：鼠科 CD80 ECD 融合分子 (mCD80-Fc) 不接合 PD-L1

【0085】來自 BALB/c 及 C57B1/6 品系兩者之成年鼠科脾細胞用於確定包含連接至小鼠 IgG2a 野生型 (mCD80-Fc) 之 Fc 域的鼠科 CD80 之胞外域 (ECD) 的小鼠替代融合蛋白是否可接合 CD80 配位體。

【0086】藉由一般技藝人士已知之方法，自成年 BALB/c 及 C56B1/6 小鼠製備小鼠脾細胞。脾細胞 ($2-4 \times 10^6$ 細胞/毫升) 藉由離心來球團化並且將培養基丟棄。添加各種濃度 (0-1000 $\mu\text{g/mL}$) 之 mCD80-Fc 並且在冰上培育 40 分鐘。將多聚甲醛 (4%) 添加至脾細胞並且在室溫下培育 10 分鐘。將脾細胞清洗並且藉由離心來球團化，隨後添加 FACS 緩衝液中之經生物素標記之抗小鼠 IgG，並且進一步在室溫下培育 20 分鐘。添加鏈黴親和素-Alexa488 及針對 CTLA-4、PD-L1、及 CD28 之抗體的混合物。Quantum Simply Cellular Bang 珠粒用於發展 mCD80-Fc 分子之標準曲線。在 BD LSRII 或 BD LSRFortessa 上獲得樣品之資料並且使用 FlowJo、Excel、及 Graphpad Prism 分析。

【0087】執行 FACS 分析來確定 mCD80-Fc 與 CD11b⁺ 樹突狀細胞、CD11b⁻ 樹突狀細胞、巨噬細胞、NK 細胞、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞之接合。圖 1A 展示在此實例中使用之閘控策略之實例。

【0088】圖 1B 證明 mCD80-Fc 以濃度依賴性方式結合至主要兩種類型之脾細胞中之 CD4⁺ T 細胞及 CD8⁺ T 細胞。然而，與 C57B1/6-衍生脾細胞相比，mCD80-Fc 結合更

大比例之來自BALB/c-衍生脾細胞之T細胞。另外，較小比例之mCD80-Fc結合至兩種類型之脾細胞中之巨噬細胞。因此，證明mCD80-Fc結合至CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、及巨噬細胞，但是不結合至CD11b⁺或CD11b⁻樹突狀細胞。

【0089】在所有免疫細胞測試上偵測到PD-L1，並且在巨噬細胞上具有最高表現。即使mCD80-Fc之濃度增加，游離PD-L1之量沒有變化，證明在mCD80-Fc與PD-L1之間沒有相互作用(圖1B)。

【0090】相比之下，CD4⁺及CD8⁺ T細胞為經評估的顯示CD28表現的唯獨免疫細胞。隨著mCD80-Fc之濃度增加，游離CD28之量顯著減少，證明mCD80-Fc結合至CD28(圖1B)。在所評估的任何免疫細胞類型上未偵測到CTLA-4。

【0091】此等結果證明mCD80-Fc主要經由CD28接合而非經由PD-L1接合來結合BALB/c及C57B1/6脾細胞之CD4⁺ T細胞及CD8⁺ T細胞。

實例2：人類CD80 ECD融合分子(hCD80-Fc)不接合PD-L1

【0092】針對人類CD80配位體之hCD80-Fc接合來評估中國倉鼠卵巢(「CHO」)細胞。CHO細胞經工程化以表現人類CTLA-4、PD-L1、CD28、或所有三種CD80配位體(亦即，CHO-CTLA4/PD-L1/CD28；「CHO-3」)。確定hCD80-Fc與配位體之接合的方案與在實例1中執行之方案

相同。

【0093】圖2A藉由流動式細胞測量術展示所有CHO細胞株中之CD80配位體表現。展示代表性交錯直方圖，並且確定每個細胞之Ab結合位點之數目的抗體結合能力(ABC)值在條形圖右側列舉。圖2B展示hCD80-Fc以濃度依賴性方式結合CHO-CTLA4、CHO-CD28、及CHO-3細胞，並且hCD80-Fc以低至0.5 $\mu\text{g/mL}$ 結合至CD80配位體。另外，hCD80-Fc結合至CD80配位體造成相應細胞株中之游離CTLA-4及CD28減少(圖2B)。然而，hCD80-Fc不結合至CHO-PD-L1或母體CHO細胞，證明hCD80-Fc不接合PD-L1。

【0094】此等結果展示hCD80-Fc接合CTLA-4及CD28，而不接合PD-L1。相對於CHO-3細胞株，hCD80-Fc以與在單獨表現CHO細胞株中類似之水準結合CTLA-4及CD28兩者。

【0095】針對B細胞(CD19+)、單核球(CD14+)、NK細胞(CD56+)、及T細胞(CD3+CD4+或CD3+CD8+)上之hCD80-Fc接合來評估人類PBMC。圖3A展示此研究之示例性FACS閘控策略。

【0096】在T細胞及單核球上偵測到PD-L1，但是在CD4+及CD8+ T細胞上主要偵測到CD28。圖3B展示hCD80-Fc以濃度依賴性方式結合至CD4+及CD8+ T細胞兩者，並且顯著偵測到低至100 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度的結合藥物。hCD80-Fc之結合揭示CD4+及CD8+ T細胞上之游離CD28減少，但

是未偵測到T細胞或單核球上之PD-L1水準之變化。在所評估的任何免疫細胞類型上未偵測到CTLA-4。因此，此等結果證明hCD80-Fc主要經由CD28接合來結合人類PBMC之CD4+及CD8+ T細胞。

【0097】針對CTLA-4、PD-L1、及CD28之hCD80-Fc接合來評估人類活體外-擴增之CD4+Teff及CD4+Treg。人類活體外-擴增之CD4+Teff及CD4+Treg已經證明表現CTLA-4、PD-L1、及CD28(圖4A)。hCD80-Fc以濃度依賴性方式結合CD4+Teff及Treg兩者，並且偵測到低至50 $\mu\text{g/mL}$ 之hCD80-Fc結合並且飽和結合為大約400 $\mu\text{g/mL}$ (圖4B)。此結合僅在CD4+Treg中造成游離CTLA-4之趨勢減少，同時偵測到CD4+Teff及Treg細胞上之游離CD28減少(圖4B)。甚至在暴露於遞增濃度之hCD80-Fc時，游離PD-L1水準不變化(圖4B)。此資料證明hCD80-Fc接合CD4+Teff及CD4+Treg細胞上之CTLA-4及CD28兩者

實例3：mCD80-Fc抑制CT26同基因小鼠模型中之不表現PD-L1之腫瘤之生長

【0098】實例1及2之資料證明CD80不與PD-L1接合。因此，為了確定PD-L1接合是否為mCD80-Fc發揮其抗腫瘤活性所需要，將CT26PD-L1剔除腫瘤細胞用於活體內同基因小鼠模型中。不同於異種移植物模型，同基因小鼠模型具有功能性免疫系統並且因此可用於評估癌症免疫治療，其藉由控制內源性免疫反應來起作用。CT26為衍生自表

現高水準PD-L1之BALB/c小鼠的鼠科結直腸癌。在此項研究中，使用不表現PD-L1之遺傳工程化CT26腫瘤(CT26 PD-L1 KO)。將具有免疫能力之BALB/c小鼠用CT26 PD-L1 KO腫瘤細胞接種。將小鼠安置於藉由以下各者來治療之三個組中：(1)小鼠IgG2a(對照)；(2) mCD80-Fc；或(3)未治療對照。小鼠在第4天、第7天、及第11天(接種後天數)藉由靜脈內注射用0.3mg/kg小鼠IgG2a(組1)或0.3mg/kg mCD80-Fc(組2)治療。見表1。在治療開始時，平均腫瘤尺寸為90 mm³。研究在第21天結束。

表 1

組	處理	給藥 (mg/kg，時程，途徑)	小鼠 (n)
1	小鼠 IgG2a	在 D4、D7、D11，0.3 mg/kg，200 μL IV	15
2	mCD80-Fc	在 D4、D7、D11，0.3 mg/kg，200 μL IV	15
3	n/a	n/a	15

【0099】圖5展示平均腫瘤體積在mIgG2a及未治療對照組中增加，但是mCD80-Fc組展示腫瘤生長之顯著抑制(相對於小鼠IgG2a對照，p=0.0004；相對於未治療組，p<0.0001)。另外，未偵測到來自mIgG2a或mCD80-Fc治療之不良影響，包括體重變化(資料未展示)。此等資料提供活體內證明：mCD80-Fc治療意外地不取決於腫瘤細胞上之PD-L1表現。

* * *

【0100】本發明在範疇上不受本文所述之具體實施例的限制。實際上，除本文所述之修改外，熟習此項技術者亦將由以上描述及隨附圖式而顯而易知本發明之各種修

改。此類修改意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇。

【0101】本文引用之所有參考文獻(例如，公開案或專利或專利申請案)全部以引用方式並且出於所有目的併入本文中，該引用之程度就如同已明確且個別地指示將各個別參考文獻(例如，公開案或專利或專利申請案)出於所有目的全部以引用方式併入本文一般。

【0102】其他實施例在以下申請專利範圍內。

序列表

【0103】下表提供在本文中提及之某些序列之列表。

SEQ.ID. NO.	描述	序列
1	人類 CD80 ECD 序列(沒有信號序列)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQ KEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLS IVILALRPSDEGTYECVVLYEKDAFKREHLAEV TLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPH LSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDF NMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEH FPDN
2	小鼠 CD80 ECD 序列(沒有信號序列)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYW QKHDKVVL SVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTY SLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLAL VKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFP KPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLD FNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPP DSKN
3	Fc 人類 IgG1	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4	小鼠 CD80 ECD 小鼠 Fc IgG2a (Fc 部分 加下劃線)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYW QKHDKVVLSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTY SLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLAL VKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFP KPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLD FNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPP DSKNEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK <u>IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFFVN</u> <u>NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW</u> <u>MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ</u> <u>VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVE</u> <u>WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV</u> <u>EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP</u> <u>GK</u>
5	人類 CD80 ECD 人類 Fc IgG1 WT (Fc 部分加下劃 線)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQ KEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLS IVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEV TLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPH LSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDF NMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEH FPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>
6	人類 PD-L1 (成熟，沒有信 號序列)	FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTSLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

【序列表】

<110> 戊瑞治療有限公司(FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.)
<120> 用於治療 PD-L1 陰性腫瘤之 CD80 胞外結構域 Fc 融合蛋白
<140> TW109105614
<141> 2020-02-21

<150> US 62/815,249
<151> 2019-03-07

<150> US 62/809,319
<151> 2019-02-22

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 208
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人類 CD80 ECD 序列(沒有信號序列)

<400> 1

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> 2
<211> 209
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 小鼠 CD80 ECD 序列(沒有信號序列)

<400> 2

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

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

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

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

Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr

65

70

75

80

Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His

859095

Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn

100105110

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

115120125

Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn

130135140

Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu

145150155160

Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg

165170175

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

180185190

Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys

195200205

Asn

<210> 3
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Fc 人類 IgG1

<400> 3

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

151015

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

202530

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> 4

<211> 442<212> PRT<213> 人工序列(Artificial Sequence)<220><223> 小鼠 CD80 ECD 小鼠 Fc IgG2a<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu	Asp	Phe	Thr	Trp	Glu	Lys	Pro	Pro	Glu	Asp	Pro	Pro	Asp	Ser	Lys
		195					200					205			
Asn	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
225					230					235					240
Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys
				245					250					255	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp
			260					265					270		
Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg
		275					280					285			
Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln
	290					295					300				
His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn
305					310					315					320
Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly
				325					330					335	
Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu
			340					345					350		
Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met
		355					360					365			
Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu
	370					375					380				
Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe
385					390					395					400
Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn

				405					410					415			
Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr		
			420					425					430				
Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys								
		435					440										
<210> 5																	
<211> 440																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)																	
<220>																	
<223> 人類 CD80 ECD 人類 Fc IgG1 WT																	
<400> 5																	
Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys		
1				5					10					15			
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp		
			20					25					30				
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn		
		35					40					45					
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn		
	50					55					60						
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr		
65				70					75						80		
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His		
				85					90					95			
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser		
			100					105					110				
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys		
		115					120					125					
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn		
	130					135					140						

Gly 145	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala 150	Ile	Asn	Thr	Thr	Val 155	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu 160
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala 165	Val	Ser	Ser	Lys	Leu 170	Asp	Phe	Asn	Met	Thr 175	Thr
Asn	His	Ser	Phe 180	Met	Cys	Leu	Ile	Lys 185	Tyr	Gly	His	Leu	Arg 190	Val	Asn
Gln	Thr	Phe 195	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr 200	Lys	Gln	Glu	His	Phe 205	Pro	Asp	Asn
Glu	Pro 210	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys 215	Thr	His	Thr	Cys	Pro 220	Pro	Cys	Pro	Ala
Pro 225	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly 230	Pro	Ser	Val	Phe	Leu 235	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 240
Lys	Asp	Thr	Leu	Met 245	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro 250	Glu	Val	Thr	Cys	Val 255	Val
Val	Asp	Val	Ser 260	His	Glu	Asp	Pro	Glu 265	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 270	Tyr	Val
Asp	Gly	Val 275	Glu	Val	His	Asn	Ala 280	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 285	Glu	Glu	Gln
Tyr 290	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 295	Val	Ser	Val	Leu	Thr 300	Val	Leu	His	Gln
Asp 305	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 310	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 315	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 320
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 325	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 330	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln 335	Pro
Arg	Glu	Pro	Gln 340	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 345	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 350	Leu	Thr
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser

355
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 6
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人類 PD-L1 (成熟，沒有信號序列)
 <400> 6
 Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45
 Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60
 Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95

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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療個體之PD-L1陰性腫瘤之方法，該方法包括向該個體投與包含CD80胞外結構域(ECD)融合分子之組成物。

【請求項2】如請求項1之方法，其中在該投與之前，該腫瘤已經確定為PD-L1陰性的。

【請求項3】如請求項1之方法，其進一步包括在該投與之前，確定該腫瘤為PD-L1陰性的。

【請求項4】一種選擇患有腫瘤之個體以使用包含CD80 ECD融合分子之組成物來治療的方法，該方法包括確定自該個體獲得之腫瘤樣品是否為PD-L1陰性的，及若該腫瘤樣品經確定為PD-L1陰性的，則選擇該個體來用該組成物治療。

【請求項5】一種用於治療個體之PD-L1陰性癌症腫瘤的包含CD80 ECD融合分子之組成物。

【請求項6】如請求項5之所使用之組成物，其中藉由確定自該個體獲得之腫瘤樣品為PD-L1陰性，選擇該個體來治療。

【請求項7】一種用於治療個體之腫瘤的包含CD80 ECD融合分子之組成物，其中該腫瘤已經確定為PD-L1陰性的。

【請求項8】一種用於鑑別患有對使用包含CD80 ECD融合分子之組成物之治療作出反應之腫瘤的個體之活體外方法，該方法包括確定自該個體獲得之腫瘤樣品是否為

PD-L1陰性，其中若該腫瘤樣品經確定為PD-L1陰性的，則該個體經鑑別為對使用CD80 ECD融合分子之治療作出反應。

【請求項9】一種至少一種能夠確定腫瘤樣品為PD-L1陰性之劑用於鑑別患有對使用包含CD80 ECD融合分子之組成物之治療作出反應之腫瘤的個體之活體外用途。

【請求項10】如請求項2至4及6至9中任一項之方法、組成物或用途，其中該腫瘤使用能夠偵測PD-L1蛋白之劑已確定或經確定為PD-L1陰性的，視情況其中該劑為特異性結合至PD-L1蛋白之抗體。

【請求項11】如請求項10之方法、組成物或用途，其中該腫瘤藉由西方墨點法(Western blot)已確定或經確定為PD-L1陰性的。

【請求項12】如請求項10之方法、組成物或用途，其中該腫瘤藉由螢光活化細胞分選(FACS)已確定或經確定為PD-L1陰性的。

【請求項13】如請求項10之方法、組成物或用途，其中該腫瘤藉由免疫組織化學(IHC)已確定或經確定為PD-L1陰性的，視情況其中該樣品為石蠟包埋樣品。

【請求項14】如請求項2至4及6至9中任一項之方法、組成物或用途，其中該腫瘤使用能夠偵測PD-L1 mRNA之劑已確定或經確定為PD-L1陰性的。

【請求項15】如請求項14之方法、組成物或用途，其中該腫瘤藉由定量反轉錄酶(RT)-聚合酶鏈反應(PCR)已確

定或經確定為PD-L1陰性的。

【請求項16】如請求項14之方法、組成物或用途，其中該腫瘤使用RNA-Seq已確定或經確定為PD-L1陰性的。

【請求項17】如請求項14之方法、組成物或用途，其中該腫瘤使用微陣列已確定或經確定為PD-L1陰性的。

【請求項18】如請求項1至17中任一項之方法、組成物或用途，其中該腫瘤為實體腫瘤。

【請求項19】如請求項1至18中任一項之方法、組成物或用途，其中該個體患有選自由以下組成之群的癌症：結直腸癌、乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、黑素瘤、頭頸鱗狀細胞癌、卵巢癌、胰臟癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌及子宮內膜癌。

【請求項20】如請求項1至19中任一項之方法、組成物或用途，其中該個體患有在由手術、化學療法、輻射療法或其組合組成之療法之後復發或進展的癌症。

【請求項21】如請求項1至20中任一項之方法、組成物或用途，其中該等CD80 ECD融合分子包含人類CD80 ECD及人類IgG1 Fc結構域。

【請求項22】如請求項1至21中任一項之方法、組成物或用途，其中該組成物包含唾液酸化CD80 ECD融合分子。

【請求項23】如請求項22之方法、組成物或用途，其中該等唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白至少15莫耳之唾液酸(SA)。

【請求項24】如請求項22之方法、組成物或用途，其中該等唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白15-60莫耳之SA。

【請求項25】如請求項22之方法、組成物或用途，其中該等唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白15-40莫耳之SA。

【請求項26】如請求項22之方法、組成物或用途，其中該等唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白15-30莫耳之SA。

【請求項27】如請求項22之方法、組成物或用途，其中該等唾液酸化CD80 ECD融合分子包含每莫耳融合蛋白20-30莫耳之SA。

【請求項28】如請求項1至27中任一項之方法、組成物或用途，其中該等CD80 ECD融合分子包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:1之人類CD80 ECD。

【請求項29】如請求項1至28中任一項之方法、組成物或用途，其中該等CD80 ECD融合分子包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:3之人類IgG1 Fc結構域。

【請求項30】如請求項1至29中任一項之方法、組成物或用途，其中人類IgG1之Fc結構域係連接至人類CD80之ECD之羧基末端。

【請求項31】如請求項1至30中任一項之方法、組成物或用途，其中該等CD80 ECD融合分子包含胺基酸序列SEQ ID NO:5。

【請求項32】如請求項1至31中任一項之方法、組成物或用途，其中該PD-L1陰性腫瘤具有少於5%或少於1%之TPS評分。

【請求項33】如請求項1至32中任一項之方法、組成物或用途，其中單獨該組成物不導致干擾素 γ 或TNF α 自活體外T-細胞中大量釋放。

【請求項34】如請求項1至33中任一項之方法、組成物或用途，其中與單獨TGN1412相比，單獨該組成物導致干擾素 γ 或TNF α 更少自活體外T-細胞中釋放。

【請求項35】如請求項34之方法、組成物或用途，其中與單獨TGN1412相比，單獨該組成物在誘導干擾素 γ 或TNF α 釋放方面之有效性小至少1000倍。

【請求項36】如請求項1至35中任一項之方法、組成物或用途，其中在投與0.3至0.6mg/kg之單一劑量之該組成物之後，該組成物能夠在至少一週、10天、兩週或三週之時段內在至少一種小鼠同基因癌症模型中實現至少90%腫瘤生長抑制。

【請求項37】如請求項36之方法、組成物或用途，其中該小鼠同基因癌症模型為CT26腫瘤模型。

【請求項38】如請求項1至37中任一項之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約0.07mg至約70mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項39】如請求項38之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約7.0mg至約70mg之該等CD80 ECD融合

分子。

【請求項40】如請求項39之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約70mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項41】如請求項39之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約42mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項42】如請求項39之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約21mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項43】如請求項39之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約7mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項44】如請求項38之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約2.1mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項45】如請求項38之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約0.7mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項46】如請求項38之方法、組成物或用途，其中該治療包含投與約0.21mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項47】如請求項38之方法、組成物、或用途，其中該治療包含投與約0.07mg之該等CD80 ECD融合分子。

【請求項48】如請求項1至47中任一項之方法、組成物或用途，其中該治療包含每三週投與一次。

【請求項49】如請求項1至48中任一項之方法、組成物、或用途，其中該治療包含靜脈內投與該等CD80 ECD融合分子。

【請求項50】如請求項1至49中任一項之方法、組成

物或用途，其中該個體未接受使用PD-1/PD-L1拮抗劑之先前療法。

【請求項51】如請求項1至50中任一項之方法、組成物或用途，其中該個體已接受使用至少一種抗血管生成劑之先前療法。

【請求項52】如請求項51之方法、組成物或用途，其中該抗血管生成劑為舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)、替沃紫尼(tivozanib)、雷莫昔單抗(ramucirumab)或貝伐單抗(bevacizumab)。

【請求項53】如請求項51或52之方法、組成物或用途，其中該抗血管生成劑係在晚期或轉移性情形中投與。

【請求項54】如請求項1至53中任一項之方法、組成物或用途，其中該個體患有具有BRAF突變之黑素瘤。

【請求項55】如請求項54之方法、組成物或用途，其中該個體已接受使用至少一種BRAF抑制劑之先前療法。

【請求項56】如請求項55之方法、組成物或用途，其中該BRAF抑制劑為維莫非尼(vemurafenib)或達拉菲尼(dabrafenib)。

【請求項57】如請求項55或56之方法、組成物或用途，其中該BRAF抑制劑係在晚期或轉移性情形中投與。

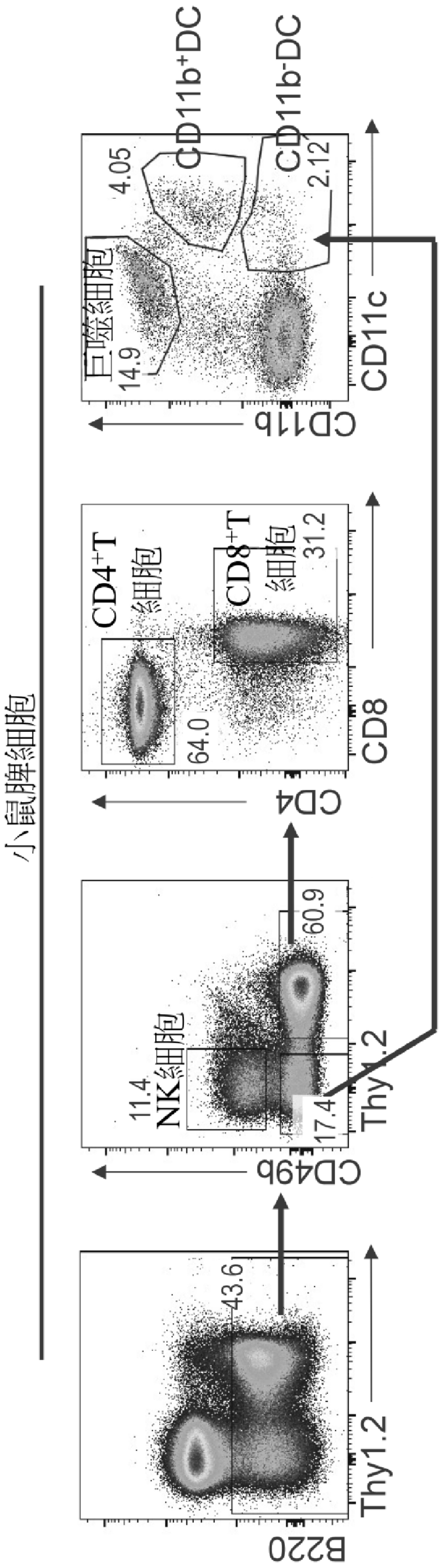
【請求項58】如請求項1至57中任一項之方法、組成物或用途，其中該腫瘤在選自手術、化學療法、輻射療法及其組合之療法之後復發或進展

【請求項 59】一種治療人類患者之 PD-L1 陰性腫瘤之方法，該方法包括向該患者投與包含約 0.07mg 至約 70mg 含有胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CD80 胞外結構域 (ECD) 融合分子的組成物。

【請求項 60】如請求項 59 之方法，其中在該投與之前，該腫瘤已藉由 IHC 確定為 PD-L1 陰性的。

【請求項 61】如請求項 59 或 60 之方法，其中該組成物包含唾液酸化 CD80 ECD 融合分子並且其中該等唾液酸化 CD80 ECD 融合分子包含每莫耳融合蛋白 15-60 莫耳之 SA。

【發明圖式】

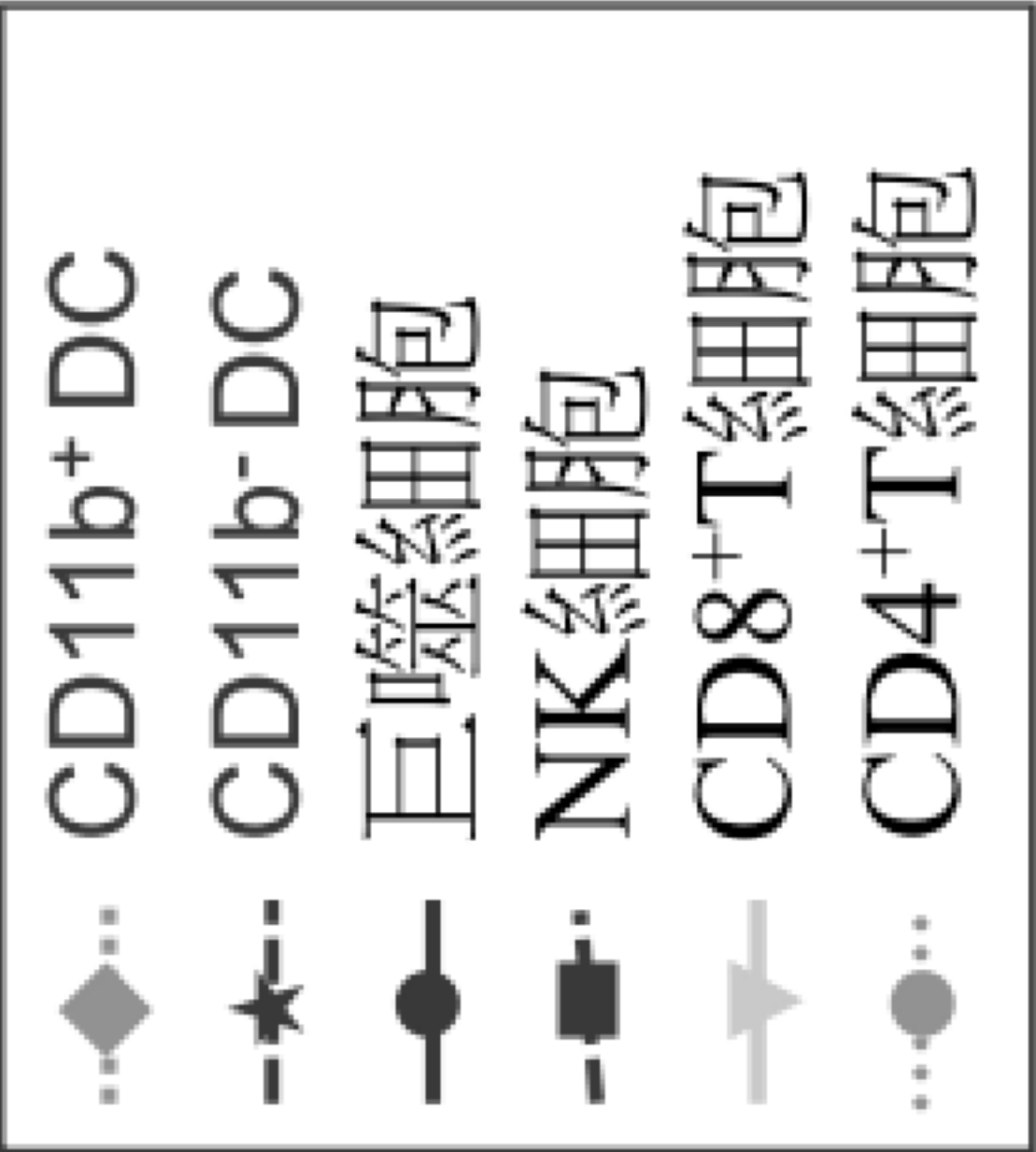
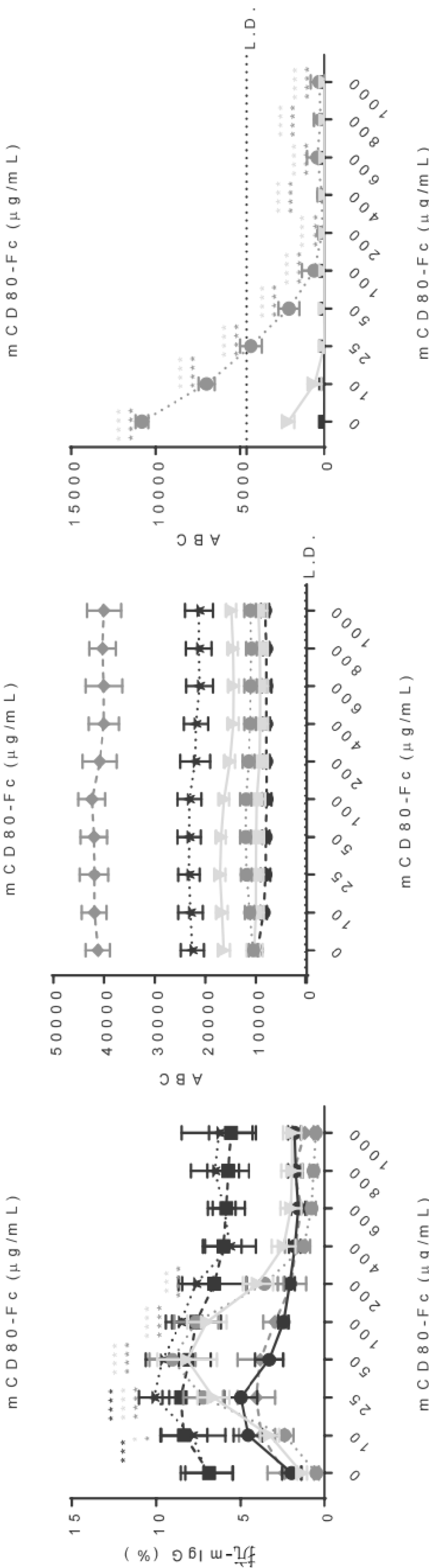
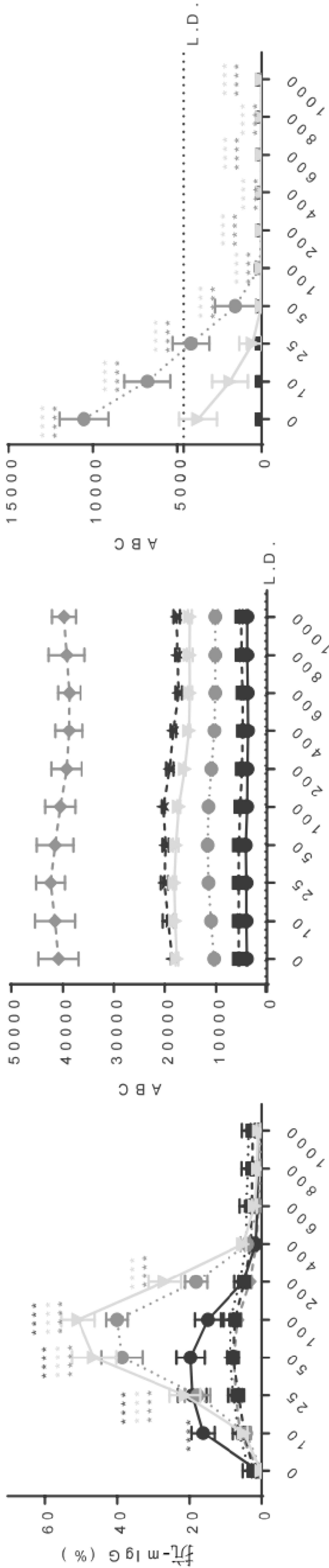


【圖 1A】

游離CD28

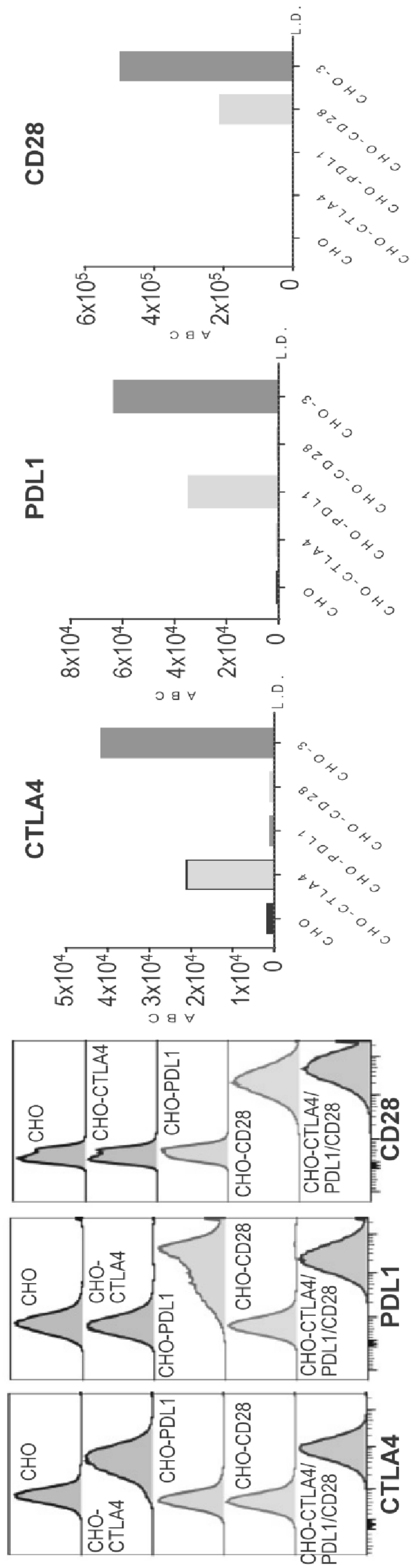
游離PDL1

結合藥物



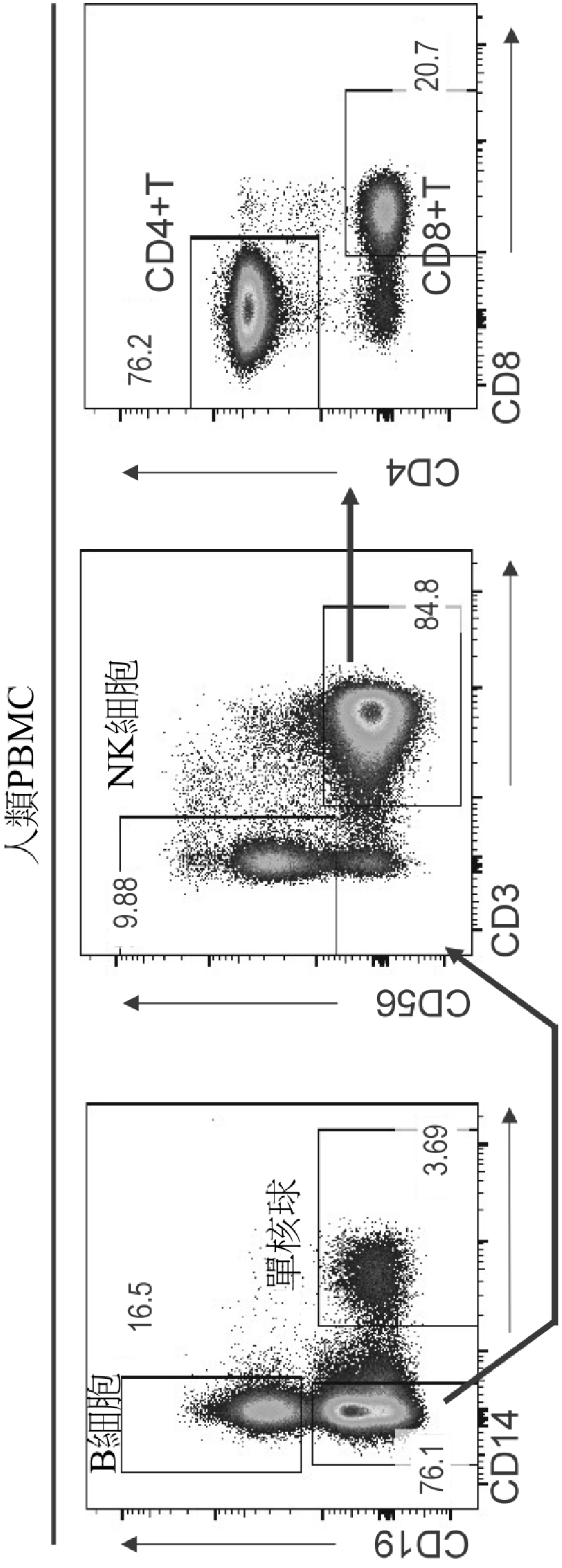
ABC = Ab結合能力
(每個細胞之Ab結合位點之數目) ; L.D. = 偵測極限

【圖 1B】

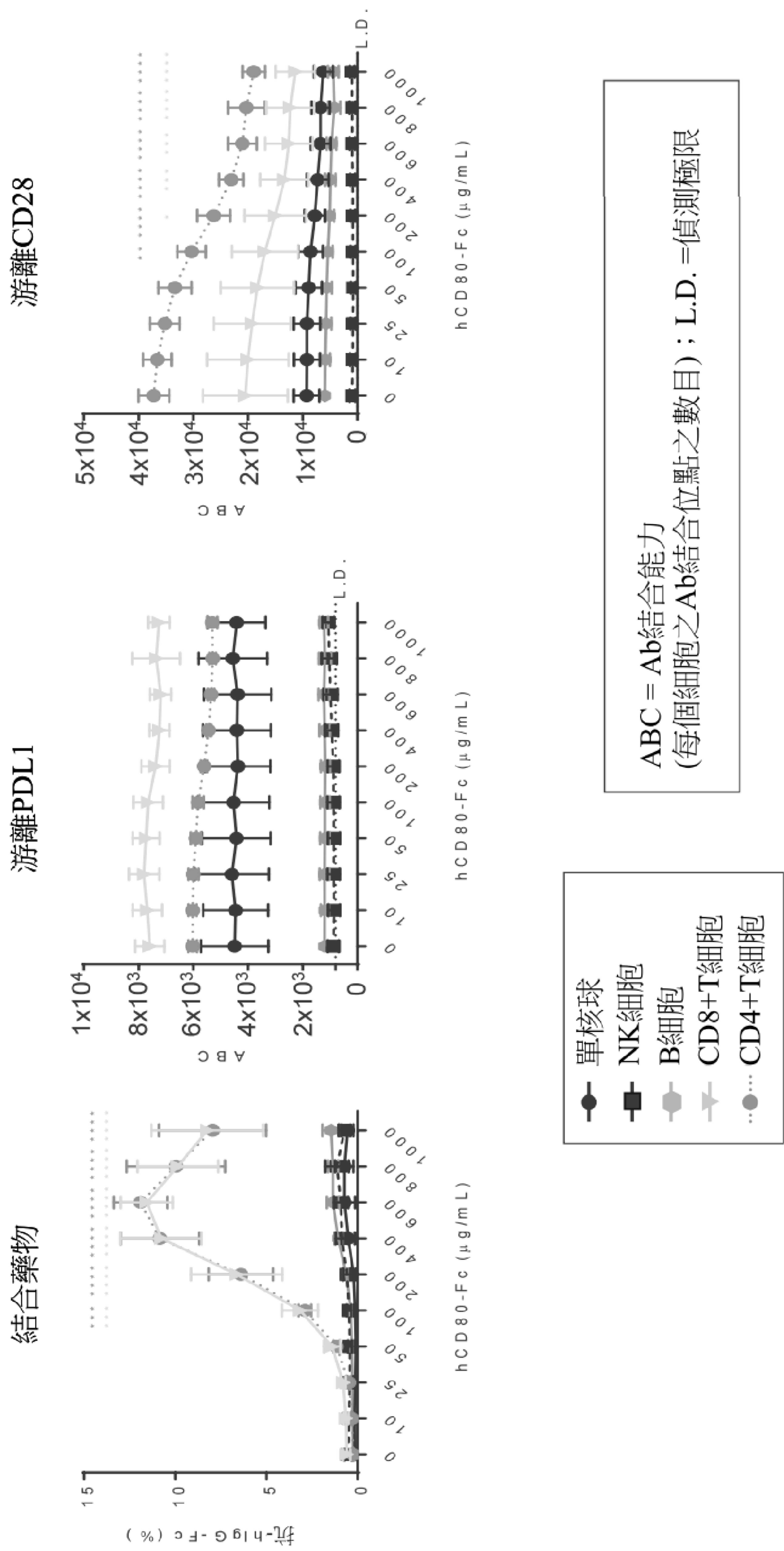


ABC = Ab結合能力
(每個細胞之Ab結合位點之數目)；L.D. = 偵測極限

【圖 2A】

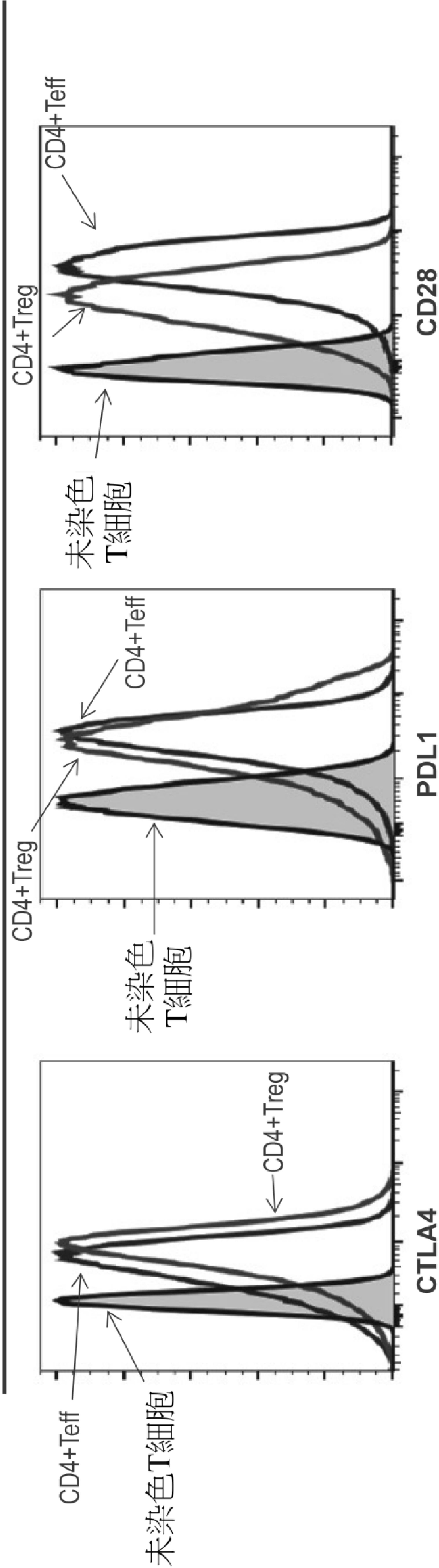


【圖 3A】

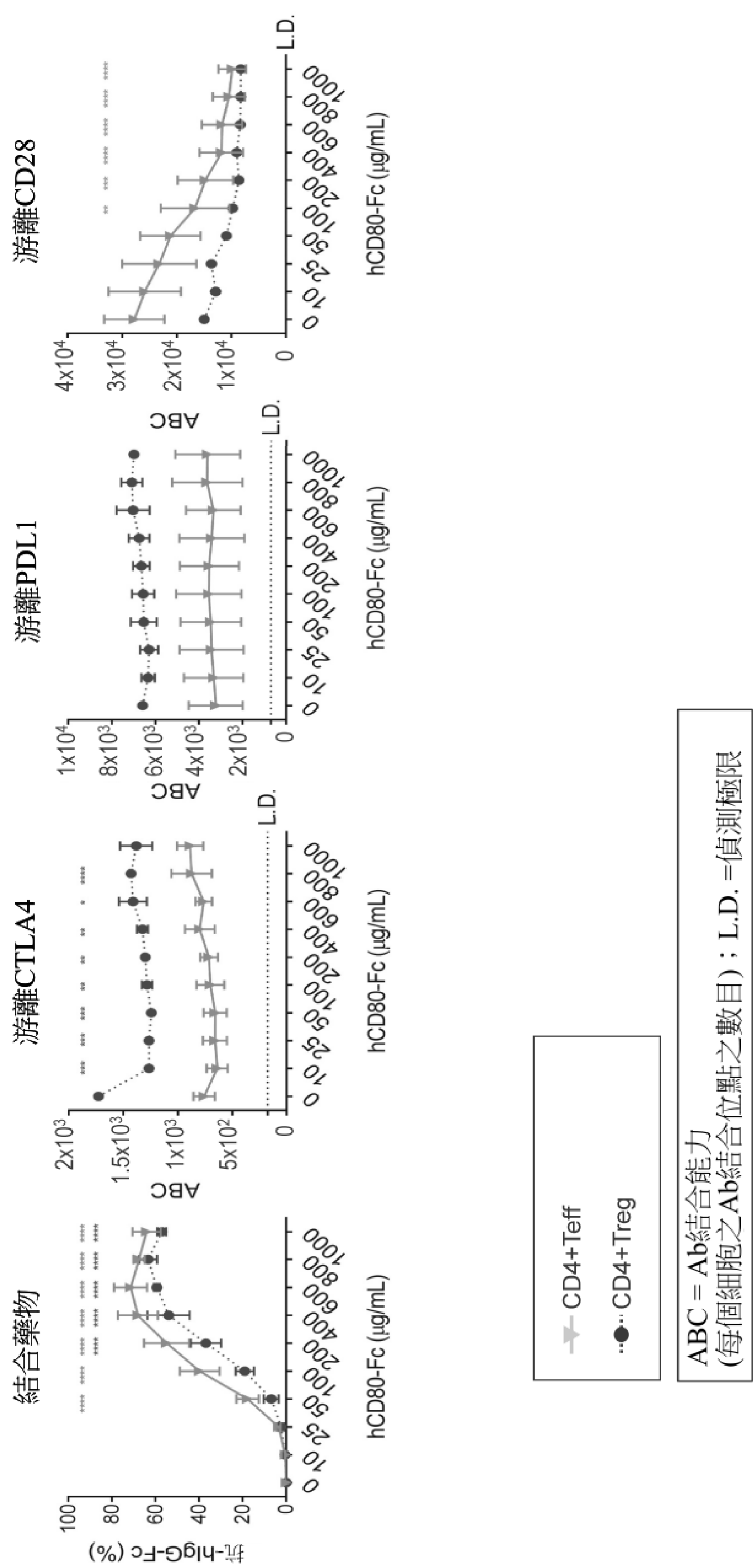


【圖 3B】

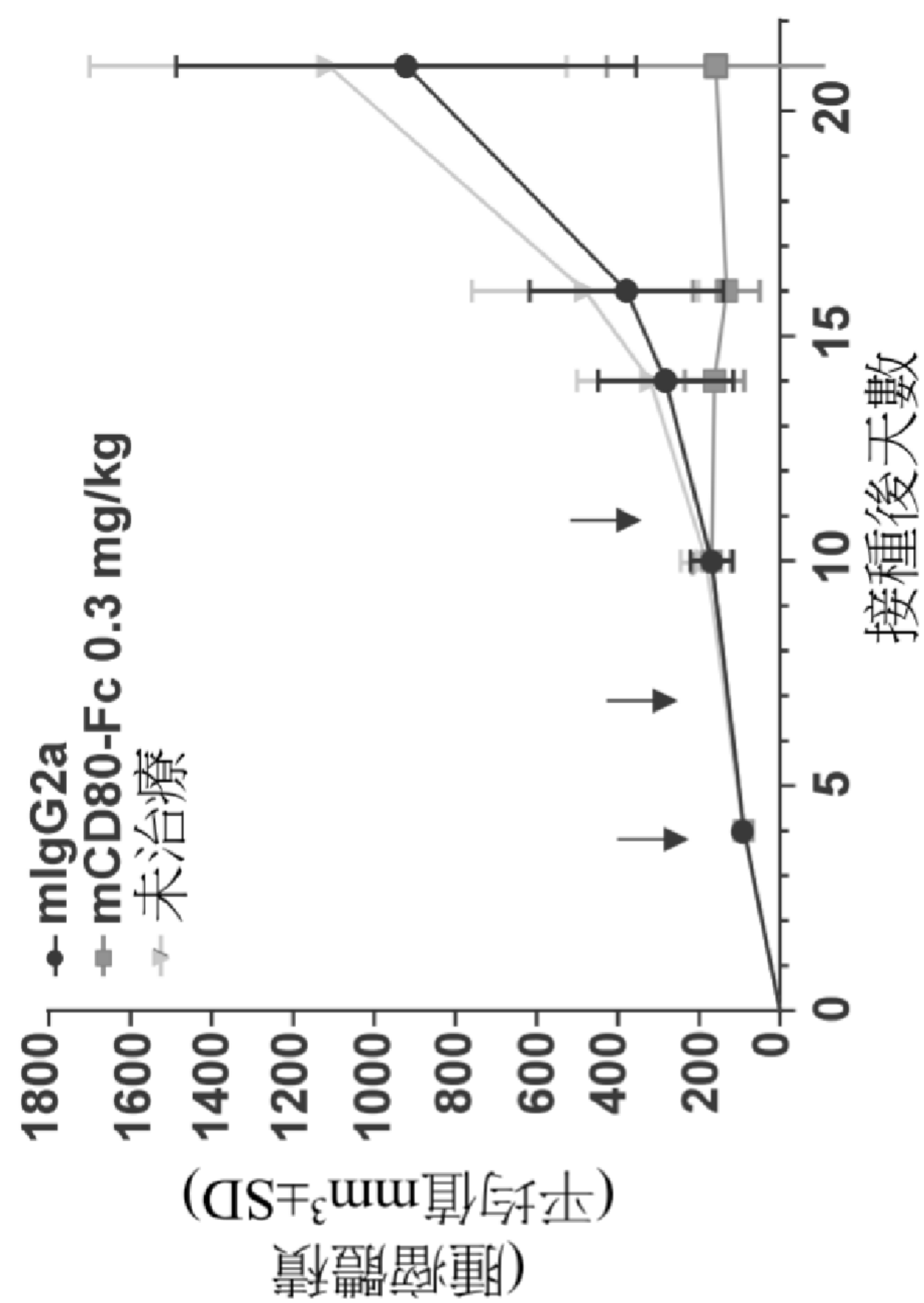
對於CD4+T細胞進行閘控



【圖 4A】



【圖 4B】



【圖 5】

