

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-511144

(P2020-511144A)

(43) 公表日 令和2年4月16日(2020.4.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 224 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-551357 (P2019-551357)  
 (86) (22) 出願日 平成30年3月13日 (2018. 3. 13)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月15日 (2019. 11. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/022267  
 (87) 国際公開番号 W02018/170023  
 (87) 国際公開日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)  
 (31) 優先権主張番号 62/472, 572  
 (32) 優先日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/475, 156  
 (32) 優先日 平成29年3月22日 (2017. 3. 22)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 517351857  
 アルパイン イミューン サイエンスズ  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 98119 ワシントン  
 州 シアトル エリオット アベニュー  
 ウェスト 201 스위트 230  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

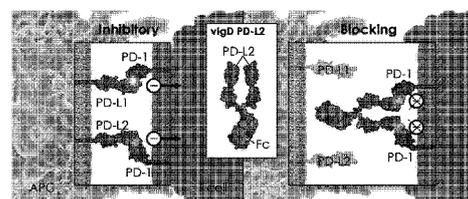
(54) 【発明の名称】 PD-L2バリエント免疫調節タンパク質及びその使用

(57) 【要約】

本明細書ではバリエントPD-L2及びそのようなタンパク質をコードする核酸を含む、免疫調節タンパク質を提供する。該免疫調節タンパク質は、多種多様な免疫学的及び腫瘍学的状態に対する治療の有用性を提供する。そのようなタンパク質を作製及び使用するための組成物及び方法を提供する。

【選択図】 図2

FIG. 2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

I g Vドメインもしくはその特異的結合断片、I g Cドメインもしくはその特異的結合断片、またはその両方を含むバリエーションPD-L2ポリペプチドであって、SEQ ID NO: 31の番号付けに基づいた15、89、82、67、2、12、13、18、23、24、28、31、32、33、36、37、39、44、45、46、47、48、58、59、65、69、71、72、73、74、75、76、77、85、86、または91から選択される位置(複数可)に対応する、非改変PD-L2またはその特異的結合断片の1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、前記バリエーションPD-L2ポリペプチド。

10

**【請求項 2】**

前記非改変PD-L2が、

(i) SEQ ID NO: 31に記載のアミノ酸の配列、

(ii) SEQ ID NO: 31に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸の配列、または

(iii) I g VドメインもしくはI g Cドメインもしくはその特異的結合断片または両方を含む、それらの一部分

を含む、請求項1に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

**【請求項 3】**

最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変、任意でアミノ酸置換、挿入、及び/または欠失を含む、請求項1または請求項2に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

20

**【請求項 4】**

SEQ ID NO: 31またはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記1つまたは複数のアミノ酸改変が、F2L、I12V、I13V、H15Q、N18D、C23S、N24D、N24S、G28V、V31A、V31M、N32D、L33P、L33H、L33F、I36V、T37A、S39I、E44D、E44V、N45S、D46E、T47A、S48C、E58G、E59G、K65R、S67L、H69L、P71S、Q72H、V73A、Q74R、V75G、R76G、D77N、Q82R、I85F、I86T、V89D、W91Rまたはその保守的アミノ酸置換から選択される、請求項1~4のいずれか1項に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

30

**【請求項 6】**

前記1つまたは複数のアミノ酸改変が、

H15Q, N24D, E44D, V89D, Q82R/V89D,  
 E59G/Q82R, S39I/V89D, S67L/V89D, S67L/I85F, S67L/I86T, H15Q/K65R,  
 H15Q/Q72H/V89D, H15Q/S67L/R76G, H15Q/R76G/I85F, H15Q/T47A/Q82R,  
 H15Q/Q82R/V89D, H15Q/C23S/I86T, H15Q/S39I/I86T, E44D/V89D/W91R,  
 I13V/S67L/V89D, H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/E44D/V89D,  
 I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D, I13V/E44D/Q82R/V89D, I13V/Q72H/R76G/I86T,  
 I13V/H15Q/R76G/I85F, H15Q/S39I/R76G/V89D, H15Q/S67L/R76G/I85F,  
 H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/T47A/Q72H/R76G, I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G,  
 H15Q/E44D/R76G/I85F, H15Q/S39I/S67L/V89D, H15Q/N32D/S67L/V89D,  
 N32D/S67L/V89D, H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D, H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T,  
 G28V/Q72H/R76G/I86T, I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L, E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D,  
 H15Q/V89D, H15Q/T47A, I13V/H15Q/Q82R, I13V/H15Q/V89D, I13V/S67L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/Q82R/V89D, H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R,  
 I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D, H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D, I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D, I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D,  
 H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D,  
 I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T, H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D,  
 F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D, I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D, H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D,  
 I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D, H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D,  
 I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89D,  
 H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D,または I13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89D

10

20

30

の中から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のパリアント PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 1 つまたは複数のアミノ酸改変が、13、15、44、47、67、72、76、82、86 または 89 から選択される位置（複数可）に対応する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のパリアント PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 8】

前記 1 つまたは複数のアミノ酸改変が、I13V、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I86T、V89D またはその保存的アミノ酸置換から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のパリアント PD - L 2 ポリペプチド。

40

【請求項 9】

アミノ酸改変 I13V / H15Q、I13V / T47A、I13V / S67L、I13V / Q72H、I13V / Q72H、I13V / R76G、I13V / Q82R、I13V / I86T、I13V / V89D、H15Q / T47A、H15Q / S67L、H15Q / Q72H、H15Q / Q72H、H15Q / R76G、H15Q / Q82R、H15Q / I86T、H15Q / V89D、T47A / S67L、T47A / Q72H、T47A / Q72H、T47A / R76G、T47A / Q82R、T47A / I86T、T47

50

A / V 8 9 D、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / R 7 6 G、S 6 7 L / Q 8 2 R、S 6 7 L / I 8 6 T、S 6 7 L / V 8 9 D、Q 7 2 H / R 7 6 G、Q 7 2 H / Q 8 2 R、Q 7 2 H / I 8 6 T、Q 7 2 H / V 8 9 D、R 7 6 G / Q 8 2 R、R 7 6 G / I 8 6 T、R 7 6 G / V 8 9 D、Q 8 2 R / I 8 6 T、Q 8 2 R / V 8 9 DまたはI 8 6 T / V 8 9 Dを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 10】

アミノ酸改変 H 1 5 Q / S 6 2 L / Q 8 2 R、H 1 5 Q / S 6 2 L / V 8 9 D、H 1 5 Q / Q 8 2 R / V 8 9 DまたはS 6 2 L / Q 8 2 R / V 8 9 Dを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

10

【請求項 11】

アミノ酸改変 H 1 5 Q / T 4 7 A / K 6 5 R / S 6 7 L / Q 8 2 R / V 8 9 Dを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 12】

前記 Ig V ドメインまたはその特異的結合断片を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 13】

前記 Ig V ドメインまたはその特異的結合断片が、前記バリエーション PD - L 2 ポリペプチドの唯一の PD - L 2 部分である、請求項 12 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

20

【請求項 14】

SEQ ID NO : 1 3 3 ~ 1 8 3、1 8 5 ~ 1 9 1、1 9 3 ~ 2 0 9、2 6 8 ~ 3 1 8、3 2 0 ~ 3 4 3 のいずれかに記載のアミノ酸の配列もしくはその特異的結合断片、または

SEQ ID NO : 1 3 3 ~ 1 8 3、1 8 5 ~ 1 9 1、1 9 3 ~ 2 0 9、2 6 8 ~ 3 1 8、3 2 0 ~ 3 4 3 のいずれかに対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を示しかつその一つもしくは複数のアミノ酸改変を含むアミノ酸の配列もしくはその特異的結合断片を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 15】

PD - 1 のエクトドメインへの前記非改変 PD - L 2 の結合と比較して増加した親和性で、PD - 1 のエクトドメインに特異的に結合する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

30

【請求項 16】

前記 PD - 1 のエクトドメインに対する前記増加した親和性が、前記非改変 PD - L 2 と比較して、1 . 2 倍、1 . 5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、または 6 0 倍より大きく増加する、請求項 15 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 17】

前記 PD - 1 が、ヒト PD - 1 である、請求項 15 または請求項 16 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

40

【請求項 18】

前記 PD - L 2 膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを欠き、及び/または細胞表面で発現することができない、

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 19】

前記ポリペプチドの生物学的半減期を延長する部分に連結された、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【請求項 20】

多量体化ドメインに連結された、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

50

**【請求項 2 1】**

前記多量体化ドメインが F c ドメインであるか、または、低下したエフェクター機能を有するバリエーション F c ドメインである、請求項 2 0 に記載のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド。

**【請求項 2 2】**

膜貫通ドメインをさらに含む膜貫通型免疫調節タンパク質であり、任意で、前記膜貫通ドメインが前記バリエーション P D - L 2 ポリペプチドの細胞外ドメイン ( E C D ) またはその特異的結合断片に直接的または間接的に連結されている、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド。

**【請求項 2 3】**

細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含み、任意で、該細胞質ドメインが前記膜貫通ドメインに直接的または間接的に連結される、請求項 2 2 に記載のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド。

**【請求項 2 4】**

前記多量体化ドメインが第 1 の多量体化ドメインである請求項 2 0 または請求項 2 1 に記載の第 1 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド、及び

前記多量体化ドメインが第 2 の多量体化ドメインである請求項 2 0 または請求項 2 1 に記載の第 2 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド

を含む、免疫調節タンパク質であって、前記第 1 及び第 2 の多量体化ドメインが相互作用して前記第 1 及び第 2 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチドを含む多量体を形成する、前記免疫調節タンパク質。

**【請求項 2 5】**

前記第 1 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド及び前記第 2 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチドが同一である、請求項 2 4 に記載の免疫調節タンパク質。

**【請求項 2 6】**

前記多量体が二量体である、請求項 2 4 または請求項 2 5 に記載の免疫調節タンパク質。

**【請求項 2 7】**

ホモ二量体である、請求項 2 6 に記載の免疫調節タンパク質。

**【請求項 2 8】**

免疫グロブリンスーパーファミリー ( I g S F ) ファミリーメンバーの I g S F ドメインを含む第 2 のポリペプチドに直接的またはリンカーを介して間接的に連結された請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のバリエーション P D - L 2 ポリペプチドを含む、免疫調節タンパク質。

**【請求項 2 9】**

前記 I g S F ドメインが、親和性改変 I g S F ドメインであり、該親和性改変 I g S F ドメインが、 I g S F ファミリーメンバーの非改変または野生型 I g S F ドメインと比較して、1 つまたは複数のアミノ酸改変を含む、請求項 2 6 に記載の免疫調節タンパク質。

**【請求項 3 0】**

前記親和性改変 I g S F ドメインが、1 つまたは複数のその同族結合パートナー ( 複数可 ) に対し、 I g S F ファミリーメンバーの非改変または野生型 I g S F ドメインの、同じ 1 つまたは複数の同族結合パートナー ( 複数可 ) に対する結合と比較して増加した結合を示す、請求項 2 7 に記載の免疫調節タンパク質。

**【請求項 3 1】**

前記バリエーション P D - L 2 ポリペプチドは、 P D - 1 に特異的に結合することができ、前記第 2 のポリペプチドの前記 I g S F ドメインは、前記 P D - L 2 バリエーションポリペプチドによって特異的に結合されるもの以外の同族結合パートナーに結合することができる、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

**【請求項 3 2】**

前記第 2 のポリペプチドの前記 I g S F ドメインが、阻害性受容体に結合するリガンド

10

20

30

40

50

の I g S F ドメイン、またはその親和性改変 I g S F ドメインである、請求項 28 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 33】

前記阻害性受容体が T I G I T である、または  
前記阻害性受容体のリガンドが C D 1 5 5 もしくは C D 1 1 2 である、  
請求項 32 に記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 34】

前記第 2 のポリペプチドが、  
( i ) S E Q I D N O : 3 4 5 ~ 3 8 6、3 8 8 ~ 6 9 9、1 5 2 7 ~ 1 7 3 6 の  
いずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 1 5 5 ポリペプチド、または  
( i i ) S E Q I D N O : 7 0 1 ~ 7 9 4、7 9 6 ~ 9 6 5、1 4 5 5 ~ 1 5 2 6  
のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 1 1 2 ポリペプチド、  
( i i i ) ( i ) ~ ( i i ) の S E Q I D N O のいずれかに対して少なくとも 9 5  
% の配列同一性を示しかつアミノ酸改変、任意でそのアミノ酸置換、挿入、及び/または  
欠失を含む、アミノ酸配列、または  
( i v ) ( i ) ~ ( i i i ) のいずれかの特異的結合断片  
から選択される、請求項 26 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項 35】

前記バリエーション P D - L 2 ポリペプチドまたは前記第 2 のポリペプチドの少なくとも 1  
つに連結された多量体化ドメインをさらに含む、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載  
の免疫調節タンパク質。

20

【請求項 36】

( 1 ) 前記多量体化ドメインが第 1 の多量体化ドメインである、請求項 35 に記載の免  
疫調節タンパク質、および  
( 2 ) 第 2 の多量体化ドメイン  
を含み、前記第 1 の多量体化ドメインが、前記第 2 の多量体化ドメインと相互作用して前  
記免疫調節タンパク質を含む多量体を形成する、免疫調節タンパク質。

【請求項 37】

前記免疫調節タンパク質が、  
第 1 の免疫調節タンパク質、及び、  
前記多量体化ドメインが第 2 の多量体化ドメインである、請求項 35 に記載の第 2 の免  
疫調節タンパク質  
を含み、前記多量体が前記第 1 及び第 2 の免疫調節タンパク質を含む、請求項 36 に記載  
の免疫調節タンパク質。

30

【請求項 38】

前記多量体が二量体である、請求項 36 または請求項 37 に記載の免疫調節タンパク質  
。

【請求項 39】

ホモ二量体である、請求項 38 に記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 40】

前記第 2 のポリペプチドがバリエーション C D 1 5 5 ポリペプチドであり、前記第 1 及び/  
または第 2 の免疫調節タンパク質が、S E Q I D N O : 1 1 9 1 ~ 1 1 9 6 のいずれ  
かに記載の配列、または S E Q I D N O : 1 1 9 1 ~ 1 1 9 6 のいずれかに対して少  
なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、  
9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸  
の配列を含む、請求項 36 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項 41】

ヘテロ二量体であり、任意で、前記第 1 及び第 2 の多量体化ドメインは、異なっている  
、及び/または相互作用してヘテロ二量体形成を媒介することができる、請求項 38 に記  
載の免疫調節タンパク質。

50

## 【請求項 4 2】

前記第 2 のポリペプチドがバリエーション CD 1 5 5 ポリペプチドであり、  
前記第 1 または第 2 の免疫調節タンパク質が、SEQ ID NO: 1 1 9 7、1 1 9 8、1 1 9 9、1 2 0 0、1 2 0 1、1 2 0 3 のいずれかに記載の配列、または SEQ ID NO: 1 1 9 7、1 1 9 8、1 1 9 9、1 2 0 0、1 2 0 1、もしくは 1 2 0 3 のいずれかに対して少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつ

前記第 1 または第 2 の免疫調節タンパク質の他方が、SEQ ID NO: 1 1 8 8、1 1 9 0、1 2 0 2 もしくは 1 2 0 4 のいずれかに記載の配列、または SEQ ID NO: 1 1 8 8、1 1 9 0、1 2 0 2 もしくは 1 2 0 4 のいずれかに対して少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、請求項 3 6 ~ 3 8 及び 4 1 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 3】

前記第 1 及び / または第 2 の多量体化ドメインが免疫グロブリンの F c ドメインであり、任意で、前記免疫グロブリンタンパク質がヒトである、及び / または前記 F c 領域がヒトである、請求項 2 4 ~ 2 7 及び 3 5 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 4】

前記 F c 領域が、免疫グロブリン G 1 ( I g G 1 ) または免疫グロブリン G 2 ( I g G 2 ) タンパク質のものである、請求項 4 3 に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 5】

1 つまたは複数のエフェクター機能を示す、請求項 4 3 または請求項 4 4 に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 6】

前記 F c 領域が、野生型 F c 領域に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーション F c 領域であり、前記バリエーション F c 領域が、前記野生型 F c 領域と比較して低下した 1 つまたは複数のエフェクター機能を示し、任意で、該野生型ヒト F c がヒト I g G 1 のものである、請求項 4 3 に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 7】

前記 F c 領域が、K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換 N 2 9 2 G、R 2 9 2 C / N 2 9 7 G / V 3 0 2 C または L 2 3 4 A / L 2 3 5 E / G 2 3 7 A を含む、請求項 4 6 に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 8】

前記 F c 領域が、K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換 C 2 2 0 S を含む、請求項 4 3 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 4 9】

前記 F c 領域が、K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けで K 4 4 7 d e l を含む、請求項 4 3 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質。

## 【請求項 5 0】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のバリエーション P D - L 2 または部分に連結された請求項 2 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質を含む、コンジュゲート。

## 【請求項 5 1】

前記部分が、細胞表面の分子に特異的に結合する標的指向性部分である、請求項 5 0 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 5 2】

前記細胞が、免疫細胞または腫瘍細胞である、請求項 5 1 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 5 3】

前記部分が、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子またはナノ粒子である、請求項 5 0

10

20

30

40

50

～ 5 2 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 4】

前記部分が、抗体または抗原結合断片である、請求項 5 0 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 5】

融合タンパク質である、請求項 5 0 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 6】

請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載のバリエント PD - L 2 ポリペプチド、請求項 2 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質、または請求項 5 0 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質であるコンジュゲートをコードする、核酸分子。

10

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 5 8】

発現ベクターである、請求項 5 7 に記載のベクター。

【請求項 5 9】

請求項 5 7 または請求項 5 8 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 6 0】

請求項 5 6 に記載の核酸分子または請求項 5 7 もしくは請求項 5 8 に記載のベクターを宿主細胞に、前記細胞内でタンパク質を発現する条件下で導入することを含む、バリエント PD - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を産生する方法。

20

【請求項 6 1】

前記細胞から前記バリエント PD - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を単離または精製することをさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

バリエント PD - L 2 バリエントポリペプチドを発現する細胞を操作する方法であって、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載のバリエント PD - L 2 ポリペプチドをコードする核酸分子を宿主細胞に、前記細胞内で前記ポリペプチドが発現される条件下で導入することを含む、前記方法。

【請求項 6 3】

請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載のバリエント PD - L 2 ポリペプチド、請求項 2 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質、請求項 5 0 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質であるコンジュゲート、請求項 5 6 に記載の核酸分子、または請求項 5 7 もしくは請求項 5 8 に記載のベクターを発現する、操作された細胞。

30

【請求項 6 4】

前記バリエント PD - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が膜貫通ドメインを含まない、及び/または前記細胞の表面で発現しない、かつ/あるいは

前記バリエント PD - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、前記操作された細胞から分泌される、または分泌されることができる、請求項 6 3 に記載の操作された細胞。

【請求項 6 5】

前記操作された細胞が、膜貫通ドメインを含む及び/または請求項 2 2 もしくは請求項 2 3 に記載の膜貫通型免疫調節タンパク質である、バリエント PD - L 2 ポリペプチドを含む、かつ/あるいは

40

前記バリエント PD - L 2 ポリペプチドが前記細胞の表面で発現する、請求項 6 3 に記載の操作された細胞。

【請求項 6 6】

前記細胞が、免疫細胞、任意で抗原提示細胞 (APC) またはリンパ球、任意で T 細胞である、請求項 6 3 ～ 6 5 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 6 7】

前記細胞が、キメラ抗原受容体 (CAR) または操作された T 細胞受容体をさらに含む

50

、請求項 63 ~ 66 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 68】

請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のバリエント PD - L2 ポリペプチド、請求項 24 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質、または請求項 50 ~ 55 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質であるコンジュゲートをコードする核酸分子を含む、感染性物質。

【請求項 69】

細菌またはウイルスである、請求項 68 に記載の感染性物質。

【請求項 70】

ウイルスであり、該ウイルスが腫瘍溶解性ウイルスである、請求項 69 に記載の感染性物質。 10

【請求項 71】

請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のバリエント PD - L2 ポリペプチド、請求項 24 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質、請求項 50 ~ 55 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート、請求項 63 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞、または請求項 68 ~ 70 のいずれか 1 項に記載の感染性物質を含む、薬学的組成物。

【請求項 72】

薬学的に許容し得る賦形剤を含む、請求項 71 に記載の薬学的組成物。

【請求項 73】

無菌である、請求項 71 または請求項 72 に記載の薬学的組成物。 20

【請求項 74】

バイアル内に請求項 71 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を含む、製造物品。

【請求項 75】

請求項 71 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物または請求項 74 に記載の製造物品、及び使用説明書を含む、キット。

【請求項 76】

対象における免疫応答を調節する方法であって、請求項 71 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 77】

請求項 63 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞を投与することを含む、対象における免疫応答を調節する方法。 30

【請求項 78】

前記操作された細胞が、前記対象に対して自家である、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記免疫応答を調節することにより前記対象の疾患または状態を治療する、請求項 76 ~ 78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

前記免疫応答が増加される、請求項 76 ~ 79 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 81】

前記薬学的組成物または操作された細胞が、拮抗物質でありかつ / または PD - L2 及び PD - 1 の相互作用を遮断して PD - 1 による負のシグナル伝達を減弱させるフォーマットの、バリエント PD - L2 ポリペプチドを含む、請求項 76 ~ 80 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 82】

可溶性であり任意で PD - L2 膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを欠くバリエント PD - L2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、前記対象に投与される、請求項 76 及び 79 ~ 81 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 83】

Fc 融合タンパク質であるバリエントポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が前記対 50

象に投与される、請求項 7 6 及び 7 9 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチドまたは請求項 2 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の免疫調節タンパク質が前記対象に投与される、請求項 7 6 及び 7 9 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

分泌可能なバリエーション PD - L 2 ポリペプチドを含む操作された細胞が、前記対象に投与される、請求項 7 6 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記疾患または状態が、腫瘍またはがんである、請求項 7 6 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 8 7】

前記疾患または状態が、黒色腫、肺癌、膀胱癌、血液学的悪性疾患、肝臓癌、脳癌、腎臓癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、脾臓癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、胃癌、筋骨格癌、頭頸部癌、消化管癌、生殖細胞癌、または内分泌及び神経内分泌癌から選択される、請求項 7 6 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記免疫応答が減少される、請求項 7 6 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記薬学的組成物または操作された細胞が、作動物質でありかつ/または PD - 1 を介した阻害性シグナル伝達を刺激することができるフォーマットの、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドを含む、請求項 7 6 ~ 7 9 及び 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 9 0】

炎症環境の細胞または組織に局在化する Ig S F ドメインまたは部分に連結されたバリエーション PD - L 2 ポリペプチドを含む免疫調節タンパク質またはコンジュゲートが前記対象に投与される、請求項 7 6 ~ 7 9、8 8 及び 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 1】

膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーション PD - L 2 ポリペプチドを含む操作された細胞が、前記対象に投与される、請求項 7 6 ~ 7 9、8 8 及び 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 9 2】

前記疾患または状態が、炎症性または自己免疫性の疾患または状態である、請求項 7 6 ~ 7 9 及び 8 8 ~ 9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記疾患または状態が、抗好中球細胞質抗体 ( A N C A ) 関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植、リウマチ性疾患、炎症性消化管疾患、炎症性眼疾患、炎症性神経疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己免疫性血液疾患である、請求項 7 6 ~ 7 9 及び 8 8 ~ 9 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記疾患または状態が、炎症性腸疾患、移植、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、または乾癬から選択される、請求項 9 2 または請求項 9 3 に記載の方法。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年3月16日に出願された「PD - L 2 Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof」という表題の米国仮特許出願第 62 / 472 , 572 号、2017年3月22日に出願された「PD - L 2 Variant Immunomodulatory Protei 50

ns and Uses Thereof」という表題の米国仮特許出願第62/475,156号、2017年7月27日に出願された「PD-L2 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof」という表題の米国仮特許出願第62/537,928号からの優先権を主張するものであり、それらの各々の内容は、参照によりその全体が組み込まれる。

#### 【0002】

##### 配列表の参照による組み込み

本出願は電子フォーマットの配列表とともに出願されている。当該配列表は、2018年3月12日に作成された761612001540SeqList.TXTという表題の3,353,517バイトサイズのファイルとして提供される。当該配列表の電子フォーマット情報は、参照によりその全体が組み込まれる。

10

#### 【0003】

##### 分野

本開示は、がん及び免疫疾患の治療における免疫応答を調節するための治療用組成物に関する。いくつかの態様では、本開示は、1つまたは複数の同族結合パートナータンパク質PD-1及びRGMBに対する改善された結合親和性または選択性などの改善された結合を示すPD-L2の特定のバリエーションに関する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

##### 背景

抗原提示細胞（APC）または標的細胞とリンパ球との間で形成される免疫学的シナプス（IS）で起こるプロセスに介入することによる免疫応答の調節に関して医学的関心が高まっている。機能的には、ISの細胞表面タンパク質は、複数のタンパク質標的と、それらが結合する単一タンパク質と協調的であり、同時に起こることが多い相互作用を伴うことができる。IS相互作用は、2つの細胞の接合部と密接に関連して起こり、この構造体中の単一タンパク質が、同じ細胞上のタンパク質（シス）及び関連細胞上のタンパク質（トランス）の両方と、恐らく同時に相互作用することができる。ISを調節できる治療薬は知られているが、改善された治療薬が必要とされている。このようなニーズを満たす、細胞上で発現可能な可溶性タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含む免疫調節タンパク質を提供する。

20

30

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

##### 概要

IgVドメインもしくはその特異的結合断片、IgCドメインもしくはその特異的結合断片、または両方を含有するバリエーションPD-L2ポリペプチドであって、SEQ ID NO: 31の番号付けに基づいた2、12、13、15、18、20、23、24、28、31、32、33、36、37、39、44、45、46、47、48、58、59、65、67、69、71、72、73、74、75、76、77、82、85、86、89、または91から選択される位置（複数可）に対応する、非改変PD-L2またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸改変を含有する、バリエーションPD-L2ポリペプチドが本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸の置換、挿入、または欠失である。

40

#### 【0006】

いくつかの実施形態では、非改変PD-L2は、哺乳動物PD-L2またはその特異的結合断片である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、非改変PD-L2は、ヒトPD-L2またはその特異的結合断片である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、非改変PD-L2は、(i)SEQ ID NO: 31に記載のアミノ酸の配列、(ii)SEQ ID NO: 31に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸の配列、または(iii)IgVドメインもしくはIgCドメインもしくはその特異的結合断片または両方を含むそれらの一部分、を含有する。

50

## 【0007】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、I g VドメインまたはI g Cドメインの特異的結合断片は、少なくとも50、60、70、80、90、100、110またはそれ以上のアミノ酸の長さを有するか；またはI g Vドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO: 4の24～130位のアミノ酸として記載のI g Vドメインの長さの少なくとも80%の長さを含み、及び/またはI g Cドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO: 4の122～203位のアミノ酸として記載のI g Cドメインの長さの少なくとも80%の長さを含む。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変（任意で、アミノ酸置換、挿入、及び/または欠失）を含む。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 31に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示すアミノ酸配列またはその特異的結合断片を含有する。

10

## 【0008】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2の結合と比較して、PD-1またはRGMbのエクトドメインに対して変化した結合を示す。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2と比較して、PD-1のエクトドメインに対して変化した結合を示す。いくつかの態様では、変化した結合とは、変化した結合親和性及び/または変化した結合選択性である。

20

## 【0009】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸改変は、F2L、I12V、I13V、H15Q、N18D、N24S、C23S、G28V、N24D、V31A、V31M、N32D、L33P、L33H、L33F、I36V、T37A、S48C、S39I、E44D、N45S、D46E、T47A、E58G、E59G、K65R、S67L、H69L、P71S、Q72H、V73A、Q74R、V75G、R76G、D77N、Q82R、I85F、I86T、V89D、W91Rまたはその保存的アミノ酸置換から選択される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸改変は、

30

H15Q, N24D, E44D, V89D, Q82R/V89D,  
 E59G/Q82R, S39I/V89D, S67L/V89D, S67L/I85F, S67L/I86T, H15Q/K65R,  
 H15Q/Q72H/V89D, H15Q/S67L/R76G, H15Q/R76G/I85F, H15Q/T47A/Q82R,  
 H15Q/Q82R/V89D, H15Q/C23S/I86T, H15Q/S39I/I86T, E44D/V89D/W91R,  
 I13V/S67L/V89D, H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/E44D/V89D,  
 I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D, I13V/E44D/Q82R/V89D, I13V/Q72H/R76G/I86T,  
 I13V/H15Q/R76G/I85F, H15Q/S39I/R76G/V89D, H15Q/S67L/R76G/I85F,  
 H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/T47A/Q72H/R76G, I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G,  
 H15Q/E44D/R76G/I85F, H15Q/S39I/S67L/V89D, H15Q/N32D/S67L/V89D,  
 N32D/S67L/V89D, H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D, H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T,  
 G28V/Q72H/R76G/I86T, I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L, E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D,  
 H15Q/V89D, H15Q/T47A, I13V/H15Q/Q82R, I13V/H15Q/V89D, I13V/S67L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/Q82R/V89D, H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R,  
 I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D, H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D, I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D, I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D,  
 H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D,  
 I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T, H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D,  
 F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D, I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D, H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D,  
 I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D, H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D,  
 I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89D,  
 H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D,または I13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89D

10

20

30

の中から選択される。

【 0 0 1 0 】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、13、15、39、44、47 67、72、76、82、85、86、または89から選択される位置（複数可）に対応する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、I13V、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I85F、I86T、V89Dまたはその保存的アミノ酸置換から選択される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、13、15、44、47 67、72、76、82、86、または89から選択される位置（複数可）に対応する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、I13V、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I86T、V89Dまたはその保存的アミノ酸置換から選択される。

40

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変I13V/H15Q、I13V/T47A、I13V/S67L、I13V/Q72H、I13V/Q72H、I13V/R76G、I13V/Q82R、I13V/I86T、I13V/V89D、H15Q/T47A、H15Q/S67L、H15Q/Q72H、H15

50

Q / Q 7 2 H、H 1 5 Q / R 7 6 G、H 1 5 Q / Q 8 2 R、H 1 5 Q / I 8 6 T、H 1 5 Q / V 8 9 D、T 4 7 A / S 6 7 L、T 4 7 A / Q 7 2 H、T 4 7 A / Q 7 2 H、T 4 7 A / R 7 6 G、T 4 7 A / Q 8 2 R、T 4 7 A / I 8 6 T、T 4 7 A / V 8 9 D、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / R 7 6 G、S 6 7 L / Q 8 2 R、S 6 7 L / I 8 6 T、S 6 7 L / V 8 9 D、Q 7 2 H / R 7 6 G、Q 7 2 H / Q 8 2 R、Q 7 2 H / I 8 6 T、Q 7 2 H / V 8 9 D、R 7 6 G / Q 8 2 R、R 7 6 G / I 8 6 T、R 7 6 G / V 8 9 D、Q 8 2 R / I 8 6 T、Q 8 2 R / V 8 9 DまたはI 8 6 T / V 8 9 Dを含有する。いくつかの実施例では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変H 1 5 Q / S 6 2 L / Q 8 2 R、H 1 5 Q / S 6 2 L / V 8 9 D、H 1 5 Q / Q 8 2 R / V 8 9 D、またはS 6 2 L / Q 8 2 R / V 8 9 Dを含有する。場合によっては、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変H 1 5 Q / T 4 7 A / K 6 5 R / S 6 7 L / Q 8 2 R / V 8 9 Dを含有する。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的断片、及びIgCドメインまたはその特異的断片を含有する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 56~106、108~114、116~132のいずれかに記載のアミノ酸の配列もしくはその特異的結合断片を含むか、またはSEQ ID NO: 56~106、108~114、116~132のいずれかに対して少なくとも95%の配列同一性を示しかつ1つもしくは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列もしくはその特異的結合断片を含む。

#### 【0013】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含有する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、IgVドメインまたはその特異的結合断片は、バリエーションPD-L2ポリペプチドの唯一のPD-L2部分である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、IgCドメインまたはその特異的結合断片は、バリエーションPD-L2ポリペプチドの唯一のPD-L2部分である。

#### 【0014】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 133~183、185~191、193~209、268~318、320~343のいずれかに記載のアミノ酸の配列またはその特異的結合断片、SEQ ID NO: 133~183、185~191、193~209、268~318、320~343のいずれかに対して少なくとも95%の配列同一性を示しかつ1つまたは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列またはその特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、IgCドメインまたはその特異的結合断片は、バリエーションPD-L2ポリペプチドの唯一のPD-L2部分である。

#### 【0015】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、PD-1またはRGMbのエクトドメインへの非改変PD-L2の結合と比較して増加した親和性で、PD-1またはRGMbのエクトドメインに特異的に結合する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、PD-1のエクトドメインへの非改変PD-L2の結合と比較して増加した親和性で、PD-1のエクトドメインに特異的に結合する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、PD-1のエクトドメイン及びRGMbのエクトドメインへの非改変PD-L2の結合と比較して増加した親和性で、それぞれPD-1のエクトドメイン及びRGMbのエクトドメインに特異的に結合する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、PD-1またはRGMbのエクトドメインへの非改変PD-L2の結合と比較して増加した親和性で、PD-1のエクトドメインに特異的に結合し、減少した親和性で、RGMbの他方のエクトドメインに特異的に結合

する。

【0016】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、PD-1のエクトドメインに対する増加した親和性が、非改変PD-L2と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく増加する。いくつかの実施形態では、RGMbのエクトドメインに対する増加した親和性は、非改変PD-L2と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より多く増加する。いくつかの態様では、RGMbのエクトドメインに対する減少した親和性は、非改変PD-L2と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく減少する。

10

【0017】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションポリペプチドは、非改変PD-L2と比較して増加した選択性で、PD-1のエクトドメインに特異的に結合する。場合によっては、増加した選択性は、非改変PD-L2ポリペプチドのPD-1への結合対RGMbへの結合の比率と比較して、バリエーションポリペプチドのPD-1への結合対RGMbへの結合のより大きな比率を含む。場合によっては、該比率は、少なくとも1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍もしくはそれ以上だけ、または少なくとも約1.5倍、約2.0倍、約3.0倍、約4.0倍、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍もしくはそれ以上だけ大きい。

20

【0018】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、PD-1は、ヒトPD-1である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、RGMbは、ヒトRGMbである。

【0019】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、結合親和性は、非改変PD-L2と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より大きく変化（増加または減少）する。

【0020】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、可溶性タンパク質である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、PD-L2膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを欠く；及び/またはバリエーションPD-L2ポリペプチドは、細胞の表面で発現することができない。

30

【0021】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、多量体化ドメインに連結される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、多量体化ドメインに連結された第1のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び多量体化ドメインに連結された第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む多量体化ポリペプチド、任意で二量体ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドは、同一または異なる。

40

【0022】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、多量体化ドメインは、Fcドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションである。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、ポリペプチドの生物学的半減期を延長する部分に連結される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、Fcドメインに連結されるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションに連結される。

【0023】

50

いくつかの実施形態では、Fcドメインは哺乳動物、任意でヒトである；またはバリエーションFcドメインは、哺乳動物、任意でヒトである非改変Fcドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインまたはそのバリエーションは、SEQ ID NO: 211もしくはSEQ ID NO: 212に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 211もしくはSEQ ID NO: 212に対して少なくとも85%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、Fcドメインは、E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236del、G237A、S267K、N297G、V302C、及びK447del（それぞれEU番号付けによる）の中から選択される1つまたは複数のアミノ酸改変を含有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、アミノ酸改変C220S（EU番号付けによる）を含有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、SEQ ID NO: 1189、1205、1206、1207、1739、1738、1739、1740のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 1189、1205、1206、1207、1739、1738、1739、1740のいずれかに対して少なくとも85%の配列同一性を示し、低下したエフェクター機能を示すアミノ酸の配列を含有する。

10

#### 【0024】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、リンカー、任意でG4Sリンカーを介して間接的に連結する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、バリエーションPD-L2ポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に連結した膜貫通ドメインをさらに含有する膜貫通型免疫調節タンパク質である。場合によっては、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 4の残基221~241として記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 4の残基221~241に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、膜貫通ドメインに連結された細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含有する。いくつかの態様では、細胞質シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 4の残基242~273として記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 4の残基242~273に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含む。

20

#### 【0025】

提供される実施形態の任意のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、T細胞などの免疫細胞の応答を調節する。いくつかの実施形態では、応答、例えばT細胞応答は増加または減少する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2は、*in vitro* T細胞アッセイにおける非改変PD-L2と比べてIFN- $\gamma$ （インターフェロン-ガンマ）発現を増加させる。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2は、*in vitro* T細胞アッセイにおける非改変PD-L2と比べてIFN- $\gamma$ （インターフェロン-ガンマ）発現を減少させる。

30

#### 【0026】

本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドの任意の1つのいくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IL-2プロモーターに作動可能に接続されたレポーター（例えばルシフェラーゼ）で操作されたT細胞（例えばJurkat）を含むレポーターアッセイを使用して決定し、非改変PD-L2と比べてT細胞シグナル伝達を増加させる。本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドの任意の1つのいくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IL-2プロモーターに作動可能に接続されたレポーター（例えばルシフェラーゼ）で操作されたT細胞（例えばJurkat）を含むレポーターアッセイを使用して決定し、非改変PD-L2と比べてT細胞シグナル伝達を減少させる。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、可溶性または固定化（例えばプレート結合）など、任意の多種多様なフォーマットで提供される。

40

#### 【0027】

50

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、脱グリコシル化される。

【0028】

免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメインを含有する第2のポリペプチドに、直接的またはリンカーを介して間接的に連結された、提供される実施形態のいずれかによるバリエーションPD-L2を含有する免疫調節ポリペプチドも提供される。場合によっては、IgSFドメインは、親和性改変され、非改変または野生型IgSFドメインと比較して、1つまたは複数のその同族結合パートナー(複数可)への変化した結合を示す。場合によっては、IgSFドメインは、同じ1つまたは複数の同族結合パートナー(複数可)に対する非改変または野生型IgSFドメインと比較して1つまたは複数のその同族結合パートナー(複数可)への増加した結合を示す。

10

【0029】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2は第1のPD-L2バリエーションであり、第2のポリペプチドのIgSFドメインは提供される実施形態の任意の第2のバリエーションPD-L2に由来するIgSFドメインであり、該第1及び第2のPD-L2バリエーションは同一または異なる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドはPD-1またはRGMbに特異的に結合することができ、第2のポリペプチドのIgSFドメインはPD-L2バリエーションポリペプチドによって特異的に結合されるもの以外の同族結合パートナーに結合することができる。

【0030】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、IgSFドメインはB7ファミリーのメンバー由来である。いくつかの実施形態では、IgSFドメインは、腫瘍で発現するリガンドに結合する腫瘍局在化部分である。場合によっては、リガンドはB7H6である。いくつかの態様では、IgSFドメインはNKp30由来である。

20

【0031】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、任意で第2または第3のポリペプチドの、IgSFドメインまたはその親和性改変IgSFドメインは、IgVドメインであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインであるか、またはそれを含有する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、IgSFドメインのバリエーションPD-L2ポリペプチドの一方または両方に連結された多量体化ドメインを含有する。

30

【0032】

いくつかの実施形態では、多量体化ドメインは、Fcドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションである。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、二量体である。場合によっては、免疫調節タンパク質は、ホモ二量体である。場合によっては、免疫調節タンパク質は、ヘテロ二量体である。

【0033】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、第2のポリペプチドのIgSFドメインは、阻害性受容体に結合するリガンドのIgSFドメイン、またはその親和性改変IgSFドメインである。場合によっては、親和性改変IgSFドメインは、同じ阻害性受容体への非改変IgSFドメインの結合と比較して阻害性受容体に対する結合親和性及び/または結合選択性の増加を示す。いくつかの実施形態では、阻害性受容体はTIGITもしくはCTLA-4である；または阻害性受容体のリガンドはCD155、CD112もしくはCD80である。

40

【0034】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、第2のポリペプチドのIgSFドメインは、以下を含有する親和性改変IgSFドメインである：(i)SEQ ID NO:47、344もしくは387のいずれかに記載のIgSFを含む野生型CD155、または表5に記載のSEQ ID NOのいずれか、任意でSEQ ID NO:345~386、388~699、1527~1736のいずれかのIgSFドメインを含むバリエーション

50

CD155ポリペプチド、(ii)SEQ ID NO:48、700もしくは795のいずれかに記載のIgSFドメインを含む野生型CD112、または表4に記載のSEQ ID NOのいずれか、任意でSEQ ID NO:701~794、796~965、1455~1526のいずれかのIgSFドメインを含むバリエーションCD112ポリペプチド、(iii)SEQ ID NO:28、1039もしくは2039のいずれかに記載のIgSFを含む野生型CD80、または表3に記載のSEQ ID NOのいずれか、任意でSEQ ID NO:28、966~998、1000~1072、1074~1146、1147~1186のいずれかのIgSFを含むバリエーションCD80ポリペプチド、(iv)SEQ ID NO:30、1812、1258もしくは1454のいずれかに記載のIgSFを含む野生型PD-L1、または表8に記載のSEQ ID NOのいずれか、任意でSEQ ID NO:1259~1453、1743~1811、1813~2021のいずれかのIgSFを含むバリエーションPD-L1ポリペプチド、(v)(i)~(v)のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも95%の配列同一性を示し、かつアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列、または(vi)(i)~(v)のいずれかの特異的結合断片。

#### 【0035】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、野生型IgSFドメインまたはそのバリエーションまたはその親和性改変IgSFドメインを含む第3のポリペプチドをさらに含有し、該親和性改変IgSFドメインは、IgSFファミリーメンバーの非改変または野生型IgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変を含み、該第3のポリペプチドは第1及び/または第2のポリペプチドと同一である、または第3のポリペプチドは第1及び/または第2のポリペプチドとは異なる。

#### 【0036】

いくつかの実施例では、第3のポリペプチドのIgSFドメインは、以下を含む親和性改変IgSFドメインである:(i)SEQ ID NO:47、344もしくは387のいずれかに記載のIgSFを含む野生型CD155、またはSEQ ID NO:345~386、388~699、1527~1736のいずれかに記載のIgSFドメインを含むバリエーションCD155ポリペプチド、(ii)SEQ ID NO:48、700もしくは795のいずれかに記載のIgSFドメインを含む野生型CD112、またはSEQ ID NO:701~794、796~965、1455~1526のいずれかに記載のIgSFドメインを含むバリエーションCD112ポリペプチド、(iii)SEQ ID NO:28、1039もしくは2039のいずれかに記載のIgSFを含む野生型CD80、またはSEQ ID NO:966~998、1000~1038、1040~1072、1074~1112、1114~1146、1147~1186のいずれかに記載のIgSFドメインを含むバリエーションCD80ポリペプチド、(iv)SEQ ID NO:30、1812、1258もしくは1454のいずれかに記載のIgSFを含む野生型PD-L1、またはSEQ ID NO:1259~1453、1743~1811、1813~2021のいずれかに記載のIgSFドメインを含むバリエーションPD-L1ポリペプチド、(v)(i)~(v)のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも95%の配列同一性を示しかつアミノ酸改変、任意でそのアミノ酸置換、挿入、及び/または欠失を含む、アミノ酸配列、または(vi)(i)~(v)のいずれかの特異的結合断片。

#### 【0037】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、IgSFファミリーメンバーのIgSFドメインまたはその親和性改変IgSFドメインを含む少なくとも1つの追加のポリペプチドをさらに含有し、該親和性改変IgSFドメインは、IgSFファミリーメンバーの非改変または野生型IgSFドメインの結合と比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む。

#### 【0038】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、バリエーションPD-L2ポリペプチド

、第2のポリペプチド、及び/または第3のポリペプチドの少なくとも1つに連結された多量体化ドメインをさらに含み、任意で、該多量体化ドメインはFcドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションである。

【0039】

いくつかの実施形態では、多量体化ドメインはヘテロ二量体の形成を促進する。

【0040】

多量体化ドメインが第1の多量体化ドメインである第1のバリエーションPD-L2ポリペプチド、及び多量体化ドメインが第2の多量体化ドメインである第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質であって、該第1及び第2の多量体化ドメインが相互作用して第1及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する多量体を形成し、任意で、該第1及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドが同一である、免疫調節タンパク質が提供される。提供される免疫調節タンパク質のいずれかを含有する免疫調節タンパク質であって、該多量体化ドメインが第1の多量体化ドメインであり、第2の多量体化ドメインと相互作用して免疫調節タンパク質を含む多量体を形成する、免疫調節タンパク質もまた提供される。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は第1の免疫調節タンパク質であり、第2の免疫調節タンパク質は第2の多量体化ドメインに直接的またはリンカーを介して間接的に連結され、該多量体は、第1及び第2の免疫調節タンパク質を含有する。場合によっては、第2の免疫調節タンパク質は本明細書に記載の免疫調節タンパク質であり、多量体化ドメインは第2の多量体化ドメインである。いくつかの実施形態では、多量体は二量体である。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、ホモ二量体であり、任意で、第1及び第2の多量体化ドメインは同一である。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドはバリエーションCD155ポリペプチドであり、第1及び/または第2の免疫調節タンパク質はSEQ ID NO: 1191~1196のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1191~1196のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。場合によっては、免疫調節タンパク質は、ヘテロ二量体であり、任意で、第1及び第2の多量体化ドメインは異なっている、及び/または相互作用してヘテロ二量体形成を媒介することができる。いくつかの実施例では、第2のポリペプチドはバリエーションCD155ポリペプチドであり、そして第1もしくは第2の免疫調節タンパク質はSEQ ID NO: 1197、1198、1199、1200、1201、1203のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1197、1198、1199、1200、1201、もしくは1203のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含有し、そして該第1もしくは第2の免疫調節タンパク質の他方は、SEQ ID NO: 1188、1190、1202もしくは1204のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1188、1190、1202もしくは1204のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

30

40

【0043】

いくつかの実施形態では、第1及び/または第2の多量体化ドメインはFcドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションであり、任意で該Fcドメインはヒトである免疫グロブリンタンパク質のものであり、及び/または該Fc領域はヒトであり、任意で該Fc領域は免疫グロブリンG1(IgG1)もしくは免疫グロブリンG2(IgG2)のものであり、任意でSEQ ID NO: 211もしくはSEQ

50

I D N O : 2 1 2 に記載され、または、該バリエーション F c ドメインは野生型 F c 領域に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含有し、任意で野生型 F c 領域と比較して低下したエフェクター機能が低下し、任意で該野生型ヒト F c はヒト I g G 1 のものである。

【 0 0 4 4 】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、第 1 及び第 2 の多量体化ドメインは、同一または異なる。いくつかの実施例では、バリエーション F c 領域は、K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換 E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、G 2 3 6 d e l、G 2 3 7 A、S 2 6 7 K、もしくは N 2 9 7 G、または K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換 R 2 9 2 C / N 2 9 7 G / V 3 0 2 C、もしくは L 2 3 4 A / L 2 3 5 E / G 2 3 7 A を含有する。場合によっては、F c 領域またはバリエーション F c 領域は、K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換 C 2 2 0 S を含有する。いくつかの実施例では、F c 領域またはバリエーション F c 領域は、K a b a t の E U インデックスに従った残基番号付けで K 4 4 7 d e l を含有する。

10

【 0 0 4 5 】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、S E Q I D N O : 1 1 9 1 ~ 1 2 0 4 のいずれかに記載のアミノ酸の配列、または S E Q I D N O : 1 1 9 1 ~ 1 2 0 4 のいずれかに対して少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列。

20

【 0 0 4 6 】

提供される実施形態のいずれかによるバリエーション P D - L 2 または部分に連結された提供される実施形態のいずれかによる免疫調節ポリペプチドを含有するコンジュゲートもまた提供される。場合によっては、当該部分は、細胞表面の分子に特異的に結合する標的指向性部分である。場合によっては、標的指向性部分は、免疫細胞表面の分子に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、抗原提示細胞またはリンパ球である。

【 0 0 4 7 】

場合によっては、標的指向性部分は、腫瘍表面の分子に結合する腫瘍局在化部分である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、当該部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子またはナノ粒子である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、当該部分は、抗体または抗原結合断片である。任意のこのような実施形態のいくつかでは、コンジュゲートは、二価、四価、六価、または八価である。場合によっては、コンジュゲートは、融合タンパク質である。

30

【 0 0 4 8 】

提供される実施形態のいずれかによるバリエーション P D - L 2 ポリペプチドをコードする核酸分子（複数可）、提供される実施形態のいずれかによる融合タンパク質であるコンジュゲート、または提供される実施形態のいずれかによる免疫調節ポリペプチドもまた提供される。いくつかの実施形態では、核酸分子は、合成核酸である。場合によっては、核酸分子は、c D N A である。

【 0 0 4 9 】

提供される実施形態のいずれかによる核酸分子を含有するベクターもまた提供される。場合によっては、ベクターは、発現ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、哺乳動物発現ベクターまたはウイルスベクターである。

40

【 0 0 5 0 】

提供される実施形態のいずれかのベクターを含有する細胞もまた提供される。場合によっては、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの態様では、細胞は、ヒト細胞である。

【 0 0 5 1 】

提供される実施形態のいずれかによる核酸分子または提供される実施形態のいずれかによるベクターを、細胞においてタンパク質を発現する条件下で宿主細胞に導入することを含み、バリエーション P D - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を産生する方法もま

50

た提供される。場合によっては、方法は、細胞からバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を単離または精製することをさらに含む。提供される実施形態のいずれかによるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする核酸分子を、該ポリペプチドが細胞において発現する条件下で宿主細胞に導入することを含む、バリエーションPD-L2バリエーションポリペプチドを発現する細胞を操作する方法もまた提供される。

【0052】

提供される実施形態のいずれかによるバリエーションPD-L2ポリペプチド、提供される実施形態のいずれかによる融合タンパク質であるコンジュゲート、提供される実施形態のいずれかによる免疫調節タンパク質、提供される実施形態のいずれかによる核酸分子、または実施形態のいずれかによるベクターを発現する操作された細胞もまた提供される。

10

【0053】

場合によっては、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインを含まない、及び/または細胞の表面で発現しない。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、操作された細胞から分泌される、または分泌されることができる。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、膜貫通ドメインを含む及び/または提供される実施形態のいずれかによる膜貫通型免疫調節タンパク質である、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、細胞の表面で発現する。

20

【0054】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、細胞は、免疫細胞である。場合によっては、免疫細胞は、抗原提示細胞（APC）またはリンパ球である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はリンパ球であり、該リンパ球はT細胞である。場合によっては、細胞はAPCであり、該APCは人工APCである。いくつかの実施例では、操作された細胞は、初代細胞である。場合によっては、細胞は、哺乳動物細胞である。場合によっては、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）または操作されたT細胞受容体をさらに含有する。

30

【0055】

提供される実施形態のいずれかによるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする核酸分子、または提供される実施形態のいずれかによる免疫調節ポリペプチドを含有する感染性物質もまた提供される。場合によっては、コードされたバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドは、膜貫通ドメインを含有しない、及び/またはそれが発現される細胞の表面で発現しない。いくつかの実施形態では、コードされたバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、それが発現される細胞から分泌される。場合によっては、コードされたバリエーションPD-L2ポリペプチドは、膜貫通ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、コードされたバリエーションPD-L2ポリペプチドは、それが発現される細胞の表面で発現する。

40

【0056】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、感染性物質は、細菌またはウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスはレンチウイルスまたはレトロウイルス構築物またはそれらのハイブリッドである。場合によっては、ウイルスは、腫瘍溶解性ウイルスである。いくつかの実施例では、腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口腔ウイルス（Vestibular Stomatitic virus）、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パルボウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、コクサッキーウイルスまたはワクシニアウイルスである。いくつかの態様では、ウイルスは、樹状細胞（DC）を特異的に標的とするウイルス、及び/または樹状細胞指向性である。いくつかの実施形

50

態では、ウイルスは、改変されたシンドビスウイルスエンベロープ産物でシュードタイプ化されたレンチウイルスベクターである。

【0057】

いくつかの実施形態では、感染性物質は、標的細胞の死をもたらす、または免疫応答を増強もしくは強化することができるさらなる遺伝子産物をコードする核酸分子をさらに含有する。場合によっては、さらなる遺伝子産物は、抗がん剤、抗転移剤、抗血管新生剤、免疫調節分子、免疫チェックポイント阻害剤、抗体、サイトカイン、成長因子、抗原、細胞傷害性遺伝子産物、プロアポトーシス遺伝子産物、抗アポトーシス遺伝子産物、細胞マトリックス分解性遺伝子、組織再生またはヒト体細胞をリプログラミングして多能性にするための遺伝子から選択される。

10

【0058】

提供される実施形態のいずれかによるバリエーションPD-L2ポリペプチド、提供される実施形態のいずれかによる免疫調節タンパク質、提供される実施形態のいずれかによるコンジュゲート、または提供される実施形態のいずれかによる操作された細胞を含有する薬学的組成物もまた提供される。場合によっては、薬学的組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌されている。

【0059】

提供される実施形態のいずれかによる薬学的組成物をバイアルに含有する製造物品もまた提供される。場合によっては、バイアルは密封される。

【0060】

提供される実施形態のいずれかによる薬学的組成物及び使用説明書を含有するキットもまた提供される。提供される実施形態のいずれかによる製造物品及び使用説明書を含有するキットもまた提供される。

20

【0061】

提供される実施形態のいずれかによる薬学的組成物を対象に投与することを含む、免疫応答を増加または低下させるなど、対象において免疫応答を調節する方法もまた提供される。場合によっては、該方法は、提供された実施形態のいずれかによる操作された細胞を投与することを含む。いくつかの実施例では、操作された細胞は、対象に対して自家である。場合によっては、操作された細胞は、対象に対して同種他家である。いくつかの実施形態では、該方法は、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる可溶性バリエーションPD-L2ポリペプチド、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによる免疫調節タンパク質、または本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによるコンジュゲートを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つによるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする感染性物質を対象に投与することを含む。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、免疫応答を調節する方法により、対象の疾患または状態を治療する。

【0063】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、免疫応答は増加される。バリエーションPD-L2の拮抗物質フォーマットなどの、様々なフォーマットのバリエーションPD-L2ポリペプチドが、免疫応答を増加させるために対象への投与に企図される。場合によっては、このような方法は、阻害性受容体PD-1によるシグナル伝達がこの投与により遮断または減弱される条件下で実施する。任意のこのような実施形態のいくつかでは、該方法は、可溶性であるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が対象に投与されることを含む。場合によっては、可溶性免疫調節タンパク質は、免疫調節Fc融合タンパク質である。該方法のいくつかの実施形態では、提供される実施形態のいずれかによるバリエーションPD-L2ポリペプチド、または提供される実施形態のいずれかによる免疫調節タンパク質が、対象に投与される。

40

【0064】

50

いくつかの実施形態では、分泌可能なバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する操作された細胞が、対象に投与される。いくつかの実施形態では、提供される実施形態のいずれかによる操作された細胞が、対象に投与される。いくつかの実施形態では、任意で感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染し、分泌可能な免疫調節タンパク質が感染細胞から分泌される条件下で、分泌可能な免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする感染性物質を対象に投与する。

【0065】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、疾患または状態は、腫瘍またはがんである。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、黒色腫、肺癌、膀胱癌、血液学的悪性疾患、肝臓癌、脳癌、腎臓癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、脾臓癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、胃癌、筋骨格癌、頭頸部癌、消化管癌、生殖細胞癌、または内分泌及び神経内分泌癌から選択される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2は、対象の免疫応答を増加させるフォーマットで投与される。

10

【0066】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、免疫応答は減少される。バリエーションPD-L2の作動物質フォーマットなどの、様々なフォーマットのバリエーションPD-L2ポリペプチドが、免疫応答を減少させるために対象への投与に企図される。場合によっては、このような方法は、阻害性受容体PD-1によるシグナル伝達がこの投与により活性化される、または刺激される、または誘導される条件下で実施する。いくつかの実施形態では、炎症環境の細胞または組織に局在化するIgSFドメインまたは部分に連結されたバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む免疫調節タンパク質またはコンジュゲートが対象に投与される。場合によっては、結合分子は、抗体もしくはその抗原結合断片を含有するか、または野生型IgSFドメインもしくはそのバリエーションを含有する。

20

【0067】

いくつかの実施形態では、提供される実施形態のいずれかによる免疫調節タンパク質または提供される実施形態のいずれかによるコンジュゲートが対象に投与される。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドが対象に投与される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、提供される実施形態のいずれかによる膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する操作された細胞が対象に投与される。いくつかの実施形態では、任意で感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染し、該膜貫通型免疫調節タンパク質が感染細胞の表面で発現する条件下で、膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする感染性物質を対象に投与する。

30

【0068】

任意のこのような実施形態のいくつかでは、疾患または状態は、炎症性または自己免疫性の疾患または状態である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植、リウマチ性疾患、炎症性消化管疾患、炎症性眼疾患、炎症性神経疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己免疫性血液疾患である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、炎症性腸疾患、移植、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、または乾癬から選択される。任意のこのような実施形態のいくつかでは、バリエーションPD-L2は、対象の免疫応答を減少させるフォーマットで投与される。

40

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1A】提供されるバリエーションIgSFドメイン分子の様々なフォーマットを示す。(1)Fc鎖に融合したバリエーションIgSFドメイン(vIgD);(2)第1のバリエーションIgSFドメイン(第1vIgD)、及び第2のバリエーションIgSFドメイン(第2vIgD)などの第2のIgSFドメインを含有するスタック分子;(3)第1のバリエーションIgSFドメイン(vIgD)、及びNKP30 IgSFドメインなどの腫瘍抗原を標的とするIgSFドメインを含有する腫瘍標的指向性IgSF分子;ならびに(4)抗

50

体に連結されたバリエーション I g S F ドメイン ( v I g D ) ( V - m A b ) を含む可溶性分子を示す。

【図 1 B】提供されるバリエーション I g S F ドメイン分子の様々なフォーマットを示す。細胞の表面で発現したバリエーション I g S F ドメイン ( v I g D ) を含有する膜貫通型免疫調節タンパク質 ( T I P ) を示す。例示的な実施形態では、膜貫通型結合 v I g D の同族結合パートナーは阻害性受容体 (例えば、P D - L 1 ) であり、v I g D (例えば、P D - L 2 v I g D ) を含有する T I P は阻害性受容体の負のシグナル伝達に拮抗またはこれを遮断し、これにより、活性化 T 細胞またはエフェクター T 細胞が得られる。場合によっては、阻害性受容体 ( P D - 1 ) のクラスタリングが活性化受容体 (例えば、C D 2 8 ) に近接する場合、T I P による作動活性が実現する場合がある。

【図 1 C】提供されるバリエーション I g S F ドメイン分子の様々なフォーマットを示す。バリエーション I g S F ドメイン ( v I g D ) が第 1 の T 細胞 (例えば、C A R T 細胞) などの細胞から分泌される分泌型免疫調節タンパク質 ( S I P ) を示す。例示的な実施形態では、分泌型 v I g D の同族結合パートナーは阻害性受容体 (例えば、P D - 1 ) であり、これは、第 1 の細胞によって (例えば、C A R T 細胞などの T 細胞) 及び / または第 2 の細胞 (例えば、C A R T 細胞などの内在性または操作された T 細胞) で発現され得る。同族結合パートナーと S I P が結合すると、S I P は、阻害性受容体を介して負のシグナル伝達に拮抗またはこれを遮断し、これにより、活性化 T 細胞またはエフェクター T 細胞が得られる。全ての場合において、v I g D は、V ドメイン ( I g V ) のみ、細胞外ドメイン ( E C D ) 全体を含む V ドメイン ( I g V ) と C ドメイン ( I g C ) の組み合わせ、または I g S F スーパーファミリーメンバーの I g ドメインの任意の組み合わせであり得る。

【図 2】F c に融合したバリエーション I g S F ドメイン ( v I g D ) ( v I g D - F c ) の活性の例示的な概略図を示し、ここで該 v I g D は P D - L 2 の I g S F ドメインのバリエーションである。図示のように、P D - L 2 の可溶性 v I g D は、その同族結合パートナーと相互作用して P D - L 1 または P D - L 2 と P D - 1 の相互作用を遮断し、これにより P D - 1 阻害性受容体を遮断し、場合により、T 細胞がエフェクター表現型へと分化できるようにする。

【図 3】P D - L 1 または P D - L 2 v I g D である第 1 のバリエーション I g S F ドメイン (第 1 の v I g D ) と、第 2 の阻害性受容体に結合する第 2 の I g S F ドメイン (例えば、第 2 の v I g D ) を含有するマルチターゲットチェックポイント拮抗物質であるスタック分子の例示的な概略図を示す。例示的な概略図では、第 2 の I g S F ドメイン (例えば、第 2 の v I g D ) は C D 1 1 2 または C D 1 5 5 v I g D である。図示のように、第 1 の v I g D 及び第 2 の v I g D は、その同族結合パートナーと相互作用して P D - L 1 または P D - L 2 と P D - 1 の相互作用を遮断し、C D 1 5 5 または C D 1 1 2 と T I G I T 及び / または C D 1 1 2 R の相互作用をそれぞれ遮断し、これにより複数の阻害性受容体を遮断する。

【図 4】バリエーション I g S F ( v I g D ) を腫瘍細胞に局在化させるためのスタック分子の例示的な概略図を示す。このフォーマットでは、スタック分子は、第 1 のバリエーション I g S F ドメイン (第 1 の v I g D ) 及び第 2 の I g S F ドメイン (例えば、第 2 の v I g D ) を含み、ここで該第 2 の I g S F ドメイン (例えば、第 2 の v I g D ) が腫瘍抗原に結合する腫瘍標的 I g S F ドメインである。例示的な腫瘍標的指向性 I g S F ドメインは、N K p 3 0 の I g S F ドメインであり、腫瘍抗原 B 7 - H 6 に結合する。この描写では、第 1 のバリエーション I g S F ドメイン ( v I g D ) は、P D - L 2 の I g S F ドメインのバリエーションである。図示のように、腫瘍細胞表面への腫瘍標的指向性 I g S F ドメインの結合は、腫瘍細胞表面上の第 1 のバリエーション I g S F ドメインを局在化させ、そこで該第 1 のバリエーション I g S F ドメインは、隣接する免疫細胞 (例えば、T 細胞) の表面で発現する同族結合パートナーの 1 つまたは複数と相互作用することができ、阻害性受容体シグナル伝達に拮抗する。

【図 5 A】第 1 のバリエーション I g S F ドメイン (第 1 の v I g D ) 、及び第 2 のバリエーション

10

20

30

40

50

トIgSFドメイン(第2のvIgD)などの第2のIgSFドメインを含有するスタック分子の様々な例示的な配置を示す。図示のように、第1のvIgD及び第2のIgSFドメインは、Fc領域のN末端またはC末端に直接または間接的に独立して連結される。ホモ二量体Fc分子を生成する場合、Fc領域は、細胞内の個々のFc領域の共発現により、適合Fc領域とホモ二量体を形成することができるものである。ヘテロ二量体Fc分子を生成する場合、個々のFc領域には変異(例えば、CH3ドメインの「ノブ・イントゥ・ホール(knob-in-to-hole)」変異)が含まれており、個々のFc領域が細胞内で共発現している場合、ホモ二量体と比較してヘテロ二量体の形成が有利となっている。

【図5B】第1のバリエントIgSFドメイン(第1のvIgD)、第2のバリエントIgSFドメイン(第2のvIgD)などの第2のIgSFドメイン、及び第3のバリエントIgSFドメイン(第3のvIgD)などの第3のIgSFドメインを含有するスタック分子の様々な例示的な配置を示す。図示のように、第1のvIgD、第2のIgSF、及び第3のIgSFドメインは、Fc領域のN末端またはC末端に直接または間接的に独立して連結される。ホモ二量体Fc分子を生成する場合、Fc領域は、細胞内の個々のFc領域の共発現により、適合Fc領域とホモ二量体を形成することができるものである。

【図6】抗体にコンジュゲートしたバリエントIgSFドメイン(vIgD)(V-Mab)の活性の例示的な概略図を示し、ここで該抗体(例えば、抗HER2抗体)は腫瘍細胞の表面の抗原に結合してvIgDを細胞に局在化する。図示のように、腫瘍細胞表面への抗体の結合は、腫瘍細胞表面上にvIgDを局在化させ、そこではvIgDは隣接する免疫細胞(例えば、T細胞)の表面で発現する1つまたは複数のその同族結合パートナーと相互作用することができ、受容体シグナル伝達を作動させるか、またはそれに拮抗する。示される例示的な実施形態では、バリエントIgSFドメイン(vIgD)は、阻害性受容体PD-1に対して結合する(例えば、親和性が増加した)PD-L2のIgSFドメインのバリエントである。PD-L2 vIgDのPD-1阻害性受容体への結合は、阻害性受容体の負のシグナル伝達に拮抗またはこれを遮断し、これにより、活性化T細胞またはエフェクターT細胞が得られる。場合によっては、阻害性受容体(PD-1)のクラスタリングが活性化受容体(例えば、CD28)に近接する場合、TIPによる阻害性受容体活性の作動が実現する場合がある。

【図7A】バリエントIgSF抗体コンジュゲート(V-Mab)の様々な例示的な配置を示す。バリエントIgSFドメインが、抗体の軽鎖のN末端及び/またはC末端に直接的または間接的に連結する様々な配置を示す。

【図7B】バリエントIgSF抗体コンジュゲート(V-Mab)の様々な例示的な配置を示す。バリエントIgSFドメインが、抗体の重鎖のN末端及び/またはC末端に直接的または間接的に連結する様々な配置を示す。

【図7C】バリエントIgSF抗体コンジュゲート(V-Mab)の様々な例示的な配置を示す。図7Aの軽鎖及び図7Bの重鎖が細胞内で共発現される場合の結果のV-Mab配置を示す。

【図8】様々な濃度のPD-L2バリエントFc融合タンパク質でのJurkat/PD-1細胞への結合のMFIを示す。結合試験は、Jurkat/IL-2レポーター細胞を使用して行われ、次いでPD-1を安定して発現するように形質導入した(Jurkat/PD-1)。細胞を記載の濃度の各候補PD-L2バリエントFc融合タンパク質とインキュベートした。対照として、野生型PD-L1の完全な細胞外ドメイン(「PD-L1-FL」)及び野生型PD-L2のIgVドメイン(「野生型PD-L2 IgV」)、または抗PD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)を試験した。非結合抗体を除去し、結合抗体を蛍光コンジュゲートした抗ヒトIgGで検出し、MFIについてフローサイトメトリーにより細胞を分析した。

【図9】ヒト混合リンパ球反応(MLR)で試験した可溶性バリエントPD-L2 IgV-Fc生理活性の結果を示す。およそ10,000個の成熟DC及び100,000個の精製した同種CD4+T細胞を、96ウェル丸底プレート中で、様々な増加させた濃度

10

20

30

40

50

のバリエーションPD-L2 IgV-Fc融合タンパク質と共培養した。無関係のヒトIgGまたは培地のみ(「添加なし」と記載)を陰性対照として使用した。対照として、野生型PDL2-Fc(完全PD-L2細胞外ドメイン)、野生型PD-L2 IgV-Fc、及びまたは陽性対照の抗PD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)のいずれかを評価した。培養上清中のIFN-分泌を分析し、図9に示した。

【図10】ヒト混合リンパ球反応(MLR)で試験した可溶性バリエーションPD-L2 IgV-Fc生理活性の結果を示す。およそ10,000個の成熟DC及び100,000個の精製した同種CD4+T細胞を、96ウェル丸底プレート中で、様々な増加させた濃度のバリエーションPD-L2 IgV-Fc融合タンパク質と共培養した。無関係のヒトIgGまたは培地のみ(「添加なし」と記載)を陰性対照として使用した。対照として、野生型PDL2-Fc(完全PD-L2細胞外ドメイン)、野生型PD-L2 IgV-Fc、及びまたは陽性対照の抗PD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)のいずれかを評価した。培養上清中のIFN-分泌を分析し、図10に示した。

【図11A】形質導入されたCD19 CAR T細胞の上清におけるPD-L2 SIPの検出を示す。

【図11B】形質導入されたHEK-293細胞の上清におけるPD-L2 SIPの検出を示す。

【図12】図12Aは、例示的に試験されたバリエーションPD-L2 SIPで形質導入されたT細胞の増殖試験を示す。図12Bは、再刺激後5日目にELISAにより測定された例示的に試験されたバリエーションPD-L2 SIPで形質導入されたT細胞により放出された上清中のIFN-のレベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0070】

詳細な説明

少なくとも1つの標的リガンド同族結合パートナー(カウンター構造体タンパク質とも呼ばれる)に結合する活性を示すプログラム細胞死1リガンド2(PD-L2、PDCD1L2、PDCD1LG2、分化クラスター273、CD273、またはB7-DCとしても知られる)のバリエーションもしくは変異体またはその特異的結合断片であるかまたはそれを含む免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドと比較して1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、アミノ酸置換、欠失、または付加)を含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換)は、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドのIgSFドメイン(例えば、IgV)においてである。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチド及び免疫調節タンパク質は、少なくとも1つの同族結合パートナー(例えば、PD-1またはRGMbのうちの少なくとも1つ)に対する結合活性または親和性の変化(例えば、増加または減少)を示す。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、可溶性である。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、細胞の表面で発現できる膜貫通型免疫調節タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチド及び1つまたは複数の他の部分またはポリペプチドを含有するコンジュゲートまたは融合体である1つまたは複数の他の免疫調節タンパク質もまた本明細書において提供される。

【0071】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチド及び免疫調節タンパク質は、免疫応答の増加または減少などの免疫学的免疫応答を調節する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチド及び免疫調節タンパク質は、免疫応答の調節不全に関連する疾患または状態の治療に使用することができる。

【0072】

いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドは、共刺激及び/または共抑制シグナル伝達分子との相互作用を介してT細胞の活性化を調節する。一

10

20

30

40

50

般に、抗原特異的 T 細胞の活性化には、一般的に 2 つの異なるシグナルが必要である。第 1 のシグナルは、抗原提示細胞 ( A P C ) 上に存在する主要組織適合複合体 ( M H C ) 関連抗原と T 細胞受容体 ( T C R ) の相互作用によって提供される。第 2 のシグナルは、T C R 結合に対して共刺激性であり、かつ、T 細胞のアポトーシスまたはアネルギーを回避する場合を含む、T 細胞の増殖、分化、及び / または生存に必要である。

#### 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、通常の生理的条件下では、T 細胞媒介性免疫応答は、T 細胞受容体 ( T C R ) による抗原認識によって開始され、共刺激シグナル及び阻害性シグナル ( 例えば、免疫チェックポイントタンパク質 ) のバランスによって調節される。免疫システムは、免疫チェックポイントに依存して自己免疫を防ぎ ( すなわち、自己寛容 ) 、免疫応答時、例えば病原性感染に対する攻撃時に、過度の損傷から組織を保護する。場合によっては、しかしながら、これらの免疫調節タンパク質は、免疫システムを回避するためのメカニズムとして、腫瘍を含む疾患及び状態で調節不全になり得る。

10

#### 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、公知の T 細胞共刺激受容体の中には、プログラム細胞死タンパク質 1 または P D - 1 ( リガンド P D - L 1 ( 分化クラスター 2 7 4 、 C D 2 7 4 、 B 7 ホモログ 1 または B 7 - H 1 としても知られる ) の T 細胞共刺激受容体である ) 及び P D - L 2 ( P D C D 1 L 2 、 P D C D 1 L G 2 、 分化クラスター 2 7 3 、 C D 2 7 3 または B 7 - D C としても知られる ) がある。P D - L 1 及び P D - L 2 は、通常、T 細胞、B 細胞、及び骨髄細胞の表面で発現する。P D - L 1 及び P D - L 2 は、免疫活性化の負の調節因子であり、プログラム死 1 ( P D - 1 ) 受容体との相互作用を介して免疫応答を下方調節することができる。いくつかの態様では、P D - 1 は N K 細胞、ならびに C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞を含む T 細胞で発現し、それにより P D - 1 の結合により活性化細胞の活性化、増殖、及び / または増殖が抑制することができる。しかしながら、P D - L 2 リガンドは、反発性誘導分子 B または R G M b ( D R A G O N または D R G 1 1 応答性軸索誘導及び神経突起伸長とも呼ばれる ) にも結合できる。P D - L 2 の R G M b への結合は、P D - L 2 と P D - 1 の間の相互作用を遮断することができ、これにより、免疫応答を増強または強化する。したがって、場合によっては、P D - L 2 と R G M b 及び P D - L 2 と P D - 1 の相互作用は、免疫応答の調節に逆の影響をもたらす。したがって、P D - 1 及び R G M b は、場合によって多くの疾患及び状態に関連する、炎症応答または抗炎症応答を調節する免疫応答において逆の役割を果たす可能性がある。

20

30

#### 【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、P D - 1 及び R G B b は、免疫応答のモデリングにおいて補完的な役割を果たす可能性がある。いくつかの実施形態では、P D - 1 受容体の活性の増強または抑制は、炎症性及び自己免疫性障害、がん、及びウイルス感染の治療に臨床的意義を有する。場合によっては、しかしながら、そのような受容体の免疫調節効果に介入してそれを変化させる治療法は、免疫学的シナプスの範囲によって課される空間配向要件に加えてサイズ制限によって制約される。いくつかの態様では、抗体薬を含む既存の治療薬は、これらの相互作用の調節に参与する複数の標的タンパク質と同時に相互作用できない場合がある。加えて、場合によっては、既存の治療薬は、免疫応答に拮抗するだけで、作動させる能力を持たない場合がある。加えて、これらの受容体の一方を独立して標的とする薬物間の薬物動態の違いは、治療の過程を通して、このような薬物の組み合わせの希望の血中濃度を適切に維持することに困難をもたらし得る。

40

#### 【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、提供されるバリエーション P D - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、P D - 1 に関連する免疫活性を調節する ( 例えば、増加または減少する ) 。したがって、いくつかの実施形態では、提供されるポリペプチドは、P D - 1 への結合親和性が変化した ( 例えば増加または減少した ) バリエーション P D - L 2 を提供することにより、これらの制約を克服し、これにより受容体の効果を作動または拮抗させる。いくつかの実施形態では、提供されるポリペプチドは、R G M b への結合親和性が変化した (

50

例えば増加または減少した)バリエーションPD-L2を提供することにより、これらの制約を克服し、これによりPD-1及びPD-L2間の相互作用の効果を調節する。これらのバリエーションPD-L2の作製及び使用方法もまた提供される。

【0077】

本明細書で言及される特許、特許出願科学論文及びデータベースを含む全ての出版物は、特許、特許出願、科学論文またはデータベースを含む個々の出版物が参照によって組み込まれると具体的にかつ個別に示されるのと同程度に、あらゆる目的のためにそれら全体が参照によって本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の定義が、参照により本明細書に組み込まれる特許、出願、公開出願、及び他の出版物に記載の定義に反する、または矛盾する場合、本明細書に記載の定義は、参照により本明細書に組み込まれる定義に優先する。

10

【0078】

本明細書において使用されるセクションの見出しは、単に構成を目的としたものであって、記載される主題を限定するものと解釈されるべきではない。

【0079】

I. 定義

別段の定義のない限り、本明細書において使用される全ての専門用語、表記、ならびに他の技術及び科学用語または術語は、請求される主題が属する技術分野の当業者によって通常理解されているものと同じ意味を有することを意図する。場合によっては、通常理解されている意味を有する用語は、明確化のため及び/またはすぐに参照できるように本明細書において定義され、そして本明細書におけるこのような定義の包含は、必ずしも一般的に当技術分野において理解されているものと大きな差異を成すと解釈されるべきではない。

20

【0080】

本明細書を通して使用される用語は、特定の事例において別段限定されない限り、以下のとおり定義される。本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上、別段の明確な指示がない限り、複数形の指示対象を含む。別段の定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術及び科学用語、頭字語、ならびに略語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されているものと同じ意味を有する。別段の指示のない限り、化学名及び生化学名の略称及び記号は、IUPAC-IUB命名法による。別段の指示のない限り、その範囲を規定する値だけでなくその間の全ての整数値も含む。

30

【0081】

「親和性が改変された(親和性改変)」という用語は、免疫グロブリンスーパーファミリードメインの文脈において使用される場合、親の野生型または非改変の(すなわち、非親和性改変)IgSF対照ドメインと比較してその同族結合パートナー(あるいは「カウンター構造体」)のうちの少なくとも1つに対する結合親和性または結合活性が増加または減少するように変化したアミノ酸配列(対応する野生型の親または非改変IgSFドメインと比べて)を有する哺乳動物免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメインを意味する。この文脈では、親和性改変PD-L2 IgSFドメインが含まれる。いくつかの実施形態では、親和性改変IgSFドメインは、野生型または非改変IgSFドメイン中に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれ以上のアミノ酸差異、例えばアミノ酸置換を含有することができる。結合親和性または結合活性の増加または減少は、フローサイトメトリーなどの周知の結合アッセイを使用して決定することができる。Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5:443-453(2005)。また、Linsley et al., Immunity, Vol 1(9):793-801(1994)も参照のこと。タンパク質のその同族結合パートナー(複数可)に対する結合親和性または結合活性の増加は、野生型IgSFドメイ

40

50

ン対照よりも少なくとも10%大きい値となり、いくつかの実施形態では、野生型IgSFドメイン対照値よりも少なくとも20%、30%、40%、50%、100%、200%、300%、500%、1000%、5000%、または10000%大きい値となる。タンパク質のその同族結合パートナーのうちの少なくとも1つに対する結合親和性または結合活性の減少は、対照の90%以下であるが野生型IgSFドメイン対照値の10%以上の値となり、いくつかの実施形態では、野生型IgSFドメイン対照値の80%、70%、60%、50%、40%、30%、または20%以下であるが10%以上の値となる。親和性改変タンパク質は、アミノ酸残基の置換、付加、または欠失によって一次アミノ酸配列が変化している。「親和性改変IgSFドメイン」という用語は、親和性改変IgSFドメインが作製される、いかなる特定の出発組成物または方法のいかなる条件も課すものと解釈されるべきではない。したがって、本発明の親和性改変IgSFドメインは、任意の特定の親和性改変プロセスによって親和性改変IgSFドメインへと変換された野生型IgSFドメインに限定されない。親和性改変IgSFドメインポリペプチドは、例えば、野生型哺乳動物IgSFドメイン配列情報から開始して生成され、次いで、その同族結合パートナーに対する結合性について*in silico*でモデル化され、そして最後に組換えまたは化学合成されて、主題の親和性改変IgSFドメイン組成物を得ることができる。しかし別の一例では、親和性改変IgSFドメインは、野生型IgSFドメインの部位特異的変異誘発によって作製することができる。したがって、親和性改変IgSFドメインは、産物を意味するが、必ずしもいずれかの所与のプロセスによって産生される産物を意味するわけではない。組換え法、化学合成、またはその組み合わせを含む多種多様な技術を用いてもよい。

10

20

## 【0082】

「同種(の)」という用語は、本明細書において使用される場合、ある生物から取り出され、次いで同じ種の遺伝的に異なる生物に注入または養子移入される、細胞または組織を意味する。本発明のいくつかの実施形態では、種は、ネズミまたはヒトである。

## 【0083】

「自家(の)」という用語は、本明細書において使用される場合、同じ生物から取り出され、後に該生物に注入または養子移入される、細胞または組織を意味する。自家の細胞または組織を、例えば、組換えDNA法によって、生物から取り出される天然の細胞または天然の組織とはもはや遺伝的に同一ではないように変化させることができる。例えば、天然の自家T細胞を、膜貫通型免疫調節タンパク質及び/またはキメラ抗原受容体(CAR)を発現する自家の操作された細胞となるように組換えDNA技術によって遺伝子操作することができ、これは、場合によっては、T細胞またはTIL(腫瘍浸潤リンパ球)を操作することを伴う。次いで、操作された細胞を、天然のT細胞が単離された患者へ注入する。いくつかの実施形態では、生物は、ヒトまたはネズミである。

30

## 【0084】

「結合親和性」及び「結合活性」という用語は、本明細書において使用される場合、それぞれ、特異的結合条件下での、あるタンパク質のそのカウンター構造体に対する、特異的結合親和性及び特異的結合活性を意味する。生化学動態では、結合活性は、PD-L2とそのカウンター構造体PD-1及び/またはRGMbとの間のような、個々の非共有結合相互作用の複数の親和性の累積強度を指す。そのため、結合活性は、単一の相互作用の強度を表す親和性とは異なる。親和性が改変されたPD-L2 IgSFドメインを含有するバリエーションPD-L2のそのカウンター構造体に対する結合親和性の増加または減弱化は、非改変PD-L2(例えば、天然または野生型IgSFドメイン(例えばIgVドメイン))を含有する非改変PD-L2)の結合親和性と比較して決定される。結合親和性または結合活性を決定するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005)を参照のこと。いくつかの実施形態では、本発明のバリエーションPD-L2(すなわち、親和性改変IgSFドメインを含有するPD-L2タンパク質)は、フローサイトメトリーによって測定され、結合アッ

40

50

セイにおいて野生型PD-L2対照よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%より大きい平均蛍光強度(MFI)値をもたらす結合親和性でPD-1及び/またはRGMbに特異的に結合する。

【0085】

「生物学的半減期」という用語は、ある物質(例えば、本発明のバリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチド)が、その薬理学的もしくは生理学的活性または濃度の半分を喪失するのに要する時間を指す。生物学的半減期は、物質の排除、排出、分解(例えば、酵素的)、または体の特定の臓器もしくは組織における吸収及び濃縮によって影響を受け得る。いくつかの実施形態では、生物学的半減期は、物質の血漿中濃度がその定常状態レベルの半分に達するのに要する時間(「血漿半減期」)を決定することによって評価することができる。本発明のポリペプチドを誘導体化してその生物学的半減期を延長するために使用することができるコンジュゲートは、当技術分野において公知であり、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、XTEN(伸長組換えペプチド; WO2013130683を参照のこと)、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、脂質(アシル化)、及びポリ-Pro-Ala-Ser(PAS)、ポリグルタミン酸(グルタミル化)を含む。

10

【0086】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、本明細書において使用される場合、少なくともエクトドメイン、膜貫通、及びエンドドメインを含む、哺乳動物細胞上で発現する人工の(すなわち、人造の)膜貫通型タンパク質を指す。任意で、CARタンパク質は、エクトドメインを膜貫通ドメインに共有結合的に連結する「スペーサー」を含む。スペーサーは、多くの場合、ペプチド結合を介してエクトドメインを膜貫通ドメインに連結するポリペプチドである。CARは、典型的には、哺乳動物リンパ球上で発現する。いくつかの実施形態では、CARは、T細胞または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)などの哺乳動物細胞上で発現する。T細胞上で発現するCARは、本明細書において「CAR-T細胞」または「CAR-T」と称される。いくつかの実施形態では、CAR-Tは、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、またはT細胞である。例えば養子細胞移入において臨床的に使用される場合、患者の腫瘍に対する抗原結合特異性を有するCAR-Tは、典型的には、患者から得られるT細胞上で発現するように操作されている。CARを発現する操作されたT細胞は、次いで注入により患者に戻される。したがって、CAR-Tは、多くの場合、自家CAR-Tではあるが、同種CAR-Tも本発明の範囲内に含まれる。CARのエクトドメインは、生理的条件下で標的抗原(例えば、腫瘍特異的抗原)と特異的に結合する抗原結合領域(例えば、抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv))を含む。特異的に結合すると、一連の生化学的事象(すなわち、シグナルトランスダクション)は、CAR-Tの免疫活性の調節をもたらす。したがって、例えば、CAR-Tの抗原結合領域によるその標的抗原への特異的結合によって、細胞傷害性、増殖、またはサイトカイン産生の変化によって反映されるように、T細胞活性の免疫活性の変化を導くことができる。いくつかの実施形態では、CAR-T活性化によるシグナルトランスダクションは、天然の哺乳動物T細胞におけるシグナルトランスダクションに關与するCD3鎖(「CD3-z」)によって達成される。CAR-Tは、T細胞の免疫調節応答をさらに調節する複数のシグナル伝達ドメイン(例えば、CD28、41BB、またはOX40)をさらに含むことができる。CD3-zは、T細胞受容体シグナルトランスダクションに關与する免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)として知られている保存されたモチーフを含む。

20

30

40

【0087】

「総合して」または「総合的」という用語は、in vitroアッセイにおいて2つ以上の本発明のバリエーションPD-L2の存在によって誘導されるサイトカイン産生に関して使用される場合、個々のバリエーションPD-L2によって誘導されるサイトカイン産生に關係なくサイトカイン発現レベル全体を意味する。いくつかの実施形態では、アッセイされるサイトカインは、例えばin vitro初代T細胞アッセイにおけるIFN-で

50

ある。

【0088】

「同族結合パートナー」(「カウンター構造体」と互換的に使用される)という用語は、ポリペプチド(例えば、バリエーションPD-L2のIgSFドメイン)に関して、言及されているポリペプチドが特異的結合条件下で特異的に結合する少なくとも1つの分子(典型的には、天然の哺乳動物タンパク質)を指す。いくつかの態様では、親和性改変IgSFドメインを含有するバリエーションPD-L2は、対応する天然または野生型PD-L2のカウンター構造体に特異的に結合するが、増加または減弱化した親和性で結合する。特異的結合条件下で認識されてその同族受容体に特異的に結合するリガンドの一種は、その受容体のカウンター構造体または同族結合パートナーの一例である。「細胞表面同族結合パートナー」は、哺乳動物細胞表面上で発現する同族結合パートナーである。「細胞表面分子種」は、免疫学的シナプス(IS)を形成する細胞(例えば、哺乳動物細胞)上で発現する及び該細胞によって発現する、免疫学的シナプスのリガンドの同族結合パートナーである。

10

【0089】

本明細書において使用される場合、「コンジュゲート」、「コンジュゲーション」またはそれらの文法上の変形は、当技術分野において公知の任意の接続または連結法によって、2つ以上の化合物と一緒に接続または連結して、別の化合物の形成をもたらすことを指す。それはまた、2つ以上の化合物と一緒に接続または連結することによって生成される化合物を指すこともできる。例えば、1つまたは複数の化学部分またはポリペプチドに直接的または間接的に連結されたバリエーションPD-L2ポリペプチドが例示的なコンジュゲートである。そのようなコンジュゲートは、融合タンパク質、化学的コンジュゲートによって産生されるもの、及び任意の他の方法によって産生されるものを含む。

20

【0090】

「競合的結合」という用語は、本明細書において使用される場合、あるタンパク質が、少なくとも2種の同族結合パートナーに特異的に結合することができるが、1つの同族結合パートナーの特異的結合が第2の同族結合パートナーの同時結合を阻害する(例えば、防止するまたは妨げる)ことを意味する。したがって、場合によっては、あるタンパク質は、2つの同族結合パートナーに同時に結合することはできない。一般的に、競合結合物は、特異的結合のための同じまたは重複した結合部位を含有するが、これは必須要件ではない。いくつかの実施形態では、競合的結合は、第2の同族結合パートナーの特異的結合に起因して、その同族結合パートナーの1つへのタンパク質の特異的結合の測定可能な(部分的または完全な)阻害を引き起こす。ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)アッセイなどの競合的結合を定量する多種多様な方法が公知である。

30

【0091】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、本明細書において使用される場合、あるアミノ酸残基が類似の化学特性(例えば、電荷または疎水性)を備える側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によって置換されている、アミノ酸置換を意味する。類似の化学特性を備える側鎖を有するアミノ酸の群の例としては、1)脂肪族側鎖:グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、2)脂肪族-ヒドロキシル側鎖:セリン及びトレオニン、3)アミド含有側鎖:アスパラギン及びグルタミン、4)芳香族側鎖:フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、5)塩基性側鎖:リジン、アルギニン、及びヒスチジン、6)酸性側鎖:アスパラギン酸及びグルタミン酸、ならびに7)硫黄含有側鎖:システイン及びメチオニンが挙げられる。保存的アミノ酸置換の群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、及びアスパラギン-グルタミンである。

40

【0092】

タンパク質の位置に関して「対応する」という用語、例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置が、例えば配列表に記載の開示された配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の位置に「対応する」という記述は、構造配列アラインメントに基づいてまたは標準的なア

50

ラインメントアルゴリズム（例えば、GAPアルゴリズム）を使用して、開示された配列とのアラインメントによって特定される、ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置を指す。例えば、本明細書に記載される構造アラインメント法による、SEQ ID NO: 31（ECDドメイン）に記載された、またはSEQ ID NO: 55（IgVドメイン）に記載の野生型PD-L2の配列を有する参照配列のアライメントによって、対応する残基を決定することができる。配列をアライメントすることによって、当業者は、例えば保存されているアミノ酸残基及び同一のアミノ酸残基を、基準として使用して、対応する残基を特定することができる。

#### 【0093】

「低下（減少）させる」または「減弱（化）する」または「抑制する」という用語は、本明細書において使用される場合、統計的に有意な量の低下（減少）を意味する。低下（減少）は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であることができる。

10

#### 【0094】

「誘導体」または「誘導体化されている」という用語は、その治療効果を保持または増強させながら、生物学的半減期、バイオアベイラビリティ、免疫原性、溶解性、毒性、効力、または有効性などの特性を変化させるために、タンパク質を直接または間接的に組成物に共有結合的に連結させることによる、タンパク質の改変を指す。本発明の免疫調節ポリペプチドの誘導体は、本発明の範囲内であり、例えば、グリコシル化、PEG化、脂質化、またはFc融合によって作製することができる。

20

#### 【0095】

本明細書において使用される場合、「ドメイン」（典型的には、3以上、一般的に5または7以上のアミノ酸、例えば10~200のアミノ酸残基の配列）は、分子の他の部分と構造的及び/または機能的に異なりかつ特定可能な分子（例えば、タンパク質またはコーディング核酸）の一部を指す。例えば、ドメインは、1つまたは複数の構造モチーフで構成されているタンパク質内で独立してフォールド構造を形成することができ、及び/または結合活性などの機能活性によって認識される、ポリペプチド鎖の部分を含む。タンパク質は、1つまたは2つ以上の別個のドメインを有することができる。例えば、ドメインは、関連ファミリーメンバーに対する一次配列または構造の相同性、例えばモチーフに対する相同性によって、特定、定義、または識別することができる。別の例では、ドメインは、その機能（例えば、同族結合パートナーなどの生体分子と相互作用する能力）によって識別することができる。ドメインが独立してまたは別の分子に融合して活動する（例えば、結合）ことができるように、ドメインは、独立して生物学的機能または活性を示すことができる。ドメインは、線状アミノ酸配列または非線状アミノ酸配列であることができる。多くのポリペプチドは、複数のドメインを含有する。このようなドメインは、公知であり、かつ、当業者によって特定することができる。本明細書における例示のため、定義が提供されるが、名称によって特定のドメインを認識することは十分に当技術分野の技能の範囲内であると理解される。必要であれば、ドメインを特定するために適切なソフトウェアを用いることができる。

30

#### 【0096】

「エクトドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、膜タンパク質（例えば、膜貫通型タンパク質）の、小胞膜の外側にある領域を指す。エクトドメインは、多くの場合、リガンドまたは細胞表面受容体に、例えば当該リガンドまたは当該細胞表面受容体に特異的に結合する結合ドメインを介して特異的に結合する結合ドメインを含む。細胞の膜貫通型タンパク質のエクトドメインは、代替的に細胞外ドメインと称される。

40

#### 【0097】

「有効量」または「治療的有效量」という用語は、単独（すなわち、単剤療法として）または追加の治療用物質との組み合わせのいずれかで*ex vivo*（患者由来の細胞との接触による）または*in vivo*（患者への投与による）で投与された場合、例えば疾患の症状及び/または病因を改善または排除することによって疾患進行の統計的に有意

50

な減少をもたらす、本発明の治療用組成物（タンパク質組成物または細胞組成物を含む）の量及び/または濃度を指す。有効量は、疾患または障害と関連する少なくとも1つの症状または生物学的応答もしくは影響を緩和する、低下させる、または軽減する、疾患もしくは障害の進行を防止する、または患者の身体機能を改善する量であり得る。細胞療法の場合、有効量は、養子細胞療法により患者に投与される細胞の有効用量または有効数である。いくつかの実施形態では、患者は、哺乳動物、例えば非ヒト霊長類またはヒト患者である。

**【0098】**

「エンドドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、いくつかの膜タンパク質（例えば、膜貫通型タンパク質）において見いだされる、細胞表面膜によって画定される内部空間内に延びる領域を指す。哺乳動物細胞では、エンドドメインは、膜タンパク質の細胞質領域である。細胞では、エンドドメインは、細胞内構成成分と相互作用し、かつシグナルトランスダクションにおいて役割を果たすことができ、したがって、場合によっては、細胞内シグナル伝達ドメインであることができる。細胞の膜貫通型タンパク質のエンドドメインは、代替的に細胞質ドメインと称され、これは、場合によっては、細胞質シグナル伝達ドメインであることができる。

10

**【0099】**

「増強された」または「増加（向上）した」という用語は、本明細書において哺乳動物リンパ球の免疫活性の増加の文脈で使用される場合、リンパ球の1つまたは複数の活性の増加を意味する。活性の増加は、例えば統計的に有意な量などでの、細胞生存、細胞増殖、サイトカイン産生、またはT細胞の細胞傷害性のうちの1つまたは複数の増加であり得る。いくつかの実施形態では、増加した免疫活性への言及は、インターフェロン（IFN）産生を、例えば統計的に有意な量、増加させることを意味する。いくつかの実施形態では、免疫活性を、混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおいて評価することができる。MLRアッセイを実行する方法は、当技術分野において公知である。Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9): 846-56。リンパ球の活性を評価する他の方法は、本明細書に記載される任意のアッセイを含め、当技術分野において公知である。いくつかの実施形態では、増強は、非ゼロ対照値よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、400%、または500%大きい増加であることができる。

20

30

**【0100】**

「操作された細胞」という用語は、本明細書において使用される場合、ヒトによる介入（例えば、組換えDNA法またはウイルス形質導入法）によって遺伝子操作された哺乳動物細胞を指す。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えばリンパ球（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）または抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）である。細胞は、患者由来の初代細胞であってもよいし、細胞株であってもよい。いくつかの実施形態では、本発明の操作された細胞は、バリエーションPD-L2ポリペプチドが特異的に結合するPD-1及び/またはRGMbを発現するT細胞の免疫活性を調節するように操作された本発明のバリエーションPD-L2を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2は、膜貫通ドメイン（例えば、PD-L2膜貫通ドメイン）に連結されたIgVドメインを含有する細胞外ドメインまたはその一部分を含有し、任意で細胞内シグナル伝達ドメインを含有する、膜貫通型免疫調節タンパク質（以下「TIP」と称される）である。場合によっては、TIPは、異種の細胞質シグナル伝達ドメインまたはエンドドメインを含有するキメラ受容体としてフォーマット化される。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、本明細書に記載される免疫調節タンパク質を発現及び分泌することができる。提供される操作された細胞の中には、操作されたT細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）をさらに含有する細胞もある。

40

**【0101】**

「操作されたT細胞」という用語は、本明細書において使用される場合、ヒトによる介入（例えば、組換えDNA法またはウイルス形質導入法）によって遺伝子操作されたT細胞

50

胞（例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞（あるいは、細胞傷害性Tリンパ球またはCTL）、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、メモリーT細胞、またはT細胞）を指す。操作されたT細胞は、本発明のバリエーションPD-L2膜貫通型免疫調節タンパク質（TIP）または分泌型免疫調節タンパク質（SIP）を含み、本発明のバリエーションPD-L2膜貫通型免疫調節タンパク質（TIP）または分泌型免疫調節タンパク質（SIP）は該T細胞上で発現し、操作されたT細胞自体の免疫活性を調節するか、または該T細胞上で発現するバリエーションPD-L2が特異的に結合する哺乳動物細胞の免疫活性を調節するように操作される。

#### 【0102】

「操作されたT細胞受容体」または「操作されたTCR」という用語は、選択され、クローニングされ、及び/またはその後T細胞の集団に導入される（多くの場合、養子免疫療法に使用される）、主要組織適合複合体（MHC）/ペプチド標的抗原に対して所望の親和性で特異的に結合するように操作されたT細胞受容体（TCR）を指す。操作されたTCRとは対照的に、CARは、MHC依存的に標的抗原に結合するように操作される。

10

#### 【0103】

「～上で発現する」という用語は、本明細書において使用される場合、細胞（例えば哺乳動物細胞）の表面で発現するタンパク質に関して使用される。したがって、当該タンパク質は膜タンパク質として発現する。いくつかの実施形態では、発現する当該タンパク質は、膜貫通型タンパク質である。いくつかの実施形態では、当該タンパク質は、小分子部分（例えば、薬物または検出可能標識）にコンジュゲートされる。細胞の表面で発現するタンパク質は、哺乳動物細胞上で発現する細胞表面タンパク質（例えば細胞表面受容体）を含むことができる。

20

#### 【0104】

用語「半減期延長部分」は、ポリペプチド融合体または化学的コンジュゲートの一部分であって、そのように該部分にコンジュゲートされていないタンパク質の半減期と比較して哺乳動物血清中に循環するタンパク質の半減期を延長する部分を指す。いくつかの実施形態では、半減期は、1.2倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、もしくは6.0倍より長く、または約1.2倍、約1.5倍、約2.0倍、約3.0倍、約4.0倍、約5.0倍、もしくは約6.0倍より長く延長される。いくつかの実施形態では、半減期は、半減期延長部分を有さないタンパク質と比較して、*in vivo*投与後、6時間超、12時間超、24時間超、48時間超、72時間超、96時間超、または1週間超延長される。半減期は、タンパク質がその濃度、量、または活性の半分を喪失するのに要する時間を指す。半減期は、例えば、ELISAアッセイまたは活性アッセイを使用することによって決定することができる。例示的な半減期延長部分には、Fcドメイン、多量体化ドメイン、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、XTEN（伸長組換えペプチド；WO2013130683を参照のこと）、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）、脂質（アシル化）、及びポリ-Pro-Ala-Ser（PAS）、及びポリグルタミン酸（グルタミル化）が含まれる。

30

40

#### 【0105】

「免疫学的シナプス」または「免疫シナプス」という用語は、本明細書において使用される場合、MHC I（主要組織適合複合体）またはMHC IIを発現する哺乳動物細胞（例えば、抗原提示細胞または腫瘍細胞）と、哺乳動物リンパ球（例えば、エフェクターT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞）との間の界面を意味する。

#### 【0106】

免疫グロブリン分子のFc（結晶性断片）領域またはドメイン（Fcポリペプチドとも呼ばれる）は、主に免疫グロブリン重鎖の定常領域に相当し、抗体のエフェクター機能（複数可）を含む様々な機能に関与している。Fcドメインは、免疫グロブリン分子のヒンジドメインの一部または全てとCH2ドメイン及びCH3ドメインとを含有する。Fc

50

ドメインは、1つまたは複数のジスルフィド結合によって接続された2つのポリペプチド鎖の二量体を形成することができる。いくつかの実施形態では、Fcは、エフェクター機能を促す活性が低減された（例えば、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、またはそれ以上低減された）バリエーションFcである。いくつかの実施形態では、Fc領域中のアミノ酸置換への参照は、特定のSEQ ID NOに基づいて記載されない限りは、EU番号付けシステムによる。EU番号付けは公知であり、最近更新されたIMGT Scientific Chart（IMGT（登録商標）、すなわちinternational Immunogenetics information system（登録商標）、[http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IgHnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHnber.html)（作成日：2001年5月17日、最終更新日：2013年1月10日）及びKabata, E. A. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242（1991）に報告されているEUインデックスに従う。

10

**【0107】**

免疫グロブリンFc融合体（「Fc融合体」）、例えば免疫調節Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンのFc領域に作動可能に連結された1つまたは複数のポリペプチド（または1つまたは複数の小分子）を含む分子である。Fc融合体は、例えば抗体のFc領域（エフェクター機能及び薬物動態を促す）及びバリエーションPD-L2を含み得る。免疫グロブリンFc領域は、1つまたは複数のバリエーションPD-L2または小分子（融合パートナー）に間接的または直接的に連結され得る。様々なリンカーが当技術分野において公知であり、任意でこれを使用して、Fcを融合パートナーに連結させてFc融合体を生成することができる。同一種のFc融合体を、二量体化してFc融合ホモ二量体を形成することも、非同種を使用してFc融合ヘテロ二量体を形成することもできる。いくつかの実施形態では、Fcは、哺乳動物Fc、例えばネズミまたはヒトFcである。

20

**【0108】**

「宿主細胞」という用語は、組換え発現ベクターによってコードされているタンパク質を発現させるために使用することができる細胞を指す。宿主細胞は、原核生物、例えば、E. coliであってよく、または真核生物、例えば、単細胞真核生物（例えば、酵母または他の真菌類）、植物細胞（例えば、タバコまたはトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞）、もしくはハイブリドームであってよい。宿主細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはそれらの誘導体、例えば無血清培地で成長するVeggie CHO及び関連細胞株またはDHFR欠損したCHO系統DX-B11が挙げられる。別の例は、ヒト内皮腎（Human Endothelial Kidney）293細胞またはその誘導体である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞）である。

30

40

**【0109】**

「免疫グロブリン」（「Ig」と略記される）という用語は、本明細書において使用される場合、5種のヒトクラスの抗体、すなわちIgA（サブクラスIgA1及びIgA2を含む）、IgD、IgE、IgG（サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む）、及びIgMのいずれかを含む哺乳動物免疫グロブリンタンパク質を指す。該用語はまた、完全または部分的合成（例えば、組換えまたは化学合成）であろうと天然に産生されようと全長未満である免疫グロブリン、例えば抗原結合断片（Fab）、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>を含有する可変断片（Fv）、1つの鎖中で一緒に連結されたV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>を含有する単鎖可変断片（scFv）、ならびに他の抗体V領域断片、例えば、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、dsFvダイアボディ、Fc、及びFdポリペプチド断

50

片を含む。ホモ二重特異性及びヘテロ二重特異性の二重特異性抗体は、該用語の意味の範囲内に含まれる。

【0110】

「免疫グロブリンスーパーファミリー」または「IgSF」という用語は、本明細書において使用される場合、細胞の、認識、結合、または接着プロセスに關与する、細胞表面及び可溶性タンパク質の群を意味する。分子は、免疫グロブリン（すなわち、抗体）と共通の構造的特徴に基づいて、このスーパーファミリーのメンバーとして類別され、これらは全て、免疫グロブリンドメインまたはフォールドとして公知のドメインを保有する。IgSFのメンバーは、免疫系の、細胞表面抗原受容体、共受容体及び共刺激分子、リンパ球への抗原提示に關与する分子、細胞接着分子、ある種のサイトカイン受容体ならびに細胞内筋タンパク質を含む。これらは、通常、免疫系における役割と關連する。免疫学的シナプス中のタンパク質は、IgSFのメンバーであることが多い。IgSFはまた、機能のような共通の特性に基づいて「サブファミリー」に分類することができる。このようなサブファミリーは、典型的には、4～30のIgSFメンバーからなる。

10

【0111】

「IgSFドメイン」または「免疫グロブリンドメイン」または「Igドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、IgSFタンパク質の構造ドメインを指す。Igドメインは、免疫グロブリン分子に因んで命名されている。これらは、約70～110アミノ酸を含有し、それらのサイズ及び機能に従って類別される。Igドメインは、逆平行鎖の2つのシートによって形成されるサンドイッチ様構造を有する特徴的なIgフォールドを保有する。サンドイッチの内側の疎水性アミノ酸間の相互作用ならびにB及びF鎖中のシステイン残基間で形成される高度に保存されているジスルフィド結合が、Igフォールドを安定化させる。Igドメインの一端は、抗体のそれらのリガンドに対する特異性にとって重要な相補性決定領域と呼ばれる部分を有する。Ig様ドメインは、IgV、IgC（IgC1またはIgC2のいずれかであることができる）、またはIgIとして（クラスに）分類することができる。ほとんどのIgドメインは、可変（IgV）ドメインまたは定常（IgC）ドメインのいずれかである。9つの鎖を有するIgVドメインは、一般的に7つの鎖を有するIgCドメインより長い。IgSFのいくつかのメンバーのIgドメインは、アミノ酸配列中のIgVドメインと似ているが、IgCドメインとサイズが類似している。これらは、IgC2ドメインと呼ばれ、一方で、標準的なIgCドメインは、IgC1ドメインと呼ばれる。T細胞受容体（TCR）鎖は、細胞外部分における2つのIgドメイン（1つはN末端におけるIgVドメイン及び1つは細胞膜に隣接するIgC1ドメイン）を含有する。PD-L2は、2つのIgドメイン、すなわち1つのIgV及び1つのIgCを含有する。

20

30

【0112】

「IgSF種」という用語は、本明細書において使用される場合、同一のまたは実質的に同一の一次アミノ酸配列を有するIgSFメンバータンパク質の集団を意味する。各哺乳動物免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）メンバーは、そのIgSFメンバーに属する全てのIgSF種に固有の識別を規定する。したがって、各IgSFファミリーメンバーは、他のIgSFファミリーメンバーと比べて固有であり、したがって、特定のIgSFファミリーメンバーの各種は、別のIgSFファミリーメンバー種と比べて固有である。それにもかかわらず、同じIgSF種の分子間の相違が、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、及び脂質化などの翻訳後修飾の差異が原因で生じ得る。加えて、遺伝子多型が原因の単一のIgSF種内の小さな配列差異は、例えばタンパク質分解的切断が原因のIgSF種の野生型短縮形態と同様、単一のIgSF種内の別の形態の相違を成す。「細胞表面IgSF種」は、細胞（一般的に哺乳動物細胞）の表面で発現するIgSF種である。

40

【0113】

「免疫活性」という用語は、本明細書においてT細胞のような哺乳動物リンパ球の文脈で使用される場合、1つまたは複数の細胞生存、細胞増殖、サイトカイン産生（例えば、

50

インターフェロン - )、またはT細胞傷害性活性を指す。場合によっては、免疫活性は、ケモカインまたはインターロイキンのようなサイトカインの細胞発現を意味することができる。免疫活性の増強または抑制を決定するためのアッセイは、培養上清中のインターフェロン - サイトカインレベルを測定するMLR (混合リンパ球反応)アッセイ (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9): 846-56)、SEB (ブドウ球菌エンテロトキシンB (staphylococcal enterotoxin B)) T細胞刺激アッセイ (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9): 846-56)、及び抗CD3 T細胞刺激アッセイ (Li and Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104)を含む。T細胞活性化は、IFN - サイトカインの分泌と関連するため、これらのin vitroヒトT細胞アッセイからの培養上清中のIFN - レベルの検出は、市販のELISAキットを使用してアッセイすることができる (Wu et al., Immunol Lett 2008 Apr 15; 117(1): 57-62)。免疫応答の誘導は、静止リンパ球と比べて免疫活性の増加をもたらす。本明細書において提供されるとおりの免疫調節タンパク質 (例えば、親和性改変IgSFドメインを含有するパリアントPD-L2ポリペプチド)は、初代T細胞アッセイにおいて、野生型IgSFメンバーまたはIgSFドメイン対照と比べてIFN - (インターフェロン - )発現を、いくつかの実施形態において増加させることができ、または、その他の実施形態において減少させることができる。当業者は、IFN - 発現の増加を決定するために使用される初代T細胞アッセイのフォーマットが、IFN - 発現の減少についてアッセイするために用いられるフォーマットと異なり得ることを理解するだろう。初代T細胞アッセイにおいてIFN - 発現を変化させる本発明の免疫調節タンパク質または親和性改変IgSFドメインの能力についてアッセイする際に、混合リンパ球反応 (MLR)アッセイを使用することができる。好都合なことに、場合によっては、本発明の可溶性形態の親和性改変IgSFドメインを用いて、IFN - 発現を増減させるその能力をMLRにおいて決定することができる。あるいは、共固定アッセイを使用することができる。共固定アッセイでは、T細胞受容体シグナル (いくつかの実施形態において、抗CD3抗体によって提供される)を共固定された親和性改変IgSFドメイン、例えばパリアントPD-L2と併用して、野生型IgSFドメイン対照と比べてIFN - 発現を増減させる能力を決定する。パリアントPD-L2膜貫通型免疫調節タンパク質の活性を評価することを含む、操作された細胞の免疫活性をアッセイする方法は、当技術分野において公知であり、限定されないが、抗原刺激後にT細胞を増殖させる能力、再刺激の非存在下でT細胞の増殖を持続する能力、及び適切な動物モデルにおける抗がん活性を含む。アッセイはまた、標準的な<sup>51</sup>Cr放出アッセイ (例えば、Milone et al., (2009) Molecular Therapy 17; 1453-1464を参照のこと)もしくはフローベース細胞傷害性アッセイ、またはインピーダンス細胞傷害性アッセイ (Peper et al., (2014) Journal of Immunological Methods, 405: 192-198)を含む、細胞傷害性を評価するアッセイを含む。

#### 【0114】

「免疫調節ポリペプチド」または「免疫調節タンパク質」は、免疫活性を調節するポリペプチドまたはタンパク質分子である。免疫応答の「調節」または「調節すること」とは、免疫活性の増加または低減のいずれかを意味する。免疫調節タンパク質は、単一のポリペプチド鎖であるか、または (例えば、鎖間ジスルフィド結合によって)互いに共有結合された少なくとも2つのポリペプチド鎖の多量体 (二量体またはより高次の多量体)であることができる。したがって、単量体、二量体、及びより高次の多量体ポリペプチドは、その定義された用語の範囲内である。多量体ポリペプチドは、(同一ポリペプチド鎖の)ホモ多量体または(非同ーポリペプチド鎖の)ヘテロ多量体であることができる。本発明の免疫調節タンパク質は、パリアントPD-L2を含む。

#### 【0115】

10

20

30

40

50

「増加させる」という用語は、本明細書において使用される場合、統計的に有意な量増加させることを意味する。増加は、非ゼロ対照値よりも少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、またはより大きい増加であることができる。

【0116】

PD-L2の「アイソフォーム」は、アミノ酸配列が異なる、複数の天然に存在するPD-L2ポリペプチドのうちの一つである。アイソフォームは、単一の遺伝子によって発現されるRNA転写物のスプライスバリエーションの産物であることも、遺伝子重複から生じ得るような機能的に類似のタンパク質を生成する高度に類似するが異なる遺伝子の発現産物であることもできる。本明細書において使用される場合、用語PD-L2の「アイソフォーム」は、PD-L2遺伝子の異なるアレルの産物も指す。

10

【0117】

「リンパ球」という用語は、本明細書において使用される場合、哺乳動物免疫系における白血球の3つのサブタイプのいずれかを意味する。これらは、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）（細胞媒介性の細胞傷害性自然免疫において機能する）、T細胞（細胞媒介性の細胞傷害性獲得免疫に関する）、及びB細胞（体液性の抗体による適応免疫に関する）を含む。T細胞は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、またはT細胞を含む。また、自然リンパ球（ILC）もリンパ球の定義の範囲内に含まれる。

20

【0118】

「哺乳動物」または「患者」という用語は、具体的に、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザル、イヌ、ネコ、マウス、またはラットのうちの少なくとも1つへの言及を含む。

【0119】

「膜タンパク質」という用語は、本明細書において使用される場合、生理的条件下で脂質二重層に直接または間接的に結合するタンパク質を意味する。膜を形成する脂質二重層は、生体膜、例えば真核生物（例えば、哺乳動物）の細胞膜または人工の（すなわち、人造の）膜、例えばリポソーム上に見いだされる膜であることができる。脂質二重層への膜タンパク質の結合は、共有結合によるか、または非共有結合的相互作用（例えば、疎水性相互作用もしくは静電相互作用）によるものであることができる。膜タンパク質は、内在性膜タンパク質または表在性膜タンパク質であることができる。表在性膜タンパク質である膜タンパク質は、脂質二重層に非共有結合するか、または内在性膜タンパク質に非共有結合する。表在性膜タンパク質は、哺乳動物において生理的な範囲の条件下で表在性膜タンパク質が脂質二重層と会合する及び/または脂質二重層から解離することができるように、脂質二重層への一時的な結合を形成する。表在性膜タンパク質とは対照的に、内在性膜タンパク質は、哺乳動物において生理的な範囲の条件下で内在性膜タンパク質が脂質二重層への結合から解離しないように、膜の脂質二重層への事実上恒久的な結合を形成する。膜タンパク質は、脂質二重層の層によって膜への結合を形成することができる（モノトピック型）か、または膜の両方の層によって結合することができる（ポリトピック型）。1つの脂質二重層とだけ相互作用する内在性膜タンパク質は、「内在性モノトピック型タンパク質」である。脂質二重層の両方と相互作用する内在性膜タンパク質は、「内在性ポリトピック型タンパク質」であり、あるいは、本明細書において「膜貫通型タンパク質」と称される。

30

40

【0120】

「調節すること」または「調節する」という用語は、本明細書において免疫応答（例えば哺乳動物の免疫応答）の文脈で使用される場合、本発明のバリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドの投与の結果としてまたは本発明の免疫調節タンパク質（例えば、バリエーションPD-L2膜貫通型免疫調節タンパク質）を発現する操作された細胞の投与の結果として起こる、既存のまたは潜在的な免疫応答の任意の変化（例えば、増加または減少）を指す。したがって、調節は、バリエーションPD-L2またはそのような免疫調節ポリ

50

ペプチドを発現する細胞を含む免疫調節タンパク質の投与の非存在下で起こるまたは存在する免疫応答と比較した、免疫応答の変化（例えば、増加または減少）を指す。そのような調節は、免疫細胞の免疫活性の度合いもしくは程度の任意の誘導、活性化、抑制、または変化を含む。免疫細胞は、B細胞、T細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞、NK T細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）、及び非プロフェッショナル抗原提示細胞、ならびに炎症細胞（好中球、マクロファージ、単球、好酸球、及び好塩基球）を含む。調節は、既存の免疫応答、発生段階にある免疫応答、潜在的な免疫応答に、または免疫応答を誘導する、調節する、それに影響を及ぼす、もしくは応答する能力に付与される任意の変化を含む。調節は、免疫応答の一部としての、免疫細胞における遺伝子、タンパク質及び/または他の分子の発現及び/または機能の任意の変化を含む。免疫応答の調節または免疫活性の調節は、例えば、以下を含む：免疫細胞の排除、欠失、または隔離；自己反応性リンパ球、抗原提示細胞、または炎症細胞のような他の細胞の機能的な能力を調節することができる免疫細胞の誘導または生成；免疫細胞における不応答状態（すなわち、アネルギー）の誘導；免疫細胞の活性または機能を増強または抑制すること（これらの細胞によって発現されるタンパク質のパターンを変化させることを非限定的に含む）。例としては、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、転写因子、キナーゼ、共刺激分子、もしくは他の細胞表面受容体などの特定の分子クラスの産生及び/または分泌の変化、またはこれらの調節事象の任意の組み合わせが挙げられる。調節は、例えば、初代T細胞アッセイにおける野生型PD-L2対照と比べたIFN-（インターフェロン）発現の変化によって評価することができる（Zhao and Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan 1; 340(1): 132-138を参照のこと）。調節は、例えば、野生型PD-L2膜貫通型タンパク質によって操作した細胞と比べた、操作された細胞の免疫活性の変化、例えば操作された細胞の細胞傷害性活性の変化または操作された細胞のサイトカイン分泌の変化によって、評価することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0121】

「分子種」という用語は、本明細書において使用される場合、同一のまたは実質的に同一の一次アミノ酸配列を備えたタンパク質の集団を意味する。各哺乳動物免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）メンバーは、同一のまたは実質的に同一の分子種の集合体を規定する。したがって、例えば、ヒトPD-L2はIgSFメンバーであり、各ヒトPD-L2分子はPD-L2の一分子種である。同じ分子種の分子間の相違が、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、及び脂質化などの翻訳後修飾の差異が原因で起こり得る。加えて、遺伝子多型が原因の単一の分子種内の小さな配列差異は、単一の分子種内の別の形態の相違を成し、例えばタンパク質分解的切断が原因の単一の分子種の野生型短縮形態も同様である。「細胞表面分子種」は、哺乳動物細胞の表面で発現する分子種である。各々がISを形成する2つの哺乳動物細胞のうち的一方のみ、またはもう一方のみに存在する（しかし両方ではない）、2つ以上の異なるタンパク質種は、互いに「シス」または「シス配置」にあると言われている。第1のものがISを形成する2つの哺乳動物細胞のうち第1の細胞のみに存在し、第2のものがISを形成する2つの哺乳動物細胞のうち第2の細胞のみに存在する、2つの異なるタンパク質種は、「トランス」または「トランス配置」にあると言われている。各々がISを形成する2つの哺乳動物細胞の両方に存在する、2つの異なるタンパク質種は、これらの細胞上でシス及びトランスの両配置にある。

#### 【0122】

「多量体化ドメイン」という用語は、それぞれが同じまたは異なる多量体化ドメインであることができる相補的多量体化ドメイン（例えば、第1の多量体化ドメイン及び第2の多量体化ドメイン）を含有する、ポリペプチド分子と1つまたは複数の追加のポリペプチド分子との安定した相互作用を促進するアミノ酸配列を指す。相補的多量体化ドメイン間の相互作用、例えば、第1の多量体化ドメインと第2の多量体化ドメイン間の相互作用は、安定なタンパク質-タンパク質相互作用を形成して、ポリペプチド分子と追加のポリペプチド分子の多量体を産生する。場合によっては、多量体化ドメインは同じであり、それ

自体と相互作用して2つのポリペプチド鎖間に安定したタンパク質 - タンパク質相互作用を形成する。一般的に、ポリペプチドは、多量体化ドメインに直接的または間接的に接続される。例示的な多量体化ドメインは、免疫グロブリン配列またはその部分、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域、及び適合性のあるタンパク質 - タンパク質相互作用ドメインを含む。多量体化ドメインは、例えば、免疫グロブリン定常領域またはドメイン、例えば、I g G ( I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4 サブタイプを含む)、I g A、I g E、I g D及びI g Mならびにそれらの改変形態由来の、F cドメインまたはその部分であることができる。

#### 【0123】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の核酸残基（例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド）のポリマーを指す。特に限定されない限り、該用語は、公知の天然ヌクレオチドの類似体を含む核酸、及びそれと類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様な様式で代謝される核酸を包含する。別段の指示のない限り、特定の核酸配列はまた、明示的に示されている配列（「参照配列」）だけでなく、保存的に改変されたそれらのバリエーション（例えば、縮重コドン置換）及び相補的ヌクレオチド配列も暗に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの第3の位置が混合塩基及び/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成してもよい。核酸またはポリヌクレオチドという用語は、遺伝子によってコードされているcDNAまたはmRNAを包含する。

#### 【0124】

「非競合的結合」という用語は、本明細書において使用される場合、少なくとも2つの同族結合パートナーに同時に特異的に結合するタンパク質の能力を意味する。したがって、タンパク質は、少なくとも2つの異なる同族結合パートナーに同時に結合することができるが、結合相互作用は、同じ期間である必要はないため、場合によっては、タンパク質は、同族結合パートナーの1つにのみ特異的に結合される。いくつかの実施形態では、結合は、特定の結合条件下で起こる。いくつかの実施形態では、同時結合は、1つの同族結合パートナーの結合が第2の同族結合パートナーへの同時結合を実質的に阻害しないようなものである。いくつかの実施形態では、非競合的結合は、タンパク質上のその結合部位への第2の同族結合パートナーの結合が、タンパク質上のその結合部位への第1の同族結合パートナーの結合に置き換わらないことを意味する。非競合的結合を評価する方法は、Perez de La Lastra et al., Immunology, 1999 Apr; 96(4): 663-670に記載されている方法など、当技術分野において周知である。場合によっては、非競合的相互作用において、第1の同族結合パートナーは、第2の同族結合パートナーの相互作用部位と重複しない相互作用部位で、第2の同族結合パートナーの結合が第1の同族結合パートナーの結合と直接干渉しないように、特異的に結合する。したがって、第2の同族結合パートナーの結合による同族結合パートナーの結合へのいかなる影響も、第1の同族結合パートナーの結合との直接的な干渉以外の機序を介するものである。例えば、酵素 - 基質相互作用においては、非競合的阻害剤は、酵素の活性部位以外の部位に結合する。非競合的結合は、第2の同族結合パートナーが、第1の同族結合パートナーの結合と重複しない相互作用部位で特異的に結合するが、第1の相互作用部位が第1の同族結合パートナーに占有されているときだけ第2の相互作用部位に結合する、非競合的な結合相互作用を包含する。

#### 【0125】

「薬学的組成物」という用語は、哺乳動物対象、多くの場合ヒトにおける、薬学的用途に好適な組成物を指す。薬学的組成物は、典型的には、有効量の活性剤（例えば、バリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドまたはバリエーションPD-L2膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する操作された細胞）、及び担体、賦形剤、または希釈剤を含む。担体、賦形剤、または希釈剤は、それぞれ、典型的には、薬学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤である。

10

20

30

40

50

## 【0126】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用され、かつ、ペプチド結合を介して連結されている2つ以上のアミノ酸の分子鎖を指す。該用語は、その産物の特定の長さを指すわけではない。したがって、「ペプチド」及び「オリゴペプチド」は、ポリペプチドの定義内に含まれる。該用語は、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。該用語はまた、合成することができるか、または公知のタンパク質操作技術を使用して組換え発現することができる、1つまたは複数のアミノ酸類似体または非標準アミノ酸または非天然アミノ酸が含まれる分子も含む。加えて、タンパク質は誘導体化されていてもよい。

## 【0127】

「初代T細胞アッセイ」という用語は、本明細書において使用される場合、インターフェロン- $\gamma$ （「IFN- $\gamma$ 」）発現を測定するための*in vitro*アッセイを指す。多種多様なこのような初代T細胞アッセイが当技術分野において公知である。好ましい実施形態では、使用されるアッセイは、抗CD3共固定アッセイである。このアッセイでは、初代T細胞が、追加の組換えタンパク質と共にまたはそれなしで固定された抗CD3によって刺激される。ある時点（通常24～72時間）で培養上清を採取する。別の実施形態では、使用されるアッセイは、MLRである。このアッセイでは、初代T細胞が、同種他家APCで刺激される。ある時点（通常24～72時間）で培養上清を採取する。標準的なELISA技術によって培養上清中のヒトIFN- $\gamma$ レベルを測定する。市販のキットが供給業者から入手可能であり、製造業者の推奨に従ってアッセイを実施する。

## 【0128】

「精製された」という用語は、核酸（例えば、本発明の免疫調節タンパク質をコードする）に適用される場合、一般的に、当技術分野において周知の分析技術によって決定した他の成分を実質的に含まない核酸またはポリペプチドを意味する（例えば、精製されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、電気泳動ゲル、クロマトグラフ溶出液、及び/または密度勾配遠心分離に供した媒体中で、別個のバンドを形成する）。例えば、電気泳動ゲル中で基本的に1つのバンドを生じる核酸またはポリペプチドは、「精製されている」。精製された本発明の核酸またはタンパク質は、少なくとも約50%純粋、通常、少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約99%またはそれ以上純粋（例えば、重量パーセントまたはモルベース）である。

## 【0129】

「組換え」という用語は、物質（例えば、核酸またはポリペプチド）がヒトの介入によって人工的に（すなわち、非天然に）変えられていることを示す。該変化は、その天然の環境もしくは状態内のまたはそこから取り出された物質に対して実施することができる。例えば、「組換え核酸」は、例えば、クローニング、親和性改変、DNAシャッフリングまたは他の周知の分子生物学的手順の間に、核酸を組換えることによって作製されるものである。「組換えDNA分子」は、このような分子生物学的技术によって一緒に接続されたDNAの断片から構成される。「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」という用語は、本明細書において使用される場合、組換えDNA分子を使用して発現されるタンパク質分子を指す。「組換え宿主細胞」は、組換え核酸を含有する及び/または発現する細胞であるか、または別様に遺伝子操作（例えば、組換えタンパク質（例えば、本明細書において提供される膜貫通型免疫調節タンパク質）をコードする核酸分子を細胞に導入することによって）により変化された細胞である。真核生物における転写制御シグナルは、「プロモーター」及び「エンハンサー」エレメントを含む。プロモーター及びエンハンサーは、転写に關与する細胞タンパク質と特異的に相互作用する短いDNA配列アレイからなる。プロモーター及びエンハンサーエレメントは、酵母、昆虫及び哺乳動物細胞ならびにウイルス中の遺伝子を含む多種多様な真核生物源から単離されている（類似した制御エレメント、すなわちプロモーターはまた原核生物中にも見いだされる）。特定のプロモーター及びエンハンサーの選択は、関心対象のタンパク質を発現させるためにどんな細胞タイプが使用されるかによる。「作動可能な組み合わせにある」、「作動可能な順序に

10

20

30

40

50

ある」及び「作動可能に連結されている」という用語は、本明細書において使用される場合、所与の遺伝子の転写及び/または所望のタンパク質分子の合成を指令することが可能な核酸分子が産生される様式または配向での核酸配列の連結を指す。

#### 【0130】

「組換え発現ベクター」という用語は、本明細書において使用される場合、所望のコード配列とその作動可能に連結されているコード配列の特定の宿主細胞における発現に必要な適切な核酸配列とを含有するDNA分子を指す。原核生物における発現に必要な核酸配列は、プロモーター、任意でオペレーター配列、リボソーム結合部位、及び場合によっては他の配列を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、ならびに終止シグナル及びポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。所望により、細胞からの融合タンパク質のより簡易な単離のため、発現された融合タンパク質が組換え宿主細胞によって分泌されることができるよう、分泌シグナルペプチド配列がまた、任意で、組換えタンパク質（例えば、組換え融合タンパク質）のコード配列に作動可能に連結されている組換え発現ベクターによってコードされることができ、この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、及びそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ベクターの中には、ウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターがある。

10

#### 【0131】

「選択性」という用語は、同族結合パートナーなどのある基質の特異的結合に関して、対象タンパク質またはポリペプチドの、当該対象タンパク質の異なる同族結合パートナーなどの別の基質に対する特異的結合と比較した、優先度を指す。選択性は、対象タンパク質と第1の基質（例えば第1の同族結合パートナー）との結合活性（例えば、結合親和性）（例えば、 $K_{d1}$ ）と、同じ対象タンパク質と第2の同族結合パートナーとの結合活性（例えば、結合親和性）（例えば、 $K_{d2}$ ）との比率として反映することができる。

20

#### 【0132】

「配列同一性」という用語は、本明細書において使用される場合、遺伝子またはタンパク質間の、それぞれヌクレオチドまたはアミノ酸レベルでの配列同一性を指す。「配列同一性」は、アミノ酸レベルでのタンパク質間の同一性の尺度及びヌクレオチドレベルでの核酸間の同一性の尺度である。タンパク質の配列同一性は、配列を整列したときの各配列中の所与の位置におけるアミノ酸配列を比較することによって決定され得る。同様に、核酸の配列同一性は、配列を整列したときの各配列中の所与の位置におけるヌクレオチド配列を比較することによって決定され得る。比較のための配列のアラインメントのための方法は、当技術分野において周知であり、そのような方法には、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、及びTFASTAが挙げられる。BLASTアルゴリズムは、配列同一性パーセントを計算し、2つの配列間の類似性の統計解析を実施する。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター（NCBI）のウェブサイトを通じて公的に利用可能である。

30

#### 【0133】

「可溶性」という用語は、タンパク質に関して本明細書において使用される場合、タンパク質が膜タンパク質ではないことを意味する。一般に、可溶性タンパク質は、IgSFドメイン（複数可）またはその特異的結合断片を含有するIgSFファミリーメンバー受容体の細胞外ドメインまたはその一部分のみを含有するが、膜貫通ドメインを含有しない。場合によっては、Fcドメインへ直接またはリンカーを介して間接的に連結または結合させることによってタンパク質の溶解性を改善することができ、これは、場合によっては、タンパク質の安定性及び/または半減期も改善することができる。いくつかの態様では、可溶性タンパク質は、Fc融合タンパク質である。

40

#### 【0134】

「種」という用語は、ポリペプチドまたは核酸に関して本明細書において使用される場合、同一のまたは実質的に同一の配列を有する分子の集団を意味する。同じ種のポリペプチド間の相違が、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、及び脂質化などの翻訳後修飾の差異が原因で起こり得る。アミノ末端またはカ

50

ルボキシ末端において完全長種とわずが1、2、または3アミノ酸残基以下異なる（または差異をコードする）わずかに短縮されたポリペプチド配列は、単一種の配列であると見なされる。そのような微小不均一性は、製造されたタンパク質の共通の特徴である。

#### 【0135】

「特異的結合断片」という用語は、本明細書において完全長野生型哺乳動物PD-L2ポリペプチドまたはそのIgVもしくはIgC（例えば、IgC2）ドメインに関して使用される場合、該完全長ポリペプチドまたはIgV及び/またはIgCドメインの部分配列を有し、*in vitro*及び/または*in vivo*で哺乳動物PD-1及び/または哺乳動物RGMb（例えば、ヒトまたはネズミPD-1またはRGMb）に特異的に結合する、ポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、当該特異的結合断片は、完全長野生型配列またはそのIgVもしくはIgC（例えば、IgC2）配列の配列長の少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%であるPD-L2 IgVまたはPD-L2 IgC2部分配列を含む。本発明のバリエーションPD-L2を形成するために、特異的結合断片は配列を変化させることができる。

10

#### 【0136】

「特異的に結合する」という用語は、本明細書において使用される場合、その親和性または結合活性が、十分な統計的サイズのランダムペプチドまたはポリペプチドの集合体に対する同じタンパク質の平均親和性または結合活性の少なくとも5倍大きく、しかし任意で少なくとも10、20、30、40、50、100、250または500倍大きく、またはさらに少なくとも1000倍大きくなるように、特異的結合条件下で、標的タンパク質に結合するタンパク質の能力を意味する。特異的に結合するタンパク質は、単一の標的分子のみに結合する必要はなく、標的と非標的（例えば、パラログまたはオーソログ）との間の構造形態の類似性に起因して非標的分子に特異的に結合し得る。当業者は、異なる動物種において同じ機能を有する分子（すなわち、オーソログ）への特異的結合または標的分子と実質的に類似のエピトープを有する非標的分子（例えば、パラログ）への特異的結合が可能であり、かつ、固有の非標的（例えば、ランダムポリペプチド）の統計的に有効な集合体に対して決定される結合の特異性を損なわないことを認識するだろう。したがって、本発明のポリペプチドは、交差反応性に起因して、2つ以上の別個の標的分子種に特異的に結合し得る。固相ELISAイムノアッセイ、ForteBio Octet、またはBiacore測定を使用して、2つのタンパク質間の特異的結合を決定することができる。一般的に、2つの結合タンパク質間の相互作用は、 $1 \times 10^{-5}$  M未満、多くの場合 $1 \times 10^{-12}$  Mの低さの解離定数（ $K_d$ ）を有する。本開示のある種の実施形態では、2つの結合タンパク質間の相互作用は、 $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  Mまたは $1 \times 10^{-11}$  Mもしくはそれ以下より低い、または、およそ $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  Mまたは $1 \times 10^{-11}$  Mもしくはそれ以下より低い解離定数を有する。

20

30

#### 【0137】

ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞に関して、「表面発現する」または「表面発現」という用語は、当該ポリペプチドが膜タンパク質として発現することを意味する。いくつかの実施形態では、膜タンパク質は、膜貫通型タンパク質である。

40

#### 【0138】

本明細書において使用される場合、「合成の」は、例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関して、組換え法及び/または化学合成法によって産生される核酸分子またはポリペプチド分子を指す。

#### 【0139】

「標的指向性部分」という用語は、本明細書において使用される場合、本発明のバリエーションPD-L2を含むポリペプチドに共有結合もしくは非共有結合されるか、またはそれを物理的にカプセル化する組成物を指す。標的指向性部分は、細胞表面受容体（例えば、

50

P D - 1 )、または腫瘍抗原 (例えば、腫瘍特異的抗原 (T S A) もしくは腫瘍関連抗原 (T A A)、例えば B 7 - H 6) のような所望のカウンター構造体に対して特異的結合親和性を有する。典型的には、所望のカウンター構造体は、特定の組織または細胞タイプ上に局在化される。標的指向性部分は、抗体、抗原結合断片 (F a b)、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> を含有する可変断片 (F v)、1つの鎖中で一緒に連結された V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> を含有する単鎖可変断片 (s c F v)、ならびに他の抗体 V 領域断片、例えば F a b、F (a b)<sub>2</sub>、F (a b)<sub>2</sub>、d s F v ダイアボディ、ナノボディ、可溶性受容体、受容体リガンド、親和性成熟された受容体もしくはリガンド、ならびに低分子 (500 ダルトン未満) 組成物 (例えば、特異的結合受容体組成物) を含む。標的指向性部分はまた、本発明のポリペプチドをカプセル化するリポソームの脂質膜に共有結合または非共有結合させることもできる。

10

## 【0140】

「膜貫通型タンパク質」という用語は、本明細書において使用される場合、脂質二重層を実質的にまたは完全に貫通する膜タンパク質を意味し、脂質二重層は、例えば、哺乳動物細胞などの生体膜中に、またはリポソームなどの人工構築物中に見いだされる。膜貫通型タンパク質は、脂質二重層に統合され、その統合が生理的条件下で熱力学的に安定である、膜貫通ドメイン (「膜貫通ドメイン」) を含む。膜貫通ドメインは、一般的に、水性環境 (例えば、サイトゾル、細胞外液) と相互作用するタンパク質の領域と比較して、膜貫通ドメインの疎水性が高いことに基づいて、任意の数の市販のバイオインフォマティクスソフトウェアアプリケーションを介して膜貫通ドメインのアミノ酸配列から予測可能である。膜貫通ドメインは多くの場合、膜を貫通する疎水性ヘリックスである。膜貫通型タンパク質は、脂質二重層の両方の層を1回または複数回貫通することができる。本明細書に記載の提供される膜貫通型免疫調節タンパク質は、膜貫通型タンパク質に含まれる。膜貫通ドメインに加えて、本発明の膜貫通型免疫調節タンパク質は、エクドメインをさらに含み、いくつかの実施形態ではエンドドメインをさらに含む。

20

## 【0141】

疾患または障害の「治療すること」、「治療」または「治療法」という用語は、本明細書において使用される場合、本発明の治療用組成物 (例えば、免疫調節タンパク質または操作された細胞を含有する) を、単独、または本明細書に記載される別の化合物との組み合わせのいずれかで投与することによる臨床または診断症状のいずれかの低減、停止、または排除によって証明される、疾患または障害の進行を遅延、中断、または回復させることを意味する。「治療すること」、「治療」または「治療法」はまた、急性もしくは慢性疾患もしくは障害における症状の重症度の低下、または再発率の低下 (例えば、自己免疫疾患経過を再発するまたは寛解する場合において)、または自己免疫疾患の炎症態様の場合における炎症の低減も意味する。がんの文脈において本明細書で使用される場合、がんの「治療」、がんを「阻害する」、がんを「阻害すること」またはがんの「阻害」という用語は、限定されないが Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) のような標準的な基準によって測定した場合の、腫瘍成長率の統計的に有意な低下、腫瘍成長の停止、または腫瘍のサイズ、質量、代謝活性もしくは体積の低下、または無増悪生存期間 (PFS) もしくは全生存期間 (OS) の統計的に有意な増加のうち少なくとも1つを指す。疾患もしくは障害を「予防する」、疾患もしくは障害の「予防 (prophylaxis)」または疾患もしくは障害の「予防 (prevention)」は、本発明の文脈において使用される場合、疾患もしくは障害の出現もしくは発症または疾患もしくは障害の症状の一部もしくは全てを予防するか、または疾患もしくは障害の発症の可能性を低下させるための、本発明の免疫調節ポリペプチドまたは操作された細胞を単独または別の化合物との組み合わせのいずれかで投与することを指す。

30

40

## 【0142】

「腫瘍特異的抗原」または「T S A」という用語は、本明細書において使用される場合、哺乳動物対象の腫瘍細胞上に主に存在するが一般的に哺乳動物対象の正常細胞上には見

50

いだされないカウンター構造体を指す。腫瘍特異的抗原は腫瘍細胞のみに存在する必要はないが、腫瘍特異的抗原を有する特定の哺乳動物の細胞の割合が十分に高いか、または腫瘍の表面の腫瘍特異的抗原のレベルが十分に高いため、それにより抗腫瘍治療薬（例えば、本発明の免疫調節ポリペプチド）で標的指向でき、そして腫瘍の影響から哺乳動物を予防または治療することを提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍を有する哺乳動物由来の細胞のランダム統計試料では、T S Aを提示する細胞の少なくとも50%ががん性である。他の実施形態では、T S Aを提示する細胞の少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、または99%ががん性である。

#### 【0143】

「バリエント」（また「改変された」または「変異体」という用語は、バリエントPD-L2に関して使用される場合、ヒト介入によって作製されたPD-L2、例えば哺乳動物（例えば、ヒトまたはネズミ）PD-L2を意味する。バリエントPD-L2は、非改変または野生型PD-L2と比べて変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリエントPD-L2は、野生型PD-L2アイソフォーム配列と1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、付加、またはそれらの組み合わせが異なるポリペプチドである。本明細書における目的のために、バリエントPD-L2は少なくとも1つの親和性改変ドメインを含有し、それにより1つまたは複数のアミノ酸差異がIgSFドメイン（例えば、IgVドメイン）に生じる。バリエントPD-L2は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれ以上のアミノ酸差異、例えばアミノ酸置換を含有することができる。バリエントPD-L2ポリペプチドは、一般的に、対応する野生型または非改変PD-L2、例えばSEQ ID NO: 3の配列、その成熟配列（シグナル配列を欠く）またはその細胞外ドメインもしくはIgSFドメインを含有するそれらの部分に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示す。いくつかの実施形態では、バリエントPD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 31またはSEQ ID NO: 55に記載の配列を含む、対応する野生型または非改変PD-L2に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示す。天然には存在しないアミノ酸及び天然に存在するアミノ酸が、許容される置換または付加の範囲内に含まれる。バリエントPD-L2は、任意の特定の作製方法に限定されることはなく、例えばデノボ化学合成、デノボ組換えDNA技術、またはそれらの組み合わせを含む。本発明のバリエントPD-L2は、哺乳動物種のPD-1またはRGMbのうちの少なくとも1つまたは複数に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、変化したアミノ酸配列は、野生型または非改変PD-L2タンパク質と比較して、PD-1及び/またはRGMbに対する結合親和性または結合活性の変化（すなわち、増加または減少）をもたらす。結合親和性または結合活性の増加または減少は、フローサイトメトリーなどの周知の結合アッセイを使用して決定することができる。Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005)。また、Linsley et al., Immunity, Vol 1(9): 793-801 (1994)も参照のこと。PD-1及び/またはRGMbへのバリエントPD-L2の結合親和性または結合活性の増加は、野生型または非改変PD-L2の値よりも少なくとも5%大きい値であることができ、いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2対照値の値よりも少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、100%大きい値であることができる。PD-1及び/またはRGMbへのPD-L2結合親和性または結合活性の減少は、野生型または非改変対照値の95%以下の値までであり、いくつかの実施形態では、野生型または非改変対照値の結合親和性または結合活性の80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%以下または、検出不可能

10

20

30

40

50

の値までである。バリエーションPD-L2は、アミノ酸残基の置換、付加、または欠失によって一次アミノ酸配列が変化している。バリエーションPD-L2の文脈における「バリエーション」という用語は、バリエーションPD-L2が作製される任意の特定の出發組成物または方法のいかなる条件も課すものと解釈されるべきではない。バリエーションPD-L2は、例えば、野生型哺乳動物PD-L2配列情報から開始して生成され、次いでPD-1及び/またはRGMbへの結合についてin silicoでモデル化され、そして最後に組換えまたは化学合成されて、本発明のバリエーションPD-L2を得ることができる。しかし別の一例では、バリエーションPD-L2は、野生型PD-L2の部位特異的変異誘発によって作製することができる。したがって、バリエーションPD-L2は、組成物を意味するが、必ずしもいずれかの所与のプロセスによって産生される産物を意味するわけではない組換え法、化学合成、またはその組み合わせを含む多種多様な技術を用いてもよい。

10

## 【0144】

「野生型」または「自然」または「天然」という用語は、本明細書において使用される場合、核酸分子、タンパク質（例えば、PD-L2）、IgSFメンバー、宿主細胞などの生体物質に関して用いられ、天然に見いだされかつヒトの介入によって改変されていないものを指す。

## 【0145】

## II. バリエーションPD-L2ポリペプチド

1つまたは複数のPD-L2同族結合パートナーに対して変化した（増加または減少した）結合活性または親和性を示すバリエーションPD-L2ポリペプチドが本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、PD-L2同族結合パートナーは、PD-1またはRGMbである。いくつかの実施形態では、PD-L2同族結合パートナーは、PD-1である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメイン（IgD）において、野生型もしくは非改変PD-L2ポリペプチド、または免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメインを含有する野生型もしくは非改変PD-L2の一部、またはそれらの特異的結合断片と比べて、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば1つまたは複数の置換（あるいは、「変異」または「交換」）、欠失、または付加を含有する。したがって、提供されるバリエーションPD-L1ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）がIgDにある、バリエーションIgD（以下「vIgD」と呼ばれる）であるか、またはそれを含

20

30

## 【0146】

いくつかの実施形態では、IgDは、IgVドメインもしくはIgC（例えば、IgC2）またはIgVドメインもしくはIgC（例えば、IgC2）ドメインの特異的結合断片、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、IgDは、IgVのみ、細胞外ドメイン（ECD）全体を含むIgVとIgCの組み合わせ、またはPD-L2のIgドメインの任意の組み合わせであり得る。表2は、PD-L2のIgVまたはIgC領域に対応する例示的な残基を提供する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸改変（例えば、置換）がIgVドメインまたはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片にある、IgVドメインまたはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片を含有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸改変（例えば、置換）がIgVドメインまたはその特異的結合断片にある、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含有する。いくつかの実施形態では、変化した結合活性または親和性によって、変化したIgVドメインまたはIgC（例えば、IgC2）ドメインは、親和性改変IgSFドメインである。

40

## 【0147】

いくつかの実施形態では、バリエーションは、非改変PD-L2配列の配列と比べて、もう1つのIgSFドメインが改変されている。いくつかの実施形態では、非改変PD-L2配列は、野生型PD-L2である。いくつかの実施形態では、非改変または野生型PD-

50

L2は、天然PD-L2またはそのオーソログの配列を有する。いくつかの実施形態では、非改変PD-L2は、1つまたは複数のIgSFドメイン（表2を参照のこと）を含有するPD-L2の細胞外ドメイン（ECD）またはその一部分であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドの細胞外ドメインは、IgVドメイン及びIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）を含む。しかしながら、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメイン及びIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）の両方を含む必要はない。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含むかまたは本質的にそれからなる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgC（例えば、IgC2）ドメインまたはその特異的結合断片の一方または両方を含むかまたは本質的にそれからなる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片、ならびに第1及び第2のIgC（例えば、IgC2）ドメインまたはその特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2は、可溶性であり、かつ膜貫通ドメインを欠く。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2はさらに、膜貫通ドメインを含み、場合によっては細胞質ドメインも含む。

10

## 【0148】

いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2配列は、哺乳動物PD-L2配列である。いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2配列は、限定されないが、ヒト、マウス、カニクイザル、またはラットを含む哺乳動物PD-L2であることができる。いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2配列は、ヒトである。

20

## 【0149】

いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2配列は、

(i) SEQ ID NO: 3に記載のアミノ酸配列もしくはシグナル配列を欠くその成熟形態を有するか、

(ii) SEQ ID NO: 3に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列もしくはその成熟形態を有するか、または

30

(iii) IgVドメインもしくはIgC（例えば、IgC2）ドメインもしくはその特異的結合断片を含有する(i)もしくは(ii)の一部である。

## 【0150】

いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2配列は、PD-L2の細胞外ドメインまたはその一部分であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 31に記載のアミノ酸配列、またはそのオーソログを含む。場合によっては、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドは、(i) SEQ ID NO: 31に記載のアミノ酸の配列、(ii) SEQ ID NO: 31に対して少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができるか、または(iii) IgVドメインもしくはIgC（例えば、IgC2）ドメインを含む(i)もしくは(ii)の特異的結合断片である。

40

## 【0151】

いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドは、IgVドメインまたはIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）またはその特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドのIgVドメインは、SEQ ID NO: 55（SEQ ID NO: 4のアミノ酸残基21~1

50

18に対応)に記載のアミノ酸配列またはそのオーソログを含む。例えば、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドのIgVドメインは、(i)SEQ ID NO:55に記載のアミノ酸の配列、(ii)SEQ ID NO:55に対して少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができるか、または(iii)(i)もしくは(ii)の配列の特異的結合断片である。いくつかの実施形態では、野生型または非改変IgVドメインは、1つまたは複数のPD-1またはRGMbなどの1つまたは複数のPD-L2同族結合タンパク質に結合することができる。

#### 【0152】

いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドの第1のIgC2ドメインは、SEQ ID NO:4の残基122~203として記載されるアミノ酸配列、またはそのオーソログを含む。例えば、非改変または野生型PD-L2ポリペプチドのIgC2ドメインは、(i)SEQ ID NO:4の残基122~203として記載されるアミノ酸配列を含有することができるか、(ii)SEQ ID NO:4の残基122~203に対して少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有することができるか、または(iii)(i)もしくは(ii)の特異的結合断片である。いくつかの実施形態では、野生型または非改変IgCドメインは、1つまたは複数のPD-L2同族結合タン

#### 【0153】

いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドは、PD-L2の特異的結合断片、例えばIgVドメインまたはIgC(例えば、IgC2)ドメインの特異的結合断片を含有する。いくつかの実施形態では、特異的結合断片はPD-1及び/またはRGMbと結合することができる。特異的結合断片は、少なくとも50アミノ酸、例えば少なくとも60、70、80、90、100、または110アミノ酸のアミノ酸長を有することができる。いくつかの実施形態では、IgVドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO:4のアミノ酸21~118として記載されるIgVドメインの長さの少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%であるアミノ酸配列を含有する。いくつかの実施形態では、IgC(例えば、IgC2)ドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO:3のアミノ酸122~203として記載されるIgCドメインの長さの少なくとも約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%であるアミノ酸配列を含む。

#### 【0154】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、1つまたは複数の親和性改変IgSFドメインを含むECDドメインまたはその一部分を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、1つまたは複数のIgSFドメイン(IgVドメインまたはIgC)が1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換)を含有する、IgVドメインもしくはIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)またはIgVドメインの特異的結合断片もしくはIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)の特異的結合断片を含むことができる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、少なくとも1つのIgVまたはIgCドメインがアミノ酸改変(例えば、置換)(複数可)を含有する、IgVドメイン及びIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)、またはIgVドメインの特異的結合断片及びIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)の特異的結合断片を含むことができる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、完全長IgVドメインを含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、完全長IgC(例えば、IgC2)ド

10

20

30

40

50

イン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインの特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）の特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、完全長IgVドメイン及び完全長IgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、完全長IgVドメイン及びIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）の特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインの特異的結合断片及び完全長IgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインの特異的結合断片及びIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）の特異的結合断片を含む。

10

**【0155】**

このような実施形態のいずれかでは、バリエーションPD-L2ポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、PD-L2ポリペプチドIgSFドメインのいずれか1つまたは複数に位置することができる。例えば、いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、バリエーションPD-L2ポリペプチドの細胞外ドメインに位置する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgVドメインまたはIgVドメインの特異的結合断片に位置する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgC（例えば、IgC2）ドメインまたはIgC（例えば、IgC2）ドメインの特異的結合断片に位置する。

20

**【0156】**

一般的に、ポリペプチドの様々な属性のそれぞれ（例えば、可溶性及び膜結合ポリペプチド、PD-1及びRGMbに対するPD-L2の親和性、ポリペプチド鎖当たりの変異の数、連結ポリペプチド鎖の数、バリエーションPD-L2当たりのアミノ酸変化の数及び性質など）が、以下に個別に開示される。しかしながら、当業者に明らかであるとあり、任意の特定のポリペプチドが、これらの独立した属性の組み合わせを含むことができる。IgSFドメインのドメイン構成を説明するために使用されるSEQ ID NOとして記載される特定の配列への言及を含むアミノ酸についての言及は、例示を目的としており、提供される実施形態の範囲を限定することを意味していないことが理解されよう。ポリペプチド及びそのドメインの説明は、類似の分子との相同性分析及びアラインメントに基づいて理論的に導出されることが理解されよう。したがって、正確な遺伝子座にはばらつきがあり得、必ずしもタンパク質毎に同じとは限らない。よって、特定のIgSFドメイン（例えば、特定のIgVドメインまたはIgCドメイン）は、いくつか（例えば、1、2、3、または4個）のアミノ酸分長いかまたは短い場合がある。

30

**【0157】**

さらに、以下で考察されるような本発明の様々な実施形態は、上に開示したとおりに定義された用語の意味の範囲内で頻繁に提供される。したがって、特定の定義において記載される実施形態は、定義された用語が本明細書に記載の様々な態様及び属性の考察において利用される場合、参照によって組み込まれると解釈されるべきである。したがって、見出し、様々な態様及び実施形態の提示の順序、ならびに各々独立した属性の別々の開示は、本開示の範囲に限定されることを意味するものではない。

40

**【0158】****例示的な改変**

野生型または非改変PD-L2ポリペプチドに含有されるIgSFドメインと比べて、少なくとも1つの親和性改変IgSFドメイン（例えば、IgVまたはIgC）またはその特異的結合断片を含有し、その結果、該バリエーションPD-L2ポリペプチドが、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のリガンドPD-1またはRGMbに対して変化した（増加または減少した）結合活性または親和性を示す、バリエーションPD-L2ポリペプチドが本明細書において提供される。いくつかの実施形態で

50

は、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、例えば固相ELISAイムノアッセイ、フローサイトメトリー、ForteBio OctetまたはBiacoreアッセイによって測定した場合に、野生型または非改変PD-L2ポリペプチド対照配列のものとは異なるPD-1及び/またはRGMbに対する結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、PD-1及び/またはRGMbに対して増加した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1及び/またはRGMbに対して減少した結合親和性を有する。PD-1及び/またはRGMbは、哺乳動物タンパク質、例えばヒトタンパク質またはネズミタンパク質であることができる。

【0159】

同族結合パートナーのそれぞれの結合親和性は独立しており、つまり、いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1及び/またはRGMbの一方または両方に対する増加した結合親和性を有し、PD-1及びRGMbの一方または両方に対する減少した結合親和性を有する。

【0160】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1に対して増加した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、RGMbに対して増加した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1に対して減少した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、RGMbに対して減少した結合親和性を有する。

【0161】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1及びRGMbに対して増加した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1に対して増加した結合親和性を有し、RGMbに対して減少した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1及びRGMbに対して減少した結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べて、PD-1に対して減少した結合親和性を有し、RGMbに対して増加した結合親和性を有する。

【0162】

いくつかの実施形態では、PD-1及び/またはRGMbに対する結合親和性が増加した、またはより大きいバリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチド対照と比べて、PD-1及び/またはRGMbに対して少なくとも約5%、例えば少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約35%、または約50%の結合親和性の増加を有する。いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べた結合親和性の増加は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より多い。このような例では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を含有しないこと以外は、バリエーションPD-L2ポリペプチドと同じ配列を有する。

【0163】

いくつかの実施形態では、PD-1及び/またはRGMbに対する結合親和性が減少した、または低下したバリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチド対照と比べて、PD-1及び/またはRGMbへの少なくとも5%、例え

10

20

30

40

50

ば少なくとも約10%、約15%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%またはそれ以上の結合親和性の減少を有するだろう。いくつかの実施形態では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比べた結合親和性の減少は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より多い。

このような例では、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を含有しないこと以外は、バリエーションPD-L2ポリペプチドと同じ配列を有する。

【0164】

いくつかの実施形態では、PD-1及び/またはRGMbに対する前述の実施形態のいずれかの平衡解離定数 ( $K_d$ ) は、 $1 \times 10^{-5}$  M、 $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  Mまたは $1 \times 10^{-11}$  M、または $1 \times 10^{-12}$  M未満、またはそれ以下であることができる。

【0165】

野生型または非改変PD-L2配列は、本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドを生成するために、必ずしも出発組成物として使用される必要はない。したがって、「改変」、例えば「置換」という用語の使用は、本実施形態がバリエーションPD-L2ポリペプチドの特定の作製法に限定されることを暗示するものではない。バリエーションPD-L2ポリペプチドは、例えば、デノボペプチド合成によって作製されることができ、したがって、改変、例えば置換のためにコードするコドンを変えるという意味で、必ずしも改変、例えば置換を必要とするわけではない。この原則はまた、アミノ酸残基の「付加」及び「欠失」という用語にも及び、これも同じく特定の作製法を暗示するものではない。バリエーションPD-L2ポリペプチドが設計または作製される手段は、いかなる特定の方法にも限定されない。いくつかの実施形態では、しかしながら、野生型または非改変PD-L2をコードする核酸が、野生型または非改変PD-L2遺伝物質から変異誘発され、所望の特異的結合親和性及び/またはIFN- $\gamma$ 発現もしくは他の機能的活性の誘導についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、任意の数の公的に利用可能なデータベースで利用可能なタンパク質または核酸配列を利用してデノボ合成され、次いで、その後スクリーニングされる。国立生物工学情報センターは、そのような情報を提供し、そのウェブサイトはUniProtKBデータベースと同じくインターネットを介して公的にアクセス可能である。

【0166】

特に明記しない限り、本開示を通して示すとおり、アミノ酸改変（複数可）は、以下の通り、SEQ ID NO: 31に記載の非改変ECD配列、または適用可能な場合はSEQ ID NO: 55もしくはSEQ ID NO: 115に記載の非改変IgV配列（SEQ ID NO: 31の残基1~102を含有する）の位置の番号付けに対応するアミノ酸位置番号によって指定される。

LFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEE  
QLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPET  
DEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSPANTSHSRTPEGLYQVTSVLRKPPPGRNFSCVF  
WNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPT (SEQ ID NO:31)

FTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEE  
LPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIYGVAWDYKYLTLK (SEQ ID NO:55)

LFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEE  
QLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIYGVAWDYKYLTLK (SEQ ID NO:115)

【0167】

10

20

30

40

50

PD-L2ポリペプチド（そのIgSFドメイン（例えば、IgV）を含有するその一部分を含む）における改変（例えば、アミノ酸置換）の対応する位置を、例えば、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 55またはSEQ ID NO: 115を有する参照配列のアラインメントによって特定することは、当業者のレベルの範囲内である。本開示全体での改変の記載において、アミノ酸位置が中央に示され、対応する非改変（例えば、野生型）アミノ酸が番号の前に列挙され、特定されたバリエーションのアミノ酸置換が番号の後に列挙される。改変が該位置の欠失である場合は「del」と表示され、改変が該位置における挿入である場合は「ins」と表示される。場合によっては、挿入が、中央に示されたアミノ酸位置と共に記載され、対応する非改変（例えば、野生型）アミノ酸が番号の前及び後に列挙され、特定されたバリエーションのアミノ酸挿入が非改変（例えば、野生型）アミノ酸の後に列挙される。

10

## 【0168】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2配列に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、野生型または非改変PD-L2配列のエクトドメイン（細胞外ドメイン）にあることができる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgVドメインまたはその特異的結合断片にある。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgC（例えば、IgC2）ドメインまたはその特異的結合断片にある。バリエーションPD-L2ポリペプチドのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）のいくつかは、IgVドメインまたはその特異的結合断片にあり、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）のいくつかは、IgC（例えば、IgC2）ドメインまたはその特異的結合断片にある。

20

## 【0169】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。改変（例えば、置換）は、IgVドメインまたはIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）にあることができる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、IgC（例えば、IgC2）ドメインまたはその特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドまたはその特異的結合断片（例えば、SEQ ID NO: 31、55または115のアミノ酸配列）と少なくとも約85%、約86%、約86%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の配列同一性を有する。

30

40

## 【0170】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて、位置（複数可）2、12、13、15、18、20、23、24、28、31、32、33、36、37、39、44、45、46、47、48、58、59、65、67、69、71、72、73、74、75、76、77、82、85、86、89、または91に対応する非改変PD-L2またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のPD-1及び/またはRGMbに対する変化した結合親和性を示す。例えば、いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプ

50

チドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、PD-1及び/またはRGMbに対して増加した結合親和性を示す。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、PD-1またはRGMbに対して減少した結合親和性を示す。

【0171】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、F2L、I12V、I13V、H15Q、N18D、T20A、N24S、C23S、G28V、N24D、V31A、V31M、N32D、L33P、L33H、L33F、I36V、T37A、S48C、S39I、E44D、E44V、N45S、D46E、T47A、E58G、E59G、K65R、S67L、H69L、P71S、Q72H、V73A、Q74R、V75G、R76G、D77N、Q82R、I85F、I86T、V89D、またはW91Rから選択される1つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換、またはその保守的アミノ酸置換を有する。保守的アミノ酸置換は、野生型または非改変アミノ酸以外の、置換されたアミノ酸と同じクラスのアミノ酸に属する任意のアミノ酸である。アミノ酸のクラスは、脂肪族（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン）、ヒドロキシルまたは硫黄含有（セリン、システイン、トレオニン、及びメチオニン）、環状（プロリン）、芳香族（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）、塩基性（ヒスチジン、リジン、及びアルギニン）、及び酸性/アミド（アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、及びグルタミン）である。

10

【0172】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、F2L、I12V、I13V、H15Q、N18D、T20A、N24S、C23S、G28V、N24D、V31A、V31M、N32D、L33P、L33H、L33F、I36V、T37A、S48C、S39I、E44D、E44V、N45S、D46E、T47A、E58G、E59G、K65R、S67L、H69L、P71S、Q72H、V73A、Q74R、V75G、R76G、D77N、Q82R、I85F、I86T、V89D、またはW91Rから選択される2つ以上のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換を有する。

20

【0173】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドのアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換は、

30

H15Q, N24D, E44D, V89D, Q82R/V89D, E59G/Q82R,  
 S39I/V89D, S67L/V89D, S67L/I85F, S67L/I86T, H15Q/K65R, H15Q/Q72H/V89D,  
 H15Q/S67L/R76G, H15Q/R76G/I85F, H15Q/T47A/Q82R, H15Q/Q82R/V89D,  
 H15Q/C23S/I86T, H15Q/S39I/I86T, E44D/V89D/W91R, I13V/S67L/V89D, H15Q/S67L/I86T,  
 I13V/H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/E44D/V89D, I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D,  
 I13V/E44D/Q82R/V89D, I13V/Q72H/R76G/I86T, I13V/H15Q/R76G/I85F,  
 H15Q/S39I/R76G/V89D, H15Q/S67L/R76G/I85F, H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T,  
 H15Q/T47A/Q72H/R76G, I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G, H15Q/E44D/R76G/I85F,  
 H15Q/S39I/S67L/V89D, H15Q/N32D/S67L/V89D, N32D/S67L/V89D,  
 H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D, H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T, G28V/Q72H/R76G/I86T,  
 I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L, E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D, H15Q/V89D, H15Q/T47A,  
 I13V/H15Q/Q82R, I13V/H15Q/V89D, I13V/S67L/Q82R/V89D, I13V/H15Q/Q82R/V89D,  
 H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R,  
 I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D, H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D, I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D, I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D, I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D, H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D,  
 H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D, I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T,  
 H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D, F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D, I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D,  
 H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D, I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D,  
 H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D,  
 I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89D,  
 H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D,またはI13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89D

10

20

30

を含む。

【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて位置13に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換I13V、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、15、44、47、67、72、72、76、82、86または89の1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I86T、V89Dの1つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変I13V/H15Q、I13V/E44D、I13V/T47A、I13V/S67L、I13V/Q72H、I13V/R76G、I13V/Q82R、I13V/I86TまたはI13V/V89Dを含む。

40

【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて位置15

50

に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換 H 1 5 Q、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、1 3、4 4、4 7、6 7、7 2、7 2、7 6、8 2、8 6 または 8 9 の 1 つまたは複数の位置に、1 つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸改変は、I 1 3 V、E 4 4 D、T 4 7 A、S 6 7 L、Q 7 2 H、R 7 6 G、Q 8 2 R、I 8 6 T、V 8 9 D の 1 つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、アミノ酸改変 I 1 3 V / H 1 5 Q、H 1 5 Q / E 4 4 D、H 1 5 Q / T 4 7 A、H 1 5 Q / S 6 7 L、H 1 5 Q / Q 7 2 H、H 1 5 Q / R 7 6 G、H 1 5 Q / Q 8 2 R、H 1 5 Q / I 8 6 T または H 1 5 Q / V 8 9 D を含む。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、アミノ酸改変 H 1 5 Q / S 6 2 L / Q 8 2 R、H 1 5 Q / S 6 2 L / V 8 9 D、または H 1 5 Q / Q 8 2 R / V 8 9 D を含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、非改変 PD - L 2 またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31 に記載の位置に基づいて位置 4 7 に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換 T 4 7 A、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、1 3、1 5、4 4、6 7、7 2、7 2、7 6、8 2、8 6 または 8 9 の 1 つまたは複数の位置に、1 つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸改変は、I 1 3 V、H 1 5 Q、E 4 4 D、S 6 7 L、Q 7 2 H、R 7 6 G、Q 8 2 R、I 8 6 T、V 8 9 D の 1 つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、アミノ酸改変 I 1 3 V / T 4 7 A、H 1 5 Q / T 4 7 A、T 4 7 A / E 4 4 D、T 4 7 A / S 6 7 L、T 4 7 A / Q 7 2 H、T 4 7 A / R 7 6 G、T 4 7 A / Q 8 2 R、T 4 7 A / I 8 6 T または T 4 7 A / V 8 9 D を含む。

【0177】

いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、非改変 PD - L 2 またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31 に記載の位置に基づいて位置 6 7 に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換 S 6 7 L、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、1 3、1 5、4 4、4 7、7 2、7 2、7 6、8 2、8 6 または 8 9 の 1 つまたは複数の位置に、1 つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸改変は、I 1 3 V、H 1 5 Q、E 4 4 D、T 4 7 A、Q 7 2 H、R 7 6 G、Q 8 2 R、I 8 6 T、V 8 9 D の 1 つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、アミノ酸改変 I 1 3 V / S 6 7 L、H 1 5 Q / S 6 7 L、S 6 7 L / E 4 4 D、T 4 7 A / S 6 7 L、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / R 7 6 G、S 6 7 L / Q 8 2 R、S 6 7 L / I 8 6 T または S 6 7 L / V 8 9 D を含む。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、アミノ酸改変 H 1 5 Q / S 6 2 L / Q 8 2 R、H 1 5 Q / S 6 2 L / V 8 9 D、または S 6 2 L / Q 8 2 R / V 8 9 D を含む。

【0178】

いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、非改変 PD - L 2 またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31 に記載の位置に基づいて位置 7 2 に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換 Q 7 2 H、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、1 3、1 5、4 4、4 7、6 7、7 6、8 2、8 6 または 8 9 の 1 つまたは複数の位置に、1 つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸

置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、I 13 V、H 15 Q、E 44 D、T 47 A、S 67 L、R 76 G、Q 82 R、I 86 T、V 89 Dの1つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変H 15 Q / S 62 L / Q 82 R、H 15 Q / S 62 L / V 89 D、またはS 62 L / Q 82 R / V 89 Dを含む。

**【0179】**

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて位置76に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換R 76 G、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、13、15、44、47、67、72、82、86または89の1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、I 13 V、H 15 Q、E 44 D、T 47 A、S 67 L、Q 72 H、Q 82 R、I 86 T、V 89 Dの1つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変I 13 V / R 76 G、H 15 Q / R 76 G、E 44 D / R 76 G、T 47 A / R 76 G、S 67 L / R 76 G、Q 72 H / R 76 G、R 76 G / Q 82 R、R 76 G / I 86 TまたはR 76 G / V 89 Dを含む。

10

20

**【0180】**

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて位置82に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換Q 82 R、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、13、15、44、47、67、72、76、86または89の1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、I 13 V、H 15 Q、E 44 D、T 47 A、S 67 L、Q 72 H、R 76 G、I 86 T、V 89 Dの1つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変I 13 V / Q 82 R、H 15 Q / Q 82 R、E 44 D / Q 82 R、T 47 A / Q 82 R、S 67 L / Q 82 R、Q 72 H / Q 82 R、R 76 G / Q 82 R、Q 82 R / I 86 TまたはQ 86 R / V 89 Dを含む。

30

**【0181】**

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2またはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて位置86に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換I 86 T、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、13、15、44、47、67、72、76、82または89の1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、I 13 V、H 15 Q、E 44 D、T 47 A、S 67 L、Q 72 H、R 76 G、Q 82 R、V 89 Dの1つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変I 13 V / I 86 T、H 15 Q / I 86 T、E 44 D / I 86 T、T 47 A / I 86 T、S 67 L / I 86 T、Q 72 H / I 86 T、R 76 G / I 86 T、Q 82 R / I 86 TまたはI 86 T / V 89 Dを含む。

40

**【0182】**

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、非改変PD-L2ま

50

たはその特異的結合断片に、SEQ ID NO: 31に記載の位置に基づいて位置89に対応する位置でアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、アミノ酸置換V89D、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、13、15、44、47、67、72、76、82または86の1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、I13V、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I86Tの1つまたは複数のアミノ酸置換、またはその保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変I13V/V89D、H15Q/V89D、E44D/V89D、T47A/V89D、S67L/V89D、Q72H/V89D、R76H/V89D、I86T/V89Dを含む。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、アミノ酸改変H15Q/S62L/V89D、H15Q/Q82R/V89D、またはS62L/Q82R/V89Dを含む。

10

20

30

40

50

#### 【0183】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙された置換(変異)のいずれかを含む。表1はまた、野生型PD-L2または例示的なバリエーションPD-L2ポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)またはIgVドメインについてSEQ ID NOを参照することにより例示的な配列を提供する。示されるように、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、ドメインの特定または分類に使用される方法などに応じて異なる場合がある。さらに、場合によっては、所与のドメイン(例えば、IgV)の隣接するN末端及び/またはC末端アミノ酸も、例えば発現されたときにドメインの適切なフォールディングを確実にするために、バリエーションIgSFポリペプチドの配列に含めることができる。したがって、表1におけるSEQ ID NOの例示は、限定されるものと解釈されるべきではないことが理解されよう。例えば、バリエーションPD-L2ポリペプチドの特定のドメイン(例えば、IgVドメイン)は、それぞれのSEQ ID NOに記載のアミノ酸配列よりもいくつかのアミノ酸分長いかまたは短く、例えば1~10アミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸分長いかまたは短い場合がある。

#### 【0184】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙された変異のいずれかを含む。表1はまた、野生型PD-L2または例示的なバリエーションPD-L2ポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)またはIgVドメインについてSEQ ID NOを参照することにより例示的な配列を提供する。示されるように、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、ドメインの特定または分類に使用される方法などに応じて異なる場合がある。さらに、場合によっては、所与のドメイン(例えば、IgV)の隣接するN末端及び/またはC末端アミノ酸も、例えば発現されたときにドメインの適切なフォールディングを確実にするために、バリエーションIgSFポリペプチドの配列に含めることができる。したがって、表1におけるSEQ ID NOの例示は、限定されるものと解釈されるべきではないことが理解されよう。例えば、バリエーションPD-L2ポリペプチドの特定のドメイン(例えば、IgVドメイン)は、それぞれのSEQ ID NOに記載のアミノ酸配列よりもいくつかのアミノ酸分長いかまたは短く、例えば1~10アミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸分長いかまたは短い場合がある。

#### 【0185】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙された変異のいずれかを含む。

#### 【0186】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙された細胞外ドメイン(ECD)配列のうちのいずれか(すなわち、SEQ ID NO: 56~

106、108～114、及び116～132のうちのいずれか1つ)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙された細胞外ドメイン(ECD)配列のうちのいずれか(すなわち、SEQ ID NO:56～106、108～114、及び116～132のうちのいずれか1つ)に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示すポリペプチド配列を含むかまたはそれからなり、野生型または非改変PD-L2には存在しないアミノ酸改変(例えば、置換)(複数可)を含有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙された細胞外ドメイン(ECD)配列のうちのいずれか(すなわち、SEQ ID NO:56～106、108～114、及び116～132のうちのいずれか1つ)を含むかまたはそれからなり、野生型または非改変PD-L2には存在しないアミノ酸改変(例えば、置換)(複数可)を含有する。

10

20

30

**【0187】**

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙されたIgV配列のうちのいずれか(すなわち、SEQ ID NO:133～183、185～191、193～209、268～318、320～343のうちのいずれか1つ)を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙されたIgV配列のうちのいずれか(すなわち、SEQ ID NO:133～183、185～191、193～209、268～318、320～343のうちのいずれか1つ)に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示すポリペプチド配列を含むかまたはそれからなり、野生型または非改変PD-L2には存在しないアミノ置換(複数可)を含有する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、表1に列挙されたIgV配列のうちのいずれか(すなわち、SEQ ID NO:133～183、185～191、193～209、268～318、320～343のうちのいずれか1つ)の特異的結合断片を含むかまたはそれからなり、野生型または非改変PD-L2には存在しないアミノ改変(複数可)を含有する。

**【0188】**

(表1)例示的なバリエーションPD-L2ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	31	55, 115
H15Q	56	133, 268
N24D	57	134, 269
E44D	58	135, 270
V89D	59	136, 271
Q82R/V89D	60	137, 272
E59G/Q82R	61	138, 273
S39I/V89D	62	139, 274
S67L/V89D	63	140, 275
S67L/I85F	64	141, 276
S67L/I86T	65	142, 277
H15Q/K65R	66	143, 278
H15Q/Q72H/V89D	67	144, 279
H15Q/S67L/R76G	68	145, 280
H15Q/R76G/I85F	69, 74	146, 281, 151, 186
H15Q/T47A/Q82R	70	147, 282
H15Q/Q82R/V89D	71	148, 283
H15Q/C23S/I86T	72	149, 284
H15Q/S39I/I86T	73	150, 285
E44D/V89D/W91R	75	152, 287
I13V/S67L/V89D	76	153, 288
H15Q/S67L/I86T	77	154, 289
I13V/H15Q/S67L/I86T	78	155, 290
I13V/H15Q/E44D/V89D	79	156, 291
I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D	80	157, 292
I13V/E44D/Q82R/V89D	81	158, 293
I13V/Q72H/R76G/I86T	82	159, 294
I13V/H15Q/R76G/I85F	83	160, 295
H15Q/S39I/R76G/V89D	84	161, 296

10

20

H15Q/S67L/R76G/I85F	85	162, 297
H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T	86	163, 298
H15Q/T47A/Q72H/R76G	87	164, 299
I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G	88	165, 300
H15Q/E44D/R76G/I85F	89	166, 301
H15Q/S39I/S67L/V89D	90	167, 302
H15Q/N32D/S67L/V89D	91	168, 303
N32D/S67L/V89D	92	169, 304
H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D	93	170, 305
H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T	94	171, 306
G28V/Q72H/R76G/I86T	95	172, 307
I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L	96	173, 308
E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D	97	174, 309
H15Q/V89D	98	175, 310
H15Q/T47A	99	176, 311
I13V/H15Q/Q82R	100	177, 312
I13V/H15Q/V89D	101	178, 313
I13V/S67L/Q82R/V89D	102	179, 314
I13V/H15Q/Q82R/V89D	103	180, 315
H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D	104	181, 316
I13V/H15Q/T47A/Q82R	105	182, 317
I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D	106	183, 318
H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D	108	185, 320
I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D	109	186, 321
I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D	110	187, 322
I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D	111	188, 323
I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D	112	189, 324
I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D	113	190, 325
I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D	114	191, 326
I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D	116	193, 327
H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D	117	194, 328
H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D	118	195, 329
I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T	119	196, 330
H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D	120	197, 331
F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D	121	198, 332
I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D	122	199, 333
I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D	123	200, 334
H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D	124	201, 335
I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D	125	202, 336
H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D	126	203, 337
I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D	127	204, 338
H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D	128	205, 339
I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T	129	206, 340
H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89D	130	207, 341
H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D	131	208, 342
I13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89D	132	209, 343

10

20

30

40

## 【 0 1 8 9 】

いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO : 31、55 または 115 に記載の配列を含む、野生型または非改変 PD - L 2 ポリペプチドと比較して、PD - 1 のエクストドメインに対して増加した親和性を示す。いくつかの実施形態では、PD - L 2 ポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO : 31、55 または 115 に記載の配列を含む、野生型または非改変 PD - L 2 と比較して、RGMb のエクストドメインに対して増加した親和性を示す。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO : 31、55 または 115 に記載の配列を含む、野生型または非改変 PD - L 2 と比較して、PD - 1 のエクストドメイン及び RGMb のエクストドメインに対して増加した親和性を示す。

50

## 【0190】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO: 31、55または115に記載の配列を含む、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、PD-1またはRGMbのエクトドメインのうち的一方への増加した結合親和性を示し、PD-1またはRGMbのエクトドメインの他方への減少した結合親和性を示す。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO: 31、55または115に記載の配列を含む、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、PD-1のエクトドメインに対して増加した親和性、及びRGMbのエクトドメインに対して減少した親和性を示す。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO: 31、55または115に記載の配列を含む、野生型または非改変PD-L2ポリペプチドと比較して、RGMbのエクトドメインに対して増加した親和性、及びPD-1のエクトドメインに対して減少した親和性を示す。

10

## 【0191】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、RGMbまたは他の同族結合パートナーの結合について、例えば、SEQ ID NO: 31、55または115に記載の非改変PD-L2ポリペプチドの結合の比と比較して、PD-1に対する選択性対RGMbまたはPD-L2の他の同族結合パートナーに対する選択性についての増加を示す。いくつかの実施形態では、RGMbへの結合に対するPD-1への結合の比率(PD-1:RGMb結合比率)は1より大きい。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、もしくはそれ以上より大きい、または約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、もしくはそれ以上より大きい、または1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、もしくはそれ以上の、RGMbまたは他の同族結合パートナーへの結合に対するPD-1への結合の比率を示す。

20

30

## 【0192】

## III. バリエーションポリペプチドのフォーマット

vIgDが含まれる本明細書で提供されるバリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドは、可溶性タンパク質、膜結合タンパク質または分泌タンパク質などを含む多種多様な方法でフォーマットをとることができる。いくつかの実施形態では、特定のフォーマットは、所望の治療用途に合わせて選択できる。場合によっては、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含む免疫調節ポリペプチドは、その同族結合パートナー、例えばPD-1の活性に拮抗するかまたはそれを遮断するフォーマットで提供される。いくつかの実施形態では、PD-1の拮抗作用は、腫瘍学における免疫の促進において有用であり得る。場合によっては、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含む免疫調節ポリペプチドは、その同族結合パートナー、例えばPD-1の活性を作用させるまたは刺激するフォーマットで提供される。いくつかの実施形態では、PD-1の作用作用は、炎症または自己免疫の治療において有用であり得る。当業者は、例えば1つまたは複数の特異的同族結合パートナーに拮抗するかまたはそれを作用させるための特定のフォーマットの活性を容易に決定することができる。そのような活性を評価するための例示的な方法は、実施例を含む、本明細書において提供される。

40

## 【0193】

50

いくつかの態様では、可溶性であるPD-L2のvIgDを含む免疫調節タンパク質（例えばFc鎖に融合する）が提供される。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加のIgSFドメイン（例えば、1つまたは複数の追加のvIgD）は、本明細書において提供されるとおりのPD-L2のvIgDに連結され得る（以下「スタック」または「スタックされた」免疫調節タンパク質と呼ばれる）。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質のモジュールフォーマットは、複数のカウンター構造体（複数の同族結合パートナー）の活性を調節するための、免疫調節タンパク質を操作または生成するための柔軟性を提供する。いくつかの実施形態では、そのような「スタック」分子を、可溶性フォーマットで提供することができ、場合によっては、膜結合または分泌型タンパク質として提供してもよい。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2免疫調節タンパク質は、例えば対象に投与されたときに、例えばvIgDを特定の環境または細胞に標的指向または局在化するために、リガンド（例えば、抗原）に特異的に結合する標的指向性物質または部分（例えば、抗体または他の結合分子）に直接的または間接的に連結されたPD-L2のvIgDを含有するコンジュゲートとして提供される。いくつかの実施形態では、標的指向性物質、例えば、抗体または他の結合分子は、腫瘍抗原に結合し、それによりvIgDを含有するバリエーションPD-L2を腫瘍微小環境に局在化させ、例えば、腫瘍微小環境に特異的な腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の活性を調節する。

10

20

30

40

50

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、細胞において発現され、かつ操作細胞療法（ECT）の一部として提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、細胞、例えば免疫細胞（例えば、T細胞または抗原提示細胞）において、膜結合形態で発現し、それにより膜貫通型免疫調節タンパク質（以下「TIP」とも呼ばれる）を提供する。いくつかの実施形態では、TIPによって認識される同族結合パートナーに応じて、TIPを発現する操作された細胞は、他の操作された細胞及び/または内在性T細胞に陽性または陰性のいずれかの共刺激シグナルを提供することによって、同族結合パートナーを作動させることができる。いくつかの態様では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、細胞、例えば免疫細胞（例えば、T細胞または抗原提示細胞）において分泌可能形態で発現し、それにより例えば細胞が対象に投与されたときに、分泌または可溶性形態のバリエーションPD-L2ポリペプチド（以下「SIP」とも呼ばれる）を産生する。いくつかの態様では、SIPは、それが分泌される環境（例えば、腫瘍微小環境）において、同族結合パートナーに拮抗することができる。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、細胞中でのバリエーションポリペプチドのTIPまたはSIPとしての送達または発現のために、対象への投与によって、細胞、例えば免疫細胞（例えば、T細胞または抗原提示細胞）に*in vivo*で感染することができる感染性物質（例えば、ウイルス性または細菌性物質）中で発現される。

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、可溶性免疫調節ポリペプチド、例えばvIgDを含有するバリエーションPD-L2は、提供されるコンジュゲートのいずれか1つまたは任意の組み合わせ（例えば、標的指向性部分）にそれ自体コンジュゲートされることができるリボソーム内にカプセル化されることができる。いくつかの実施形態では、本発明の可溶性または膜結合型免疫調節ポリペプチドは、脱グリコシル化される。より具体的な実施形態では、バリエーションPD-L2配列は脱グリコシル化される。さらにより具体的な実施形態では、バリエーションPD-L2のIgV及び/またはIgC（例えばIgC2）ドメイン（複数可）は脱グリコシル化される。

#### 【0196】

提供されるフォーマットの非限定的な例を図1A~1Cに記載し、以下にさらに記載する。

#### 【0197】

##### A. 可溶性タンパク質

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する免疫調節タン

パク質は、可溶性タンパク質である。当業者であれば、細胞表面タンパク質が、典型的には、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞外ドメイン（ECD）を有すること、ならびに、細胞外ドメインまたはその免疫学的に活性な配列を使用してそのようなタンパク質の可溶性形態を作製することができることを認識するだろう。したがって、いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインまたは膜貫通ドメインの一部を欠く。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2を含有する免疫調節タンパク質は、細胞内（細胞質）ドメインを欠いているか、または細胞内ドメインの一部を欠く。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質は、アミノ酸改変（複数可）を含有するIgVドメイン及び/またはIgC（例えば、IgC2）ドメイン（複数可）またはその特異的結合断片を含有するECDドメインまたはその一部を含有するvIgD部分のみを含有する。

10

#### 【0198】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、単量体形態である及び/またはその結合パートナーへの1価の結合を示すバリエーションPD-L2ポリペプチドであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、可溶性である及び/または膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを欠くバリエーションPD-L2などの、記載されるバリエーションPD-L2ポリペプチドは、さらなる部分に直接的または間接的に連結される。いくつかの実施形態では、さらなる部分は、タンパク質、ペプチド、小分子または核酸である。いくつかの実施形態では、1価の免疫調節タンパク質は、融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、部分は、半減期延長部分である。このような半減期延長部分の例には、限定されないが、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、Pro/Ala/Ser（PAS）、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータサブユニットのC末端ペプチド（CTP）、ポリエチレングリコール（PEG）、アミノ酸の長い非構造化親水性配列（XTEN）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、アルブミン結合小分子、またはこれらの組み合わせが含まれる。

20

#### 【0199】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドは、アミノ酸Pro、Ala、及びSerから構成される立体構造的に乱れたポリペプチド配列を含む部分に連結することができる（例えば、WO2008/155134、SEQ ID NO: 2033を参照）。場合によっては、アミノ酸リピートは少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれ以上のアミノ酸残基であり、各リピートは、1つまたは複数のAla、Ser、及びPro残基を含む。したがって、PAS化タンパク質である免疫調節タンパク質が本明細書で提供され、該バリエーションPD-L1ポリペプチドは、直接的またはリンカーを介して間接的にPro/Ala/Ser（PAS）に連結する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加のリンカー構造が使用され得る。

30

#### 【0200】

いくつかの実施形態では、該部分は、バリエーションPD-L2ポリペプチドの検出または精製を促す。場合によっては、免疫調節ポリペプチドは、PD-L2ポリペプチドのN末端及び/またはC末端に直接または間接的に連結されたタグまたは融合ドメイン、例えば親和性または精製タグを含む。様々な好適なポリペプチドタグ及び/または融合ドメインが知られており、限定されないが、ポリヒスチジン（His）タグ、FLAGタグ（SEQ ID NO: 2034）、Mycタグ、及び蛍光タンパク質タグ（例えば、SEQ ID NO: 2035~2037に記載のEGFP）が挙げられる。場合によっては、バリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドは、少なくとも6つのヒスチジン残基を含む（SEQ ID NO: 1253に記載）。場合によっては、バリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドは、部分の様々な組み合わせをさらに含む。例えば、バリエーションPD-L2を含む免疫調節ポリペプチドは、1つまたは複数のポリヒスチジンタグ及

40

50

びFLAGタグをさらに含む。

【0201】

いくつかの実施形態では、PD-L2ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1187に記載されるような1価形態のままである改変免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)に連結される。

【0202】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、直接的またはリンカーを介して間接的に多量体化ドメインに連結されるバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有する。いくつかの態様では、多量体化ドメインは、分子の半減期を延長する。2つ以上のバリエーションPD-L2ポリペプチドの相互作用は、直接的または間接的に、それらのそれ自体が相互作用して安定な構造を形成できる任意の部分または他のポリペプチドに対する連結により促され得る。例えば、別々のコードされたバリエーションPD-L2ポリペプチド鎖は、多量体化により結合され得、そのポリペプチドの多量体化は、多量体化ドメインによって媒介される。典型的には、多量体化ドメインは、第1のバリエーションPD-L2ポリペプチドと第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドとの間の安定したタンパク質-タンパク質相互作用の形成を提供する。

10

【0203】

ホモまたはヘテロ多量体ポリペプチドは、別々のバリエーションPD-L2ポリペプチドの共発現から生成することができる。第1及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドは、同一であっても異なってもよい。特定の実施態様では、第1及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドは、ホモ二量体では同じであり、それぞれが同じ多量体化ドメインに連結されている。他の実施形態では、ヘテロ二量体を、異なる第1及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドを連結することにより形成することができる。かかる実施形態では、いくつかの態様では、第1及び第2のバリエーションPD-L2ポリペプチドは、ヘテロ二量体形成を促進することができる異なる多量体化ドメインに連結される。

20

【0204】

いくつかの実施形態では、多量体化ドメインには、安定したタンパク質-タンパク質相互作用を形成可能な任意のものが含まれる。多量体化ドメインは、免疫グロブリン配列(例えば、Fcドメイン;例えば、国際特許公開WO93/10151及びWO2005/063816 US;米国特許番号第2006/0024298号;米国特許番号第5,457,035号を参照);ロイシンジッパー(例えば、核転写タンパク質fos及びjunもしくはがん原遺伝子c-myc由来または窒素の一般制御(GCN4)由来)(例えば、Busch and Sassone-Corsi (1990) Trends Genetics, 6:36-40;Gentz et al., (1989) Science, 243:1695-1699を参照);疎水性領域;親水性領域;またはホモもしくはヘテロ多量体のキメラ分子間に分子間ジスルフィド結合を形成する遊離チオール、を介して相互作用することができる。加えて、多量体化ドメインは、例えば、米国特許第5,731,168号;国際特許公開WO98/50431及びWO2005/063816;Ridgway et al. (1996) Protein Engineering, 9:617-621に記載されているような、ホールを含むアミノ酸配列に相補的な突起を含むアミノ酸配列を含むことができる。そのような多量体化領域は、立体相互作用が安定した相互作用を促進するだけでなく、キメラ単量体の混合物からのホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成をさらに促進するように操作することができる。一般的に、突起は、第1のポリペプチドの界面の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置き換えることにより構築される。突起と同一または類似のサイズの代償性の空洞は、より大きなアミノ酸側鎖をより小さいもの(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置き換えることにより、第2のポリペプチドの界面に任意で作製される。例示的な多量体化ドメインについて以下に説明する。

30

40

【0205】

バリエーションPD-L2ポリペプチドは、任意の場所で結合できるが、典型的にはそのN

50

末端またはC末端を介して多量体化ドメインのN末端またはC末端に結合してキメラポリペプチドを形成できる。連結は、直接的またはリンカーを介して間接的であり得る。キメラポリペプチドは、融合タンパク質であり得るか、または共有もしくは非共有相互作用などによる化学的連結により形成され得る。例えば、多量体化ドメインを含有するキメラポリペプチドを調製する場合、バリエーションPD-L2ポリペプチドの全てまたは一部をコードする核酸は、直接的または間接的または任意でリンカドメインを介して、多量体化ドメイン配列をコードする核酸に作動可能に連結できる。場合によっては、構築物は、バリエーションPD-L2ポリペプチドのC末端が多量体化ドメインのN末端に結合しているキメラタンパク質をコードする。場合によっては、構築物は、バリエーションPD-L2ポリペプチドのN末端が多量体化ドメインのN末端またはC末端に結合しているキメラタンパク質をコードすることができる。

10

【0206】

ポリペプチド多量体は、同一または異なるバリエーションPD-L2ポリペプチドの2つを、直接的または間接的に多量体化ドメインに直接または間接的に連結することにより作製された複数の（例えば2つの）キメラタンパク質を含有する。いくつかの実施例では、多量体化ドメインがポリペプチドである場合、バリエーションPD-L2ポリペプチド及び多量体化ドメインをコードする遺伝子融合体が適切な発現ベクターに挿入される。得られたキメラまたは融合タンパク質は、組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞で発現させることができ、会合して多量体となることが可能にされ、多量体化ドメインは相互作用して多価ポリペプチドを形成する。バリエーションPD-L2ポリペプチドに対する多量体化ドメインの化学的連結は、ヘテロ二官能性リンカーを使用して実施することができる。

20

【0207】

融合タンパク質などの得られたキメラポリペプチド、及びそれから形成された多量体は、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラムでのアフィニティークロマトグラフィーなどの任意の適切な方法によって精製することができる。異なるポリペプチドをコードする2つの核酸分子が細胞に形質転換される場合、ホモ及びヘテロ二量体の形成が起こる。発現条件は、ホモ二量体形成よりもヘテロ二量体形成が優先されるように調整できる。

【0208】

いくつかの実施形態では、多量体化ドメインは、免疫グロブリン由来のFcドメインまたはその一部分である。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、免疫グロブリンFcに結合したバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む（PD-L2 vIgD-Fc融合体とも呼ばれる「PD-L2-Fcバリエーション融合体」などの「免疫調節Fc融合体」を得る）。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドの結合は、FcのN末端である。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドの結合は、FcのC末端である。いくつかの実施形態では、2つ以上のPD-L2バリエーションポリペプチド（同一または異なる）は、N末端及びC末端に独立して結合している。

30

【0209】

いくつかの実施形態では、FcはネズミまたはヒトFcである。いくつかの実施形態では、Fcは、哺乳動物またはヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域である。いくつかの実施形態では、Fcは、IgG1、例えばヒトIgG1に由来する。いくつかの実施形態では、Fcは、SEQ ID NO: 211に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 211に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

40

【0210】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、1つまたは複数の通常の機能を変化（例えば、低減）させるためのもう1つの改変を含有する。一般に、Fc領域は、免疫グロブリンの主な機能である抗原結合能に加えて、補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）などのエフェクター機能に関与する。場合によっては、Fc領域のエフェクター機能は、プログラム細胞死及び細胞貪食を含むことができる。加えて、Fc領域

50

に存在するFcRn配列は、*in vivo* FcRn受容体へのコンジュゲーションにより*in vivo*半減期を延長することにより、血清中のIgGレベルを調節する役割を果たす。いくつかの実施形態では、そのような機能は、提供されるFc融合タンパク質とともに使用するために、Fcにおいて低下または変化させることができる。

#### 【0211】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L2-Fcバリエーション融合体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸改変を導入することができ、これにより、Fc領域バリエーションが生成される。いくつかの実施形態では、Fc領域バリエーションは、エフェクター機能が低下している。エフェクター機能を変化させる可能性があるFc配列に対する変更または変異の例は数多くある。例えば、WO00/42072、WO2006019447、WO2012125850、WO2015/107026、US2016/0017041及びShields et al. *J Biol Chem.* 9(2):6591-6604(2001)は、FcRへの結合が改善または減少した例示的なFcバリエーションについて記載する。これらの刊行物の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれている。

#### 【0212】

いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2-Fc融合体は、エフェクター機能の低下を示すFc領域を含み、これにより、*in vivo*でのPD-L2-Fcバリエーション融合体の半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能(CDC及びADCなど)が不要または有害である用途に対する望ましい候補となる。*in vitro*及び/または*in vivo*細胞傷害アッセイを実施して、CDC及び/またはADC活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施して、PD-L2-Fcバリエーション融合体がFcR結合を欠く(したがってADC活性を欠く可能性が高い)が、FcRn結合能力は保持することを確認できる。ADCを媒介する主な細胞であるNK細胞は、FcRIのみを発現するが、一方、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991)の464頁の表3にまとめられている。関心対象の分子のADC活性を評価するための*in vitro*アッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063(1986)を参照)、及びHellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502(1985);米国特許第5,821,337号(Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361(1987)を参照のこと)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を使用してもよい(例えば、フローサイトメトリー用のACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, Calif.;及びCytotox 96(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, Wis.)を参照のこと)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、またはこれに加えて、関心対象の分子のADC活性は、例えば、Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656(1998)に開示されているような動物モデルにおいて、*in vivo*で評価され得る。

PD-L2-Fcバリエーション融合体がC1qに結合できず、したがってCDC活性を欠いていることを確認するために、C1q結合アッセイを実施することもできる。例えば、WO2006/029879及びWO2005/100402のC1q及びC3c結合ELISAを参照のこと。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを実施してよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163(1996);Cragg, M. S. et al., *Bloo*

10

20

30

40

50

d 101:1045-1052(2003);及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照のこと)。また、当技術分野において公知の方法を使用してFcRn結合及びin vivoクリアランス/半減期決定を実施することもできる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照のこと)。

#### 【0213】

エフェクター機能が低下しているPD-L2-Fcバリエーション融合体には、EU番号付けによるFc領域の残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの一つまたは複数の置換を有するものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。そのようなFc変異体には、EU番号付けによるアミノ酸位置265、269、270、297、及び327のうちの一つ以上に置換を有するFc変異体が含まれ、残基265及び297がアラニンに置換されたいわゆる「DANA」Fc変異体を含む(米国特許第7,332,581号)。

10

#### 【0214】

いくつかの実施形態では、PD-L2-Fcバリエーション融合体のFc領域は、位置234、235、236、237、238、239、270、297、298、325、及び329(EU番号付けによって示される)におけるアミノ酸のいずれか一つまたは複数、天然Fc領域と比較して、異なるアミノ酸で置換されている、Fc領域を有する。そのようなFc領域の変化は、上記の変化に限定されず、例えば、Current Opinion in Biotechnology(2009)20(6),685-691に記載されている脱グリコシル化鎖(N297A及びN297Q)、IgG1-N297G、IgG1-L234A/L235A、IgG1-L234A/L235E/G237A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A、and IgG4-L236Eなどの変化;WO2008/092117に記載されているG236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R、及びN325L/L328Rなどの変化;233、234、235、及び237位(EU番号付けによって示される)におけるアミノ酸挿入;ならびにWO2000/042072に記載されている部位における変化を含む。

20

30

#### 【0215】

FcRへの結合が改善または減少した、ある特定のFcバリエーションが記載されている。(例えば、米国特許第6,737,056号;WO2004/056312、WO2006019447及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照のこと)

#### 【0216】

いくつかの実施形態では、半減期を延長させる及び/または新生児Fc受容体(FcRn)への結合を改善する一つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションFc領域を含む、PD-L2-Fcバリエーション融合体が提供される。半減期が延長された及びFcRnに対する結合が改善された抗体が、US2005/0014934A1(Hintonら)またはWO2015107026に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する一つまたは複数の置換をその中に有するFc領域を含む。そのようなFcバリエーションは、EU番号付けによるFc領域残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434の一つまたは複数に置換、例えばFc領域残基434の置換を有するものを含む(米国特許第7,371,826号)。

40

50

## 【0217】

いくつかの実施形態では、PD-L2-Fcバリエーション融合体のFc領域は、E356D及びM358L（EU番号付けによる）の1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L2-Fcバリエーション融合体のFc領域は、C220S、C226S及び/またはC229S（EU番号付けによる）の1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L2バリエーション融合体のFc領域は、R292C及びV302Cの1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。また、Fc領域バリエーションの他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; 及びWO94/29351も参照されたい。

10

## 【0218】

いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、WO99/51642、及びIdusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)に記載される低下したC1q結合及び/または補体依存性細胞傷害(CDC)をもたらす変化がFc領域でなされる。

## 【0219】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むバリエーションFc領域を含み、該バリエーションFc領域がIgG1、例えばヒトIgG1に由来する、PD-L2-Fcバリエーション融合体が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO: 211に記載のアミノ酸配列に由来する。いくつかの実施形態では、Fcは、SEQ ID NO: 211の番号付けによるN82G（EU番号付けによるN297Gに対応する）である少なくとも1つのアミノ酸置換を含有する。いくつかの実施形態では、Fcは、SEQ ID NO: 211の番号付けによるR77CまたはV87C（EU番号付けによるR292CまたはV302Cに対応する）である少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO: 211の番号付けによるC5S（EU番号付けによるC220Sに対応する）アミノ酸改変をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、以下のアミノ酸改変：EU番号付けによる、V297G及び次のアミノ酸改変C220S、R292CまたはV302Cの1つまたは複数（SEQ ID NO: 211に基づいて、N82G及び次のアミノ酸改変C5S、R77CまたはV87Cの1つまたは複数に対応する）を含み、例えば、該Fc領域はSEQ ID NO: 1205に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、L234A、L235EまたはG237Aの1つまたは複数を含み、例えば、該Fc領域はSEQ ID NO: 1206に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、L235P、L234V、L235A、G236delまたはS267Kの1つまたは複数を含み、例えば、該Fc領域はSEQ ID NO: 1207に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、L234A、L235E、G237A、E356DまたはM358Lの1つまたは複数を含み、例えば、該Fc領域はSEQ ID NO: 1189に記載の配列を含む。

20

30

40

## 【0220】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、SEQ ID NO: 211に記載の野生型または非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く（EU番号付けによるK447delに対応）。いくつかの態様では、そのようなFc領域は、1つまたは複数の追加の改変、例えば記載されたものなどのアミノ酸置換をさらに含むことができる。そのようなFc領域の例は、SEQ ID NO: 1737、1738、1739、または1740に記載される。

## 【0221】

いくつかの実施形態では、バリエーションFcがSEQ ID NO: 1189、1205、1206、1207、1737、1738、1739もしくは1740のいずれかに記

50

載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 1189、1205、1206、1207、1737、1738、1739もしくは1740のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、バリエーションFc領域を含むPD-L2-Fcバリエーション融合体が提供される。

【0222】

いくつかの実施形態では、Fcは、IgG2、例えばヒトIgG2に由来する。いくつかの実施形態では、Fcは、SEQ ID NO: 212に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 212に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

10

【0223】

いくつかの実施形態では、IgG4 Fcは、ヒトIgG4のCH3ドメインがヒトIgG1のCH3ドメインで置換されておりかつ阻害された凝集体形成を示す安定化されたFc、ヒトIgG4のCH3及びCH2ドメインがそれぞれヒトIgG1のCH3及びCH2ドメインで置換されている抗体、またはヒトIgG4のKabatraによって提案されたEUインデックスで示される位置409においてアルギニンがリジンで置換されており、阻害された凝集体形成を示す抗体である（例えば、米国特許第8,911,726号を参照のこと）。いくつかの実施形態では、Fcは、Fabアーム交換によって治療用抗体と内在性IgG4との間の組換えを防止すると示されている、S228P変異を含有するIgG4である（例えば、Labrijin et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27(8)767-71を参照のこと）。いくつかの実施形態では、Fcは、hIgG4のアミノ酸配列を含む。

20

【0224】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、Fc配列に直接的に連結される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、例えばリンカーを介して、Fc配列に間接的に連結される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の「ペプチドリンカー」がバリエーションPD-L2ポリペプチドとFcドメインを連結する。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、単一アミノ酸残基またはそれより大きい長さであることができる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのアミノ酸残基を有するが、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸残基長以下である。いくつかの実施形態では、リンカーは、3つのアラニン(AAA)である。いくつかの実施形態では、リンカーは柔軟なリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、(一文字アミノ酸コードで)GGGGS(「4GS」または「G<sub>4</sub>S」; SEQ ID NO: 1742)または4GSリンカーの多量体、例えばSEQ ID NO: 264に記載されるような(2×GGGGS)またはSEQ ID NO: 263に記載されるような(3×GGGGS)、例えば2つ、3つ、4つ、または5つの4GSリンカーの繰り返しである。いくつかの実施形態では、リンカーは、(一文字アミノ酸コードで)GSGGGS(SEQ ID NO: 1741)である。いくつかの実施形態では、リンカーはまた、一連のアラニン残基を単独で、または別のペプチドリンカー(4GSリンカーまたはその多量体など)に加えて含むこともできる。いくつかの実施形態では、各連のアラニン残基の数は、2、3、4、5、または6個のアラニンである。いくつかの実施形態では、リンカーは剛性リンカーである。例えば、リンカーはヘリックスリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、(一文字アミノ酸コードで)EAAAKまたはEAAAKリンカーの多量体、例えばSEQ ID NO: 2030に記載されるような(1×EAAAK)、SEQ ID NO: 2031に記載されるような(3×EAAAK)またはSEQ ID NO: 2032に記載されるような(5×EAAAK)、例えば2つ、3つ、4つ、または5つのEAAAKリンカーの繰り返しである。いくつかの実施形態では、リンカーは、クローニングによって及び/または制限部位から導入され

30

40

50

たアミノ酸をさらに含むことができ、例えば、リンカーは、制限部位 B A M H I の使用によって導入されたアミノ酸 G S ( 1 文字のアミノ酸コード) を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、( 1 文字のアミノ酸コードで) G S G G G G S ( S E Q I D N O : 1 7 4 1 )、G S ( G<sub>4</sub> S )<sub>3</sub> ( S E Q I D N O : 2 0 4 0 )、または G S ( G<sub>4</sub> S )<sub>5</sub> ( S E Q I D N O : 2 0 4 1 ) である。いくつかの実施例では、リンカーは、2 x G G G G S の後に 3 つのアラニンが続く ( G G G G S G G G G S A A A ; S E Q I D N O : 2 6 5 )。場合によっては、バリエーション P D - L 2 を含む免疫調節ポリペプチドは、ペプチドリッカーの様々な組み合わせを含む。

#### 【 0 2 2 5 】

いくつかの実施形態では、バリエーション P D - L 2 - F c 融合タンパク質は、F c ドメインに連結した 2 つのバリエーション P D - L 2 F c ポリペプチドによって形成される二量体である。いくつかの実施形態では、二量体は、2 つのバリエーション P D - L 2 F c ポリペプチドが同一であるホモ二量体である。いくつかの実施形態では、二量体は、2 つのバリエーション P D - L 2 F c ポリペプチドが異なるヘテロ二量体である。

10

#### 【 0 2 2 6 】

また、バリエーション P D - L 2 - F c 融合タンパク質をコードする核酸分子も提供される。いくつかの実施形態では、F c 融合タンパク質の産生のために、バリエーション P D - L 2 - F c 融合タンパク質をコードする核酸分子が適切な発現ベクターに挿入される。得られたバリエーション P D - L 2 - F c 融合タンパク質は、F c 部分間に形成された鎖間ジスルフィド結合により F c ドメイン間のアセンブリが起こり、二量体、例えば二価のバリエーション P D - L 2 - F c 融合タンパク質を生じさせる発現を伴う形質転換された宿主細胞で発現されることができる。

20

#### 【 0 2 2 7 】

得られた F c 融合タンパク質は、プロテイン A またはプロテイン G カラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって容易に精製することができる。ヘテロ二量体の生成の場合、精製のために追加ステップが必要になる可能性がある。例えば、異なるバリエーション P D - L 2 ポリペプチドをコードする 2 つの核酸が細胞に形質転換される場合、F c ドメインを保持するバリエーション P D - L 2 分子はジスルフィド連結ホモ二量体としても発現されるため、ヘテロ二量体の形成は生化学的に達成されなければならない。したがって、ホモ二量体は、鎖間ジスルフィドの破壊に有利であるが、鎖内ジスルフィドには影響しない条件下で減らすことができる。場合によっては、異なるバリエーション P D - L 2 F c 単量体を等モル量で混合し、酸化させてホモ二量体及びヘテロ二量体の混合物を形成する。この混合物の成分は、クロマトグラフ技術によって分離される。あるいは、以下に説明するノブ・イントゥ・ホール法を使用してバリエーション P D - L 2 ポリペプチドを含有する F c 融合分子を遺伝子操作し、発現させることにより、このタイプのヘテロ二量体の形成は偏り得る。

30

#### 【 0 2 2 8 】

##### B . 追加の I g S F ドメインを有するスタック分子

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、1 つまたは複数の他の免疫グロブリンスーパーファミリー ( I g S F ) ドメインに直接的または間接的に連結された本明細書において提供されるバリエーション P D - L 2 ポリペプチドのいずれかを含有することができる ( 「スタックされた」免疫調節タンパク質構築物、また「I I 型」免疫調節タンパク質とも呼ばれる)。いくつかの態様では、これは、2 つ以上、例えば 3 つ以上の同族結合パートナーと結合することによって免疫シナプスの多標的指向調節を提供する、固有のマルチドメイン免疫調節タンパク質を作製することができる。

40

#### 【 0 2 2 9 】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、バリエーション P D - L 2 ドメインと、野生型 I g S F ファミリーメンバーに見いだされない別の I g S F ファミリーメンバー ( 例えば、哺乳動物 I g S F ファミリーメンバー) の 1 つまたは複数の他の親和性改変 I g S F ドメイン配列及び / または非親和性改変 I g S F ドメイン配列との組み合わせ ( 「非

50

野生型組み合わせ」)及び/または配置(「非野生型配置」または「非野生型順列」)を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメインを含有し、該IgSFドメインの少なくとも1つは、提供される記載によるパリアントPD-L2 IgSFドメイン(PD-L2のvIgD)である。

#### 【0230】

いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインの配列は、野生型または非改変IgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換)を含有する改変されたIgSFドメインであることができる。いくつかの実施形態では、IgSFドメインは、非親和性改変であってもよく(例えば、野生型)、または親和性が改変されていてもよい。いくつかの実施形態では、非改変または野生型IgSFドメインは、マウス、ラット、カニクイザル、もしくはヒト起源、またはそれらの組み合わせ由来であることができる。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、表2に記載のIgSFファミリーメンバーのIgSFドメインであることができる。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、表2に記載のIgSFファミリーメンバーに含有されるIgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換)を含有する親和性改変IgSFドメインであることができる。

#### 【0231】

いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、以下から選択されるファミリーのIgSFファミリーメンバーに含有される、親和性改変または非親和性改変IgSFドメインである:シグナル制御タンパク質(SIRP)ファミリー、骨髄細胞で発現するトリガー受容体様(TREML)ファミリー、がん胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリー、シアル酸結合Ig様レクチン(SIGLEC)ファミリー、プチロフィリンファミリー、B7ファミリー、CD28ファミリー、Vセット及び免疫グロブリンドメイン含有(VSIG)ファミリー、Vセット膜貫通ドメイン(VSTM)ファミリー、主要組織適合複合体(MHC)ファミリー、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)ファミリー、白血球免疫グロブリン様受容体(LIR)、ネクチン(Nec)ファミリー、ネクチン様(NECL)ファミリー、ポリオウイルス受容体関連(PVR)ファミリー、天然細胞傷害誘発受容体(NCR)ファミリー、T細胞免疫グロブリン及びムチン(TIM)ファミリー、またはキラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)ファミリー。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは独立して、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、CD274(PD-L2、B7-H1)、PDCD1LG2(PD-L2、CD273)、ICOSLG(B7RP1、CD275、ICOSL、B7-H2)、CD276(B7-H3)、VTCN1(B7-H4)、CD28、CTLA4、PDCD1(PD-1)、ICOS、BTLA(CD272)、CD4、CD8A(CD8- )、CD8B(CD8- )、LAG3、HAVCR2(TIM-3)、CEACAM1、TIGIT、PVR(CD155)、PVR2(CD112)、CD226、CD2、CD160、CD200、CD200R1(CD200R)、及びNCR3(NKp30)からなる群より選択されるIgSFタンパク質に由来する。

#### 【0232】

表2の1列目は、その特定のIgSFメンバーについての名称、及び任意でいくつかの可能な別名を提供する。2列目は、uniprot.orgでインターネットを介してアクセス可能な公的に利用可能なデータベースである、UniProtKBデータベースのタンパク質識別子を提供し、場合によっては、GenBank番号を提供する。Universal Protein Resource(UniProt)は、タンパク質配列及び注釈データ用の包括的リソースである。UniProtデータベースは、UniProt知識ベース(UniProtKB)を含む。UniProtは、欧州バイオインフォマティクス研究所(EMBL-EBI)、SIBスイスバイオインフォマティクス研究所、及びタンパク質情報リソース(PIR)の間の共同組織であり、米国国立衛生研究所(NIH)の寄付金によって主に支援されている。GenBankは、NIHの遺伝子配

10

20

30

40

50

列データベースであり、全ての公的に利用可能なDNA配列が注釈付きで集められている (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41(D1): D36-42)。3列目は、表示のIgSFドメインが位置している領域を提供する。該領域は、ドメインが範囲を規定している残基を包含する範囲として特定される。3列目はまた、特定のIgSF領域のIgSFドメインクラスを示す。4列目は、表示の追加のドメインが位置している領域を提供する(シグナルペプチドはS、細胞外ドメインはE、膜貫通ドメインはT、細胞質ドメインはC)。ドメインの記載は、当該ドメインの特定または分類に用いる方法に応じて異なり得ること、及び異なる源から異なって特定され得ることを理解されたい。表2のドメインに対応する残基の記載は、例示ものにすぎず、アミノ酸数個(例えば、1個、2個、3個、または4個)分長いまたは短い場合がある。5列目は、列挙されたIgSFメンバーのうちのいくつか(その同族の細胞表面結合パートナーのうちのいくつか)を示す。

【0233】

(表2) 本開示によるIgSFメンバー

IgSFメンバー (別名)	NCBI タンパク質 アクセシ ョン番号/ UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF領域 及び ドメイン クラス	他の ドメイン	同族の 細胞表面 結合 パートナー	IgSFメンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
CD80 (B7-1)	NP_005182.1  P33681	35-135, 35-138, 37-138 または35-141 IgV, 145-230 または154-232 IgC	S: 1-34, E: 35-242, T: 243-263, C: 264-288	CD28, CTLA4, PD-L1	SEQ ID NO: 1 (35-288)	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 28
CD86 (B7-2)	P42081.2	33-131 IgV, 150-225 IgC2	S: 1-23, E: 24-247, T: 248-268, C: 269-329	CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 2 (24-329)	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 29
CD274 (PD-L1, B7-H1)	Q9NZQ7.1	24-130 IgV, 133-225 IgC2	S: 1-18, E: 19-238, T: 239-259, C: 260-290	PD-1, B7-1	SEQ ID NO: 3 (19-290)	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 30

10

20

30

IgSF メンバー (別名)	NCBI タンパク質 アクセシ ョン番号/ UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF領域 及び ドメイン クラス	他の ドメイン	同族の 細胞表面 結合 パートナー	IgSFメンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
PDCD1LG 2 (PD-L2, CD273)	Q9BQ51.2	21-118 IgV, 122-203 IgC2	S: 1-19, E: 20-220, T: 221-241, C: 242-273	PD-1, RGMb	SEQ ID NO: 4 (20-273)	SEQ ID NO: 216	SEQ ID NO: 31
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7- H2)	O75144.2	19-129 IgV, 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277, C: 278-302	ICOS, CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 217	SEQ ID NO: 32
CD276 (B7-H3)	Q5ZPR3.1	29-139 IgV, 145-238 IgC2, 243-357 IgV2, 363-456, 367- 453 IgC2	S: 1-28, E: 29-466, T: 467-487, C: 488-534		SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 218	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241 IgV	S: 1-24, E: 25-259, T: 260-280, C: 281-282		SEQ ID NO: 7 (25-282)	SEQ ID NO: 219	SEQ ID NO: 34
CD28	P10747.1	28-137 IgV	S: 1-18, E: 19-152, T: 153-179, C: 180-220	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 8 (19-220)	SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 35
CTLA4	P16410.3	39-140 IgV	S: 1-35, E: 36-161, T: 162-182, C: 183-223	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 9 (36-223)	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 36

10

20

30

IgSF メンバー (別名)	NCBI タンパク質 アクセシ ョン番号/ UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF領域 及び ドメイン クラス	他の ドメイン	同族の 細胞表面 結合 パートナー	IgSFメンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
PDCD1 (PD-1)	Q15116.3	35-145 IgV	S: 1-20, E: 21-170, T: 171-191, C: 192-288	PD-L2, PD-L2	SEQ ID NO: 10 (21-288)	SEQ ID NO: 222	SEQ ID NO: 37
ICOS	Q9Y6W8.1	30-132 IgV	S: 1-20, E: 21-140, T: 141-161, C: 162-199	B7RP1	SEQ ID NO: 11 (21-199)	SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 38
BTLA (CD272)	Q7Z6A9.3	31-132 IgV	S: 1-30, E: 31-157, T: 158-178, C: 179-289	HVEM	SEQ ID NO: 12 (31-289)	SEQ ID NO: 224	SEQ ID NO: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV, 126-203 IgC2, 204-317 IgC2, 317-389, 318- 374 IgC2	S: 1-25, E: 26-396, T: 397-418, C: 419-458	MHCクラスII	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8- $\alpha$ )	P01732.1	22-135 IgV	S: 1-21, E: 22-182, T: 183-203, C: 204-235	MHCクラスI	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 226	SEQ ID NO: 41
CD8B (CD8- $\beta$ )	P10966.1	22-132 IgV	S: 1-21, E: 22-170, T: 171-191, C: 192-210	MHCクラスI	SEQ ID NO: 15 (22-210)	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 42

10

20

30

IgSF メンバー (別名)	NCBI タンパク質 アクセシ ョン番号/ UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF領域 及び ドメイン クラス	他の ドメイン	同族の 細胞表面 結合 パートナー	IgSFメンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
LAG3	P18627.5	37-167 IgV, 168-252 IgC2, 265-343 IgC2, 349-419 IgC2	S: 1-28, E: 29-450, T: 451-471, C: 472-525	MHCクラスII	SEQ ID NO: 16 (29-525)	SEQ ID NO: 228	SEQ ID NO: 43
HAVCR2 (TIM-3)	Q8TDQ0.3	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-202, T: 203-223, C: 224-301	CEACAM-1, ホスファチジル セリン, ガレクチン-9, HMGB1	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 44
CEACAM1	P13688.2	35-142 IgV, 145-232 IgC2, 237-317 IgC2, 323-413 IgC2	S: 1-34, E: 35-428, T: 429-452, C: 453-526	TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	SEQ ID NO: 230	SEQ ID NO: 45
TIGIT	Q495A1.1	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-141, T: 142-162, C: 163-244	CD155, CD112	SEQ ID NO: 19 (22-244)	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 46
PVR (CD155)	P15151.2	24-139 IgV, 145-237 IgC2, 244-328 IgC2	S: 1-20, E: 21-343, T: 344-367, C: 368-417	TIGIT, CD226, CD96, ポリオウイルス	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 232	SEQ ID NO: 47
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV, 162-256 IgC2, 261-345 IgC2	S: 1-31, E: 32-360, T: 361-381, C: 382-538	TIGIT, CD226, CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 48

10

20

30

IgSF メンバー (別名)	NCBI タンパク質 アクセシ ョン番号/ UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF領域 及び ドメイン クラス	他の ドメイン	同族の 細胞表面 結合 パートナー	IgSFメンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2, 135-239 IgC2	S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275, C: 276-336	CD155, CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 234	SEQ ID NO: 49
CD2	P06729.2	25-128 IgV, 129-209 IgC2	S: 1-24, E: 25-209, T: 210-235, C: 236-351	CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 50
CD160	O95971.1	27-122 IgV	N/A	HVEM, タンパク質の MHCファミリー	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 51
CD200	P41217.4	31-141 IgV, 142-232 IgC2	S: 1-30, E: 31-232, T: 233-259, C: 260-278	CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 52
CD200R1 (CD200R)	Q8TD46.2	53-139 IgV, 140-228 IgC2	S: 1-28, E: 29-243, T: 244-264, C: 265-325	CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 238	SEQ ID NO: 53
NCR3 (NKp30)	O14931.1	19-126 IgC様	S: 1-18, E: 19-135, T: 136-156, C: 157-201	B7-H6	SEQ ID NO:27 (19-201)	SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 54
VSIG8	Q5VU13	22-141 IgV,1 146-257 IgV2	S: 1-21 E: 22-263 T: 264-284 C: 285-414	VISTA	SEQ ID NO: 240 (22-414)	SEQ ID NO: 241	SEQ ID NO: 242

10

20

30

40

50

## 【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含有することに加えて、少なくとも2、3、4、5または6個の追加の免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメイン、例えば表2に記載のIgSFファミリーメンバーのIgDドメインも含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも1つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2のIgSFドメイン)を含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも2つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2及び第3のIgSFドメイン)を含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも3つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2、第3、及び第4)を含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも4つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2、第3、第4、及び第5)を含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも5つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2

、第3、第4、第5、及び第6)を含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも6つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2、第3、第4、第5、第6、及び第7)を含有する。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質のIgSFドメインのそれぞれは異なる。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインの少なくとも1つは、免疫調節タンパク質の少なくとも1つの他のIgSFドメインと同じである。いくつかの実施形態では、IgSFドメインのそれぞれは、異なるIgSFファミリーメンバーに由来するか、または異なるIgSFファミリーメンバーから誘導される。いくつかの実施形態では、IgSFドメインの少なくとも2つは、同一のIgSFファミリーメンバーに由来するか、または同一のIgSFファミリーメンバーから誘導される。

10

**【0235】**

いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、IgVドメインもしくはIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)、またはIgVドメインの特異的結合断片もしくはIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)の特異的結合断片を含む。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、完全長IgVドメインであるか、それを含む。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、完全長IgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)であるか、それを含む。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、IgVドメインの特異的結合断片であるか、それを含む。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメインは、IgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)の特異的結合断片であるか、それを含む。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、単一の(同じ)IgSFメンバー由来の少なくとも2つの追加のIgSFドメインを含有する。例えば、いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、完全長IgVドメイン及び完全長IgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)またはその特異的結合断片を含有するIgSFメンバーのECDまたはその一部分を含有する。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも1つの追加のIgSFドメイン(例えば、第2の、または場合によっては、第3のIgSFドメインなども)を含有し、少なくとも1つの追加のまたは第2のIgSFドメインは、SEQ ID NO: 1~27及び240のいずれかに記載のアミノ酸配列に含有される野生型または非改変IgSFドメインまたはその特異的結合断片に記載のIgSFドメインである。いくつかの実施形態では、野生型または非改変IgSFドメインは、IgVドメインまたはIgCドメイン、例えばIgC1またはIgC2ドメインである。

20

30

**【0236】**

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、バリエーションPD-L2ポリペプチドを含有することに加えて、少なくとも1つの追加の親和性改変IgSFドメイン(例えば、第2の、または場合によっては、第3の親和性改変IgSFドメインなども)も含有し、少なくとも1つの追加のIgSFドメインは、野生型または非改変IgSFドメイン内のIgSFドメイン、例えば表2に記載のIgSFファミリーメンバーのIgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換、欠失または変異)を含有するvIgDである。いくつかの実施形態では、追加の、または第2の親和性改変IgSFドメインは、番号1~27及び240のいずれかに記載のアミノ酸配列に含有される野生型または非改変IgSFドメインまたはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、野生型または非改変IgSFドメインは、IgVドメインまたはIgCドメイン、例えばIgC1またはIgC2ドメインである。いくつかの実施形態では、追加の、例えば第2または第3のIgSFドメインは、親和性改変IgVドメイン及び/またはIgCドメインである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加のIgSFドメインは、IgVドメイン及び/またはIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)、またはIgVドメインの特異的結合断片及び/またはIgC(例えば、IgC2)ドメイン(複数可)の特異的結合断片を含有する親和性改変IgSFドメインであり、

40

50

該 I g V ドメイン及び/または I g C ドメインは、アミノ酸改変（例えば、置換）（複数可）を含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加の親和性改変 I g S F ドメインは、アミノ酸改変（例えば、置換）（複数可）を含有する I g V ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加の親和性改変 I g S F ドメインは、対応する非改変 I g S F ファミリーメンバーの E C D または E C D の一部分に存在する I g S F ドメイン、例えば、完全長 I g V ドメイン及び完全長 I g C（例えば、I g C 2）ドメイン（複数可）またはその特異的結合断片を含み、該 I g V 及び I g C の一方または両方は、アミノ酸改変（例えば、置換）（複数可）を含有する。

#### 【0237】

いくつかの実施形態では、バリエーション P D - L 2 を含む免疫調節ポリペプチドは、1つまたは複数の本明細書に提供される P D - L 2 の v I g D を含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるバリエーション P D - L 2 免疫調節タンパク質は、正確に 1、2、3、4、5、またはそれ以上のバリエーション P D - L 2 配列を含む。いくつかの実施形態では、バリエーション P D - L 2 配列のうち少なくとも 2 つは、同一のバリエーション I g S F ドメインである。

10

#### 【0238】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節ポリペプチドは、P D - L 2 の 2 つ以上の v I g D 配列を含む。ポリペプチド鎖内の複数のバリエーション P D - L 2 は、互いに同一（すなわち、同種）または非同種（すなわち、異種）のバリエーション P D - L 2 配列であることができる。単一のポリペプチド鎖の実施形態に加えて、いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドの 2 つ、3 つ、4 つ、またはより多くが、互いに共有結合または非共有結合していてもよい。したがって、単量体、二量体、及びより高次の（例えば、3、4、5、またはより高次の）多量体タンパク質が本明細書において提供される。例えば、いくつかの実施形態では、正確に 2 つの本発明のポリペプチドが、互いに共有結合または非共有結合して二量体を形成することができる。いくつかの実施形態では、結合は、鎖間システインジスルフィド結合を介してなされる。本発明の 2 つ以上のポリペプチドを含む組成物は、同一種もしくは実質的に同一種のポリペプチド（例えば、ホモ二量体）または非同種種のポリペプチド（例えば、ヘテロ二量体）のものであることができる。本発明の複数の連結されたポリペプチドを有する組成物は、上に述べたとおり、各ポリペプチド鎖に 1 つまたは複数の同一または非同種の本発明のバリエーション P D - L 2 を有することができる。いくつかの特定の実施形態では、P D - L 2 - F c バリエーション融合ポリペプチドの同一または実質的に同一の種（3 つ以下の N 末端または C 末端アミノ酸配列の差異を可能にする）は、二量体化してホモ二量体を作成する。あるいは、異なる種の P D - L 2 - F c バリエーション融合ポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得ることができる。

20

30

#### 【0239】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節タンパク質は、P D - L 2 以外の野生型または非改変 I g S F ドメインの I g S F ドメイン（例えば、I g V）と比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換を含有する v I g D である少なくとも 1 つの追加の（例えば、第 2 の、または場合によっては、第 3 の I g S F ドメインなども）I g S F ドメインを含有する。

40

#### 【0240】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加の I g S F ドメイン（例えば、第 2 または第 3 の I g S F）ドメインは、それ自体も阻害性受容体に結合する別の I g S F ファミリーメンバーの I g S F ドメイン（例えば、I g V）である。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加の I g S F ドメイン（例えば、第 2 または第 3 の I g S F）ドメインは、I g S F ファミリーメンバーのバリエーション I g S F ドメイン（v I g D）である親和性改変 I g S F ドメインであり、阻害性受容体に結合し、I g S F ドメイン（例えば、I g V）に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含有する、その v I g D を含有するか、その v I g D であり、場合によっては、該 1 つまたは複数のアミノ酸改変により阻害性受容体への結合が増加する。いくつかの実施形態では、v I g D は、阻害性受容体に結合する I g

50

S Fファミリーメンバーの野生型または非改変 I g S Fドメイン（例えば、I g V）に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有する。PD - 1に加えて、そのような阻害性受容体の例は、C T L A - 4、L A G 3、T I G I T、T I M - 3、またはB T L Aである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加のI g S Fドメインは、C D 1 1 2、C D 1 5 5、P D - L 1、C D 8 0またはC E A C A M 1から選択されたI g S Fファミリーメンバー由来である。したがって、いくつかの態様では、2つ以上の阻害性受容体の活性を標的とする、または遮断するマルチターゲットチェックポイント拮抗物質が提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも2つ、3つ、4つ以上の阻害性受容体の活性を標的とする、または遮断するマルチターゲットチェックポイント拮抗物質における免疫調節タンパク質である。

10

#### 【0241】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD - L 2ポリペプチドのいずれか1つ、及び野生型または非改変阻害性受容体などの阻害性受容体の1つまたは複数のI g S Fドメインを含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD - L 2ポリペプチドのいずれか1つ、及びC D 8 0、例えば野生型または非改変C D 8 0の1つまたは複数のI g S Fドメイン、例えば、S E Q I D N O : 1 0 3 9、1 1 1 3、2 0 3 9に記載のI g Vドメイン、またはS E Q I D N O : 2 8もしくはその一部分に記載のE C Dもしくはその一部分（I g V及びI g Cドメインまたはその特異的結合断片を含有する）を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD - L 2ポリペプチドのいずれか1つ、及びP D - L 1、例えば野生型または非改変P D - L 1の1つまたは複数のI g S Fドメイン、例えばS E Q I D N O : 1 2 5 8もしくは1 4 5 4に記載のI g Vドメイン、またはS E Q I D N O : 3 0もしくは1 8 1 2もしくはその一部分に記載のE C Dもしくはその一部分（I g V及びI g Cドメインまたはその特異的結合断片を含有する）を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD - L 2ポリペプチドのいずれか1つ、及びC D 1 1 2、例えば野生型または非改変C D 1 1 2の1つまたは複数のI g S Fドメイン、例えば、S E Q I D N O : 7 0 0もしくは7 9 5に記載のI g Vドメイン、またはS E Q I D N O : 4 8もしくはその一部分に記載のE C Dもしくはその一部分（I g V及びI g Cドメインまたはその特異的結合断片を含有する）を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションPD - L 2ポリペプチドのいずれか1つ、及びC D 1 5 5、例えば野生型または非改変C D 1 5 5の1つまたは複数のI g S Fドメイン、例えば、S E Q I D N O : 3 4 4もしくは3 8 7に記載のI g Vドメイン、またはS E Q I D N O : 4 7もしくはその一部分に記載のE C Dもしくはその一部分（I g V及びI g Cドメインまたはその特異的結合断片を含有する）を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

20

30

#### 【0242】

いくつかの実施形態では、阻害性受容体に結合するI g S Fファミリーメンバーのv I g Dである1つまたは複数の追加のI g S Fドメイン（例えば、第2または第3のI g S F）を含有する免疫調節タンパク質が提供され、I g S Fドメイン（例えば、I g V）の1つまたは複数のアミノ酸改変により、非改変I g S Fドメインと比較して、v I g D、または該v I g Dを含有する融合体または免疫調節タンパク質の、その阻害性受容体同族結合パートナーに対する結合親和性が増加し、例えば、結合親和性は1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より大きく増加する。いくつかの実施形態では、I g S Fドメイン（例えば、I g V）の1つまたは複数のアミノ酸改変により、非改変I g S Fドメインと比較して、v I g D、または該v I g Dを含有する融合体または免疫調節タンパク質の、その阻害性受容体に対する選択性が増加する。いくつかの実施形態では、選択性の増加は、阻害性受容体へのv I g Dの結合と阻害性受容体ではない同族結合パートナーなどの別の同族結合パートナーへのv I g Dの結合の比が、阻害性受容体への非改変I g S Fの結合と別の同族結合パートナーへの非改変I g S Fの結合の比と比較して大きい。いくつかの実施

40

50

形態では、該比率は、少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍もしくは50倍だけ、または少なくとも約1.2倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約30倍、約40倍もしくは約50倍だけ大きい。

#### 【0243】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加（例えば、第2または第3）vIgDは、非改変または野生型CD80と比較して、IgSFドメイン（例えば、IgV）に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有するバリエーションCD80ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV）であり、これにより、いくつかの態様では、阻害性受容体CTLA-4への結合が増加する。バリエーションCD80ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV、またはIgV及びIgCを含有するECD）における置換、欠失または付加などの例示的なアミノ酸改変を表3に記載する。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、及び表3に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン、例えば、SEQ ID NO: 1040~1072、1074~1112、1114~1146、1148~1186のいずれかに記載のIgVドメイン、またはSEQ ID NO: 1040~1072、1074~1112、1114~1146、1148~1186のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有するIgVドメイン、を含有するバリエーションCD80ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表3に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン及び/またはIgCドメインを含有するECDまたはその一部分、例えば、SEQ ID NO: 966~998、1000~1038のいずれかに記載のECD、またはSEQ ID NO: 966~998、1000~1038のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有するECDを含有するバリエーションCD80ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

#### 【0244】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加（例えば、第2または第3）vIgDは、非改変または野生型CD112と比較して、IgSFドメイン（例えば、IgV）に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有するバリエーションCD112ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV）であり、これにより、いくつかの態様では、阻害性受容体TIGITへの結合が増加する。バリエーションCD112ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV、またはIgV及びIgCを含有するECD）における置換、欠失または付加などの例示的なアミノ酸改変を表4に記載する。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表4に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン、例えば、SEQ ID NO: 748~794、796~842、884~965、1479~1526のいずれかに記載のIgVドメイン、またはSEQ ID NO: 748~794、796~842、884~965、1479~1526のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を有し、もう1つのアミノ酸改変を含有するIgVドメイン、を含有するバリエーションCD112ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表4に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン及び/またはIgCドメインを含有するECDまたはその一部分、例えば、SEQ ID NO: 701~747、843~883、1455~1478のいずれかに記載のECD

、またはSEQ ID NO: 701~747、843~883、1455~1478のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有する、ECDを含有するバリエーションCD112ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

#### 【0245】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加（例えば、第2または第3）vIgDは、非改変または野生型CD155と比較して、IgSFドメイン（例えば、IgV）に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有するバリエーションCD155ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV）であり、これにより、いくつかの態様では、阻害性受容体TIGITへの結合が増加する。バリエーションCD155ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV、またはIgV及びIgCを含有するECD）における置換、欠失または付加などの例示的なアミノ酸改変を表5に記載する。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、及び表5に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン、例えば、SEQ ID NO: 366~386、388~408、506~699、1527~1595、1597~1598、1645~1736のいずれかに記載のIgVドメイン、またはSEQ ID NO: 366~386、388~408、506~699、1527~1595、1597~1598、1645~1736のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を有し、もう1つのアミノ酸改変を含有するIgVドメイン、を含有するバリエーションCD155ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表5に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン及び/またはIgCドメインを含有するECDまたはその一部分、例えば、SEQ ID NO: 1573~1596、1599~1644のいずれかに記載のECD、またはSEQ ID NO: 1573~1596、1599~1644のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有するECDを含有するバリエーションCD155ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

#### 【0246】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加（例えば、第2または第3）vIgDは、非改変または野生型PD-L1と比較して、IgSFドメイン（例えば、IgVまたはECD）に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有するバリエーションPD-L1ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV）であり、これにより、いくつかの態様では、阻害性受容体PD-1への結合が増加する。バリエーションPD-L1ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV、またはIgV及びIgCを含有するECD）における置換、欠失または付加などの例示的なアミノ酸改変を表8に記載する。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、及び表8に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン、例えば、SEQ ID NO: 1324~1453、1810~1811、1992~2021のいずれかに記載のIgVドメイン、またはSEQ ID NO: 1324~1453、1810~1811、1992~2021のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を有し、もう1つのアミノ酸改変を含有するIgVドメイン、を含有するバリエーションPD-L1ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表8に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン及び/またはIgCドメインを含有するECDまたはその一部分、例えば、SEQ ID NO: 12

10

20

30

40

50

59～1323、1743～1809、1813～1991のいずれかに記載のECD、またはSEQ ID NO: 1259～1323、1743～1809、1813～1991のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有する、ECDを含有するバリエーションPD-L1ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

【0247】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加のIgSFドメイン（例えば、第2、または第3のIgSF）ドメインは、腫瘍抗原と結合またはそれを認識する別のIgSFファミリーメンバーのIgSFドメイン（例えば、IgV）である。かかる実施形態では、IgSFファミリーメンバーは腫瘍局在化部分として機能し、これによりPD-L2のvIgDを腫瘍微小環境内の免疫細胞に極めて接近させる。いくつかの実施形態では、追加のIgSFドメイン（例えば、第2のIgSF）ドメインは、NKp30のIgSFドメインであり、腫瘍細胞で発現するB7-H6に結合またはそれを認識する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加の（例えば、第2の）IgSFドメイン、例えばNKp30は、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有する親和性改変IgSFドメインまたはvIgDである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、非改変IgSFドメイン、例えばNKp30と比較して、B7-H6に対する結合親和性及び/または選択性を高め、例えば、少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍もしくは50倍、または少なくとも約1.2倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約30倍、約40倍もしくは約50倍である。バリエーションNKp30ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgC様または完全ECD）における置換、欠失または付加などの例示的なアミノ酸改変を表6に記載する。例示的なポリペプチドの中には、SEQ ID NO: 54に記載の位置に対応するNKp30細胞外ドメインの位置に基づいて変異L30V/A60V/S64P/S86Gを含有するNKp30バリエーションがある。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、及び表6に記載のアミノ酸改変のいずれかを含むIgC様ドメイン、例えば、SEQ ID NO: 1232～1236のいずれかに記載のIgC様ドメイン、またはSEQ ID NO: 1232～1236のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を有し、もう1つのアミノ酸改変を含むIgC様ドメインを含有するバリエーションNKp30ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表6に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgSFドメイン（複数可）を含有するECDまたはその一部分、例えば、SEQ ID NO: 1226～1230のいずれかに記載のECD、またはSEQ ID NO: 1226～1230のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有するECDを含有するバリエーションNKp30ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

【0248】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加（例えば、第2または第3）vIgDは、非改変または野生型CD86と比較して、IgSFドメイン（例えば、IgV）に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含有するバリエーションCD86ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV）であり、これにより、いくつかの態様では、その同族結合受容体への結合が増加する。バリエーションCD86ポリペプチドのIgSFドメイン（例えば、IgV、またはIgV及びIgCを含有するECD）における置換、欠失または付加などの例示的なアミノ酸改変を表7に記載する。例示的なバ

10

20

30

40

50

リペプチドの中には、SEQ ID NO : 29に記載の位置に対応するCD86細胞外ドメインの位置に基づいて変異Q35H/H90L/Q102Hを含有するCD86バリエーションがある。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、及び表7に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン、例えば、SEQ ID NO : 1244 ~ 1247のいずれかに記載のIgVドメイン、またはSEQ ID NO : 1244 ~ 1247のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を有し、もう一つのアミノ酸改変を含有するIgVドメイン、を含有するバリエーションCD86ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドのいずれか、ならびに表7に記載のアミノ酸改変のいずれかが含まれるIgVドメイン及び/またはIgCドメインを含有するECDまたはその一部分、例えば、SEQ ID NO : 1239 ~ 1242のいずれかに記載のECD、またはSEQ ID NO : 1239 ~ 1242のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含有し、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有するECDを含有するバリエーションCD86ポリペプチド、を含有する免疫調節タンパク質が提供される。

10

## 【0249】

表3 ~ 8は、本明細書で提供されるスタック構築物で 사용할 ことができる1つまたは複数の親和性改変IgSFドメインを含有する例示的なポリペプチドを提供する。

20

## 【0250】

(表3) 例示的なバリエーションCD80ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	28	1039, 2039
L70P	966	1040, 1114
I30F/L70P	967	1041, 1115
Q27H/T41S/A71D	968	1042, 1116
I30T/L70R	969	1043, 1117
T13R/C16R/L70Q/A71D	970	1044, 1118
T57I	971	1045, 1119
M43I/C82R	972	1046, 1120
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	973	1047, 1121
I30V/T57I/L70P/A71D/A91T	974	1048, 1122
V22I/L70M/A71D	975	1049, 1123
N55D/L70P/E77G	976	1050, 1124

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
T57A/I69T	977	1051, 1125
N55D/K86M	978	1052, 1126
L72P/T79I	979	1053, 1127
L70P/F92S	980	1054, 1128
T79P	981	1055, 1129
E35D/M47I/L65P/D90N	982	1056, 1130
L25S/E35D/M47I/D90N	983	1057, 1131
A71D	985	1059, 1133
E81K/A91S	987	1061, 1135
A12V/M47V/L70M	988	1062, 1136
K34E/T41A/L72V	989	1063, 1137
T41S/A71D/V84A	990	1064, 1138
E35D/A71D	991	1065, 1139
E35D/M47I	992	1066, 1140
K36R/G78A	993	1067, 1141
Q33E/T41A	994	1068, 1142
M47V/N48H	995	1069, 1143
M47L/V68A	996	1070, 1144
S44P/A71D	997	1071, 1145
Q27H/M43I/A71D/R73S	998	1072, 1146
E35D/T57I/L70Q/A71D	1000	1074, 1148
M47I/E88D	1001	1075, 1149
M42I/I61V/A71D	1002	1076, 1150
P51A/A71D	1003	1077, 1151
H18Y/M47I/T57I/A71G	1004	1078, 1152
V20I/M47V/T57I/V84I	1005	1079, 1153
V20I/M47V/A71D	1006	1080, 1154
A71D/L72V/E95K	1007	1081, 1155
V22L/E35G/A71D/L72P	1008	1082, 1156
E35D/A71D	1009	1083, 1157
E35D/I67L/A71D	1010	1084, 1158
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	1011	1085, 1159
T13R/M42V/M47I/A71D	1012	1086, 1160
E35D	1013	1087, 1161
E35D/M47I/L70M	1014	1088, 1162
E35D/A71D/L72V	1015	1089, 1163
E35D/M43L/L70M	1016	1090, 1164
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	1017	1091, 1165
E35D/D46V/L85Q	1018	1092, 1166
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D	1019	1093, 1167
M47V/I69F/A71D/V83I	1020	1094, 1168
E35D/T57A/A71D/L85Q	1021	1095, 1169

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	1022	1096, 1170
E35D/M47L	1023	1097, 1171
E23D/M42V/M43I/I58V/L70R	1024	1098, 1172
V68M/L70M/A71D/E95K	1025	1099, 1173
N55I/T57I/I69F	1026	1100, 1174
E35D/M43I/A71D	1027	1101, 1175
T41S/T57I/L70R	1028	1102, 1176
H18Y/A71D/L72P/E88V	1029	1103, 1177
V20I/A71D	1030	1104, 1178
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	1031	1105, 1179
A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V	1032	1106, 1180
V22L/E35D/M43L/A71G/D76H	1033	1107, 1181
E35G/K54E/A71D/L72P	1034	1108, 1182
L70Q/A71D	1035	1109, 1183
A26E/E35D/M47L/L85Q	1036	1110, 1184
D46E/A71D	1037	1111, 1185
Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W	1038	1112, 1186

【 0 2 5 1 】

(表4) 例示的なバリエーションCD112ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	48	700, 795
Y33H, A112V, G117D	701	748, 796
V19A, Y33H, S64G, S80G, G98S, N106Y, A112V	702	749, 797
L32P, A112V	703	750, 798
A95V, A112I	704	751, 799
P28S, A112V	705	752, 800
P27A, T38N, V101A, A112V	706	753, 801
S118F	707	754, 802
R12W, H48Y, F54S, S118F	708	755, 803
R12W, Q79R, S118F	709	756, 804
T113S, S118Y	710	757, 805
S118Y	711	758, 806
N106I, S118Y	712	759, 807
N106I, S118F	713	760, 808
A95T, L96P, S118Y	714	761, 809
Y33H, P67S, N106Y, A112V	715	762, 810

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N106Y, A112V	716	763, 811
T18S, Y33H, A112V	717	764, 812
P9S, Y33H, N47S, A112V	718	765, 813
P42S, P67H, A112V	719	766, 814
P27L, L32P, P42S, A112V	720	767, 815
G98D, A112V	721	768, 816
Y33H, S35P, N106Y, A112V	722	769, 817
L32P, P42S, T100A, A112V	723	770, 818
P27S, P45S, N106I, A112V	724	771, 819
Y33H, N47K, A112V	725	772, 820
Y33H, N106Y, A112V	726	773, 821
K78R, D84G, A112V, F114S	727	774, 822
Y33H, N47K, F54L, A112V	728	775, 823
Y33H, A112V	729	776, 824
A95V, A112V	730	777, 825
R12W, A112V	731	778, 826
R12W, P27S, A112V	732	779, 827
Y33H, V51M, A112V	733	780, 828
Y33H, A112V, S118T	734	781, 829
Y33H, V101A, A112V, P115S	735	782, 830
H24R, T38N, D43G, A112V	736	783, 831
A112V	737	784, 832
P27A, A112V	738	785, 833
A112V, S118T	739	786, 834
R12W, A112V, M122I	740	787, 835
Q83K, N106Y, A112V	741	788, 836
R12W, P27S, A112V, S118T	742	789, 837
P28S, Y33H, A112V	743	790, 838
P27S, Q90R, A112V	744	791, 839
L15V, P27A, A112V, S118T	745	792, 840
Y33H, N106Y, T108I, A112V	746	793, 841
Y33H, P56L, V75M, V101M, A112V	747	794, 842
N47K, Q79R, S118F	843	884, 925
Q40R, P60T, A112V, S118T	844	885, 926
F114Y, S118F	845	886, 927
Y33H, K78R, S118Y	846	887, 928
R12W, A46T, K66M, Q79R, N106I, T113A, S118F	847	888, 929
Y33H, A112V, S118F	848	889, 930
R12W, Y33H, N106I, S118F	849	890, 931

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
L15V, Q90R, S118F	850	891, 932
N47K, D84G, N106I, S118Y	851	892, 933
L32P, S118F	852	893, 934
Y33H, Q79R, A112V, S118Y	853	894, 935
T18A, N106I, S118T	854	895, 936
L15V, Y33H, N106Y, A112V, S118F	855	896, 937
V37M, S118F	856	897, 938
N47K, A112V, S118Y	857	898, 939
A46T, A112V	858	899, 940
P28S, Y33H, N106I, S118Y	859	900, 941
P30S, Y33H, N47K, V75M, Q79R, N106I, S118Y	860	901, 942
V19A, N47K, N106Y, K116E, S118Y	861	902, 943
Q79R, T85A, A112V, S118Y	862	903, 944
V101M, N106I, S118Y	863	904, 945
Y33H, Q79R, N106I, A112V, S118T	864	905, 946
Q79R, A112V	865	906, 947
Y33H, A46T, Q79R, N106I, S118F	866	907, 948
A112V, G121S	867	908, 949
Y33H, Q79R, N106I, S118Y	868	909, 950
Y33H, N106I, A112V	869	910, 951
Y33H, A46T, V101M, A112V, S118T	870	911, 952
L32P, L99M, N106I, S118F	871	912, 953
L32P, T108A, S118F	872	913, 954
R12W, Q79R, A112V	873	914, 955
Y33H, N106Y, E110G, A112V	874	915, 956
Y33H, N106I, S118Y	875	916, 957
Q79R, S118F	876	917, 958
Y33H, Q79R, G98D, V101M, A112V	877	918, 959
N47K, T81S, V101M, A112V, S118F	878	919, 960
G82S, S118Y	879	920, 961
Y33H, A112V, S118Y	880	921, 962
Y33H, N47K, Q79R, N106Y, A112V	881	922, 963
Y33H, S118T	882	923, 964
R12W, Y33H, Q79R, V101M, A112V	883	924, 965
Y33H, Q83K, A112V, S118T	1455	1479, 1503
V29M, Y33H, N106I, S118F	1456	1480, 1504
Y33H, A46T, A112V	1457	1481, 1505
Y33H, Q79R, S118F	1458	1482, 1506
Y33H, N47K, F74L, S118F	1459	1483, 1507

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
R12W, V101M, N106I, S118Y	1460	1484, 1508
A46T, V101A, N106I, S118Y	1461	1485, 1509
N106Y, A112V, S118T	1462	1486, 1510
S76P, T81I, V101M, N106Y, A112V, S118F	1463	1487, 1511
P9R, L21V, P22L, I34M, S69F, F74L, A87V, A112V, L125A	1464	1488, 1512
Y33H, V101M, A112V	1465	1489, 1513
V29A, L32P, S118F	1466	1490, 1514
Y33H, V101M, N106I, A112V	1467	1491, 1515
R12W, Y33H, N47K, Q79R, S118Y	1468	1492, 1516
Y33H, A46T, A112V, S118T	1469	1493, 1517
Y33H, A112V, F114L, S118T	1470	1494, 1518
Y33H, T38A, A46T, V101M, A112V	1471	1495, 1519
P28S, Y33H, S69P, N106I, A112V, S118Y	1472	1496, 1520
Y33H, P42L, N47K, V101M, A112V	1473	1497, 1521
Y33H, N47K, F74S, Q83K, N106I, F111L, A112V, S118T	1474	1498, 1522
Y33H, A112V, S118T, V119A	1475	1499, 1523
Y33H, N106I, A112V, S118F	1476	1500, 1524
Y33H, K66M, S118F, W124L	1477	1501, 1525
N106I, A112V	1478	1502, 1526

10

20

## 【 0 2 5 2 】

(表5) 例示的なバリエーションCD155ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	47	344, 387
P18S, P64S, F91S	345	366, 388
P18S, F91S, L104P	346	367, 389
L44P	347	368, 390
A56V	348	369, 391
P18L, L79V, F91S	349	370, 392
P18S, F91S	350	371, 393
P18T, F91S	351	372, 394
P18T, S42P, F91S	352	373, 395
G7E, P18T, Y30C, F91S	353	374, 396
P18T, F91S, G111D	354	375, 397
P18S, F91P	355	376, 398

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
P18T, F91S, F108L	356	377, 399
P18T, T45A, F91S	357	378, 400
P18T, F91S, R94H	358	379, 401
P18S, Y30C, F91S	359	380, 402
A81V, L83P	360	381, 403
L88P	361	382, 404
R94H	362	383, 405
A13E, P18S, A56V, F91S	363	384, 406
P18T, F91S, V115A	364	385, 407
P18T, Q60K	365	386, 408
S52M	409	506, 603
T45Q, S52L, L104E, G111R	410	507, 604
S42G	411	508, 605
Q62F	412	509, 606
S52Q	413	510, 607
S42A, L104Q, G111R	414	511, 608
S42A, S52Q, L104Q, G111R	415	512, 609
S52W, L104E	416	513, 610
S42C	417	514, 611
S52W	418	515, 612
S52M, L104Q	419	516, 613
S42L, S52L, Q62F, L104Q	420	517, 614
S42W	421	518, 615
S42Q	422	519, 616
S52L	423	520, 617
S52R	424	521, 618
L104E	425	522, 619
G111R	426	523, 620
S52E	427	524, 621
Q62Y	428	525, 622
T45Q, S52M, L104E	429	526, 623
S42N, L104Q, G111R	430	527, 624
S52M, V57L	431	528, 625
S42N, S52Q, Q62F	432	529, 626
S42A, S52L, L104E, G111R	433	530, 627
S42W, S52Q, V57L, Q62Y	434	531, 628
L104Q	435	532, 629
S42L, S52Q, L104E	436	533, 630
S42C, S52L	437	534, 631
S42W, S52R, Q62Y, L104Q	438	535, 632

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
T45Q, S52R, L104E	439	536, 633
S52R, Q62F, L104Q, G111R	440	537, 634
T45Q, S52L, V57L, L104E	441	538, 635
S52M, Q62Y	442	539, 636
Q62F, L104E, G111R	443	540, 637
T45Q, S52Q	444	541, 638
S52L, L104E	445	542, 639
S42V, S52E	446	543, 640
T45Q, S52R, G111R	447	544, 641
S42G, S52Q, L104E, G111R	448	545, 642
S42N, S52E, V57L, L104E	449	546, 643
S42C, S52M, Q62F	450	547, 644
S42L	451	548, 645
S42A	452	549, 646
S42G, S52L, Q62F, L104Q	453	550, 647
S42N	454	551, 648
P18T, S65A, S67V, F91S	455	552, 649
P18F, T39A, T45Q, T61R, S65N, S67L, E73G, R78G	456	553, 650
P18T, T45Q, T61R, S65N, S67L	457	554, 651
P18F, S65A, S67V, F91S	458	555, 652
P18F, T45Q, T61R, S65N, S67L, F91S, L104P	459	556, 653
P18S, L79P, L104M	460	557, 654
P18S, L104M	461	558, 655
L79P, L104M	462	559, 656
P18T, T45Q, L79P	463	560, 657
P18T, T45Q, T61R, S65H, S67H	464	561, 658
P18T, A81E	465	562, 659
P18S, D23Y, E37P, S52G, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	466	563, 660
A13R, D23Y, E37P, S42P, Q62Y, A81E	467	564, 661
A13R, D23Y, E37P, G99Y, S112N	468	565, 662
A13R, D23Y, E37P, Q62M, A77V, G80S, A81P, G99Y	469	566, 663
P18L, E37S, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	470	567, 664
P18S, L104T	471	568, 665
P18S, Q62H, L79Q, F91S	472	569, 666
T45Q, S52K, Q62F, L104Q, G111R	473	570, 667
T45Q, S52Q, Q62Y, L104Q, G111R	474	571, 668
T45Q, S52Q, Q62Y, L104E, G111R	475	572, 669
V57A, T61M, S65W, S67A, E96D, L104T	476	573, 670
P18L, V57T, T61S, S65Y, S67A, L104T	477	574, 671
P18T, T45Q	478	575, 672

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
P18L, V57A, T61M, S65W, S67A, L104T	479	576, 673
T61M, S65W, S67A, L104T	480	577, 674
P18S, V41A, S42G, T45G, L104N	481	578, 675
P18H, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104N	482	579, 676
P18S, S42G, T45V, F58L, S67W, L104N	483	580, 677
P18S, T45I, L104N	484	581, 678
P18S, S42G, T45G, L104N, V106A	485	582, 679
P18H, H40R, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104Y, V106L, F108H	486	583, 680
E37V, S42G, T45G, L104N	487	584, 681
P18S, T45Q, L79P, L104T	488	585, 682
P18L, Q62R	489	586, 683
A13R, D23Y, E37P, S42L, S52G, Q62Y, A81E	490	587, 684
P18L, H49R, L104T, D116N	491	588, 685
A13R, D23Y, E37P, Q62M, G80S, A81P, L104T	492	589, 686
S65T, L104T	493	590, 687
A13R, D23Y, E37P, S52G, V57A, Q62M, K70E, L104T	494	591, 688
P18L, A47V, Q62Y, E73D, L104T	495	592, 689
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, D97G, E98S, L104T, D116N	496	593, 690
P18L, S42P, T45Q, T61G, S65H, S67E, L104T, D116N	497	594, 691
P18S, H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, L104M, V106A	498	595, 692
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E68G, E73R, D97G, E98S, L104T	499	596, 693
T45Q, S52E, L104E	500	597, 694
T45Q, S52E, Q62F, L104E	501	598, 695
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, F91S, L104M, G111D	502	599, 696
P18S, T45S, T61K, S65W, S67A, F91S, G111R	503	600, 697
P18S, L79P, L104M, T107M	504	601, 698
P18S, S65W, S67A, M90V, V95A, L104Q, G111R	505	602, 699
P18S, A47G, L79P, F91S, L104M, T107A, R113W	1573	1527, 1550
P18T, D23G, S24A, N35D, H49L, L79P, F91S, L104M, G111R	1574	1528, 1551
V9L, P18S, Q60R, V75L, L79P, R89K, F91S, L104E, G111R	1575	1529, 1552
P18S, H49R, E73D, L79P, N85D, F91S, V95A, L104M, G111R	1576	1530, 1553
V11A, P18S, L79P, F91S, L104M, G111R	1577	1531, 1554
V11A, P18S, S54R, Q60P, Q62K, L79P, N85D, F91S, T107M	1578	1532, 1555
P18T, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, G111R	1579	1533, 1556
P18T, M36T, L79P, F91S, G111R	1580	1534, 1557
D8G, P18S, M36I, V38A, H49Q, A76E, F91S, L104M, T107A, R113W	1581	1535, 1558

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
P18S, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, T107S, R113W	1582	1536, 1559
T15I, P18T, L79P, F91S, L104M, G111R	1583	1537, 1560
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, E82D, F91S, L104M, G111D	1584	1538, 1561
P18T, E37G, G53R, Q62K, L79P, F91S, E98D, L104M, T107M	1585	1539, 1562
P18L, K70E, L79P, F91S, V95A, G111R	1586	1540, 1563
V9I, Q12K, P18F, S65A, S67V, L79P, L104T, G111R, S112I	1587	1541, 1564
P18F, S65A, S67V, F91S, L104M, G111R	1588	1542, 1565
V9I, V10I, P18S, F20S, T45A, L79P, F91S, L104M, F108Y, G111R, S112V	1589	1543, 1566
V9L, P18L, L79P, M90I, F91S, T102S, L104M, G111R	1590	1544, 1567
P18C, T26M, L44V, M55I, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107M	1591	1545, 1568
V9I, P18T, D23G, L79P, F91S, G111R	1592	1546, 1569
P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1593	1547, 1570
P18T, M36T, S65A, S67E, L79Q, A81T, F91S, G111R	1594	1548, 1571
V9L, P18T, Q62R, L79P, F91S, L104M, G111R	1595	1549, 1572
P18S, S65W, S67A, L104Q, G111R	1596	1597, 1598
P18T, G19D, M36T, S54N, L79P, L83Q, F91S, T107M, F108Y	1599	1645, 1691
V9L, P18L, M55V, S69L, L79P, A81E, F91S, T107M	1600	1646, 1692
P18F, H40Q, T61K, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107V	1601	1647, 1693
P18S, Q32R, Q62K, R78G, L79P, F91S, T107A, R113W	1602	1648, 1694
Q12H, P18T, L21S, G22S, V57A, Q62R, L79P, F91S, T107M	1603	1649, 1695
V9I, P18S, S24P, H49Q, F58Y, Q60R, Q62K, L79P, F91S, T107M	1604	1650, 1696
P18T, W46C, H49R, S65A, S67V, A76T, L79P, S87T, L104M	1605	1651, 1697
P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1606	1652, 1698
V10F, T15S, P18L, R48Q, L79P, F91S, T107M, V115M	1607	1653, 1699
P18S, L21M, Y30F, N35D, R84W, F91S, T107M, D116G	1608	1654, 1700
P18F, E51V, S54G, Q60R, L79Q, E82G, S87T, M90I, F91S, G92R, T107M	1609	1655, 1701
Q16H, P18F, F91S, T107M	1610	1656, 1702
P18T, D23G, Q60R, S67L, L79P, F91S, T107M, V115A	1611	1657, 1703
D8G, V9I, V11A, P18T, T26M, S52P, L79P, F91S, G92A, T107L, V115A	1612	1658, 1704
V9I, P18F, A47E, G50S, E68G, L79P, F91S, T107M	1613	1659, 1705
P18S, M55I, Q62K, S69P, L79P, F91S, T107M	1614	1660, 1706
P18T, T39S, S52P, S54R, L79P, F91S, T107M	1615	1661, 1707
P18S, D23N, L79P, F91S, T107M, S114N	1616	1662, 1708
P18S, P34S, E51V, L79P, F91S, G111R	1617	1663, 1709
P18S, H59N, V75A, L79P, A81T, F91S, L104M, T107M	1618	1664, 1710
P18S, W46R, E68D, L79P, F91S, T107M, R113G	1619	1665, 1711
V9L, P18F, T45A, S65A, S67V, R78K, L79V, F91S, T107M, S114T	1620	1666, 1712

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
P18T, M55L, T61R, L79P, F91S, V106I, T107M	1621	1667, 1713
T15I, P18S, V33M, N35F, T39S, M55L, R78S, L79P, F91S, T107M	1622	1668, 1714
P18S, Q62K, K70E, L79P, F91S, G92E, R113W	1623	1669, 1715
P18F, F20I, T26M, A47V, E51K, L79P, F91S	1624	1670, 1716
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1625	1671, 1717
P18S, D23G, C29R, N35D, E37G, M55I, Q62K, S65A, S67G, R78G, L79P, F91S, L104M, T107M, Q110R	1626	1672, 1718
A13E, P18S, M36R, Q62K, S67T, L79P, N85D, F91S, T107M	1627	1673, 1719
V9I, P18T, H49R, L79P, N85D, F91S, L104T, T107M	1628	1674, 1720
V9A, P18F, T61S, Q62L, L79P, F91S, G111R	1629	1675, 1721
D8E, P18T, T61A, L79P, F91S, T107M	1630	1676, 1722
P18S, V41A, H49R, S54C, L79S, N85Y, L88P, F91S, L104M, T107M	1631	1677, 1723
V11E, P18H, F20Y, V25E, N35S, H49R, L79P, F91S, T107M, G111R	1632	1678, 1724
V11A, P18F, D23A, L79P, G80D, V95A, T107M	1633	1679, 1725
P18S, K70R, L79P, F91S, G111R	1634	1680, 1726
V9L, V11M, P18S, N35S, S54G, Q62K, L79P, L104M, T107M,	1635	1681, 1727
V9L, P18Y, V25A, V38G, M55V, A77T, L79P, M90I, F91S, L104M	1636	1682, 1728
V10G, P18T, L72Q, L79P, F91S, T107M	1637	1683, 1729
P18S, H59R, A76G, R78S, L79P	1638	1684, 1730
V9A, P18S, M36T, S65G, L79P, F91S, L104T, G111R, S112I	1639	1685, 1731
P18T, S52A, V57A, Q60R, Q62K, S65C, L79P, F91T, N100Y, T107M	1640	1686, 1732
V11A, P18F, N35D, A47E, Q62K, L79P, F91S, G99D, T107M, S114N	1641	1687, 1733
V11A, P18T, N35S, L79P, S87T, F91S	1642	1688, 1734
V9D, V11M, Q12L, P18S, E37V, M55I, Q60R, K70Q, L79P, F91S, L104M, T107M	1643	1689, 1735
T15S, P18S, Y30H, Q32L, Q62R, L79P, F91S, T107M	1644	1690, 1736

10

20

## 【 0 2 5 3 】

(表6) 例示的なバリエーション N K p 3 0 ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgC様 ドメイン SEQ ID NO
野生型	54	1231, 1238
L30V/A60V/S64P/S86G	1226	1232
L30V	1227	1233
A60V	1228	1234
S64P	1229	1235
S86G	1230	1236

30

## 【 0 2 5 4 】

(表7) 例示的なバリエーション C D 8 6 ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	29	1243
Q35H/H90L/Q102H	1239	1244
Q35H	1240	1245
H90L	1241	1246
Q102H	1242	1247

40

## 【 0 2 5 5 】

50

(表8) 例示的なバリエーションPD-L1ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	30, 1812	1258, 1454
K28N/M41V/N45T/H51N/K57E	1259, 1743	1324, 1389
I20L/I36T/N45D/I47T	1260, 1744	1325, 1390
I20L/M41K/K44E	1261, 1745	1326, 1391
P6S/N45T/N78I/I83T	1262, 1746	1327, 1392
N78I	1263, 1747	1328, 1393
M41K/N78I	1264, 1748	1329, 1394
N45T/N78I	1265, 1749	1330, 1395
I20L/N45T	1266, 1750	1331, 1396
N45T	1267, 1751	1332, 1397
M41K	1268, 1752	1333, 1398
I20L/I36T/N45D	1269, 1753	1334, 1399
N17D/N45T/V50A/D72G	1270, 1754	1335, 1400
I20L/F49S	1271, 1755	1336, 1401
N45T/V50A	1272, 1756	1337, 1402
I20L/N45T/N78I	1273, 1757	1338, 1403
I20L/N45T/V50A	1274, 1758	1339, 1404
M41V/N45T	1275, 1759	1340, 1405
M41K/N45T	1276, 1760	1341, 1406
A33D/S75P/D85E	1277, 1761	1342, 1407
M18I/M41K/D43G/H51R/N78I	1278, 1762	1343, 1408
V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P	1279, 1763	1344, 1409
A33D/V50A	1280, 1764	1345, 1410
S16G/A33D/K71E/S75P	1281, 1765	1346, 1411
E27G/N45T/M97I	1282, 1766	1347, 1412
E27G/N45T/K57R	1283, 1767	1348, 1413
A33D/E53V	1284, 1768	1349, 1414
D43G/N45D/V58A	1285, 1769	1350, 1415
E40G/D43V/N45T/V50A	1286, 1770	1351, 1416
Y14S/K28E/N45T	1287, 1771	1352, 1417

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
A33D/N78S	1288, 1772	1353, 1418
A33D/N78I	1289, 1773	1354, 1419
A33D/N45T	1290, 1774	1355, 1420
A33D/N45T/N78I	1291, 1775	1356, 1421
E27G/N45T/V50A	1292, 1776	1357, 1422
N45T/V50A/N78S	1293, 1777	1358, 1423
I20L/N45T/V110M	1294, 1778	1359, 1424
I20L/I36T/N45T/V50A	1295, 1779	1360, 1425
N45T/L74P/S75P	1296, 1780	1361, 1426
N45T/S75P	1297, 1781	1362, 1427
S75P/K106R	1298, 1782	1363, 1428
S75P	1299, 1783	1364, 1429
A33D/S75P	1300, 1784	1365, 1430
A33D/S75P/D104G	1301, 1785	1366, 1431
A33D/S75P	1302, 1786	1367, 1432
I20L/E27G/N45T/V50A	1303, 1787	1368, 1433
I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I	1304, 1788	1369, 1434
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I	1305, 1789	1370, 1435
I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I	1306, 1790	1371, 1436
I20L/D43G/N45D/N78I	1307, 1791	1372, 1437
E27G/N45T/V50A/N78I	1308, 1792	1373, 1438
N45T/V50A/N78I	1309, 1793	1374, 1439
V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G	1310, 1794	1375, 1440
I20L/E27G/D43G/N45T/V50A	1311, 1795	1376, 1441
I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R	1312, 1796	1377, 1442
I20L/I36T/N45D	1313, 1797	1378, 1443
I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I	1314, 1798	1379, 1444
A33D/D43G/N45D/V58A/S75P	1315, 1799	1380, 1445
K23R/D43G/N45D	1316, 1800	1381, 1446
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D	1317, 1801	1382, 1447
D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G-ins(G101GG)	1318, 1802	1383, 1448
I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I	1319, 1803	1384, 1449
I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I	1320, 1804	1385, 1450
T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K	1321, 1805	1386, 1451
I20L/M41K/D43G/N45D	1322, 1806	1387, 1452
K23R/N45T/N78I	1323, 1807	1388, 1453
I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-ins (G101GG)	1808, 1809	1810, 1811
K57R/S99G	1813, 1903	1992, 2007
K57R/S99G/F189L	1814, 1904	
M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q	1815, 1905	
I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/H202Q/L206F	1816, 1906	
C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/H202Q/T221L	1817	

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
M18V/I98L/L124S/P198T/L206F	1818, 1907	
S99G/N117S/I148V/K171R/R180S	1819, 1908	
I36T/M97L/A103V/Q155H	1820, 1909	
K28I/S99G	1821, 1910	1993, 2008
R195S	1822, 1911	
A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/L206F	1823, 1912	
K57R/S99G/L124S/K144Q	1824, 1913	
K57R/S99G/R195G	1825, 1914	
D55V/M97L/S99G	1826, 1915	1994, 2009
E27G/I36T/D55N/M97L/K111E	1827, 1916	1995, 2010
E54G/M97L/S99G	1828, 1917	1996, 2011
G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q	1829, 1918	
G15A/I36T/V129D	1830, 1919	
G15A/I36T/V129D/R195G	1831, 1920	
G15A/V129D	1832, 1921	
I36S/M97L	1833, 1922	1997, 2012
I36T/D55N/M97L/K111E/A204T	1834, 1923	
I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L	1835, 1924	
I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S	1836, 1925	
I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P198T	1837, 1926	
I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T185A/R195G	1838, 1927	
I36T/I83T/M97L/K144E/P198T	1839, 1928	
I36T/M97L/K111E	1840, 1929	1998, 2013
I36T/M97L/K144E/P198T	1841, 1930	
I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y	1842, 1931	
I36T/M97L/V129D	1843, 1932	
L35P/I36S/M97L/K111E	1844, 1933	1999, 2014
M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A	1845, 1934	
M18T/I36T/D55N/M97L/K111E	1846, 1935	2000, 2015
M18V/M97L/T176N/R195G	1847, 1936	
M97L/S99G	1848, 1937	2001, 2016
N17D/M97L/S99G	1849, 1938	2002, 2017
S99G/T185A/R195G/P198T	1850, 1939	
V129D/H202Q	1851, 1940	
V129D/P198T	1852, 1941	
V129D/T150A	1853, 1942	
V93E/V129D	1854, 1943	
Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A	1855, 1944	
N45D	1856, 1945	2003, 2018
K160M/R195G	1857, 1946	
N45D/K144E	1858, 1947	
N45D/P198S	1859, 1948	

10

20

30

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N45D/P198T	1860, 1949	
N45D/R195G	1861, 1950	
N45D/R195S	1862, 1951	
N45D/S131F	1863, 1952	
N45D/V58D	1864, 1953	2004, 2019
V129D/R195S	1865, 1954	
I98T/F173Y/L196S	1866, 1955	
N45D/E134G/L213P	1867, 1956	
N45D/F173I/S177C	1868, 1957	
N45D/I148V/R195G	1869, 1958	
N45D/K111T/R195G	1870, 1959	
N45D/N113Y/R195S	1871, 1960	
N45D/N165Y/E170G	1872, 1961	
N45D/Q89R/I98V	1873, 1962	2005, 2020
N45D/S131F/P198S	1874, 1963	
N45D/S75P/P198S	1875, 1964	
N45D/V50A/R195T	1876, 1965	
E27D/N45D/T183A/I188V	1877, 1966	
F173Y/T183I/L196S/T203A	1878, 1967	
K23N/N45D/S75P/N120S	1879, 1968	
N45D/G102D/R194W/R195G	1880, 1969	
N45D/G52V/Q121L/P198S	1881, 1970	
N45D/I148V/R195G/N201D	1882, 1971	
N45D/K111T/T183A/I188V	1883, 1972	
N45D/Q89R/F189S/P198S	1884, 1973	
N45D/S99G/C137R/V207A	1885, 1974	
N45D/T163I/K167R/R195G	1886, 1975	
N45D/T183A/T192S/R194G	1887, 1976	
N45D/V50A/I119T/K144E	1888, 1977	
T19A/N45D/K144E/R195G	1889, 1978	
V11E/N45D/T130A/P198T	1890, 1979	
V26A/N45D/T163I/T185A	1891, 1980	
K23N/N45D/L124S/K167T/R195G	1892, 1981	
K23N/N45D/Q73R/T163I	1893, 1982	
K28E/N45D/W149R/S158G/P198T	1894, 1983	
K28R/N45D/K57E/I98V/R195S	1895, 1984	
K28R/N45D/V129D/T163N/R195T	1896, 1985	
M41K/D43G/N45D/R64S/R195G	1897, 1986	
M41K/D43G/N45D/R64S/S99G	1898, 1987	2006, 2021
N45D/R68L/F173L/D197G/P198S	1899, 1988	
N45D/V50A/I148V/R195G/N201D	1900, 1989	
M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D	1901, 1990	
N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G	1902, 1991	

10

20

30

40

## 【 0 2 5 6 】

「スタックされた」免疫調節タンパク質構築物に存在するそのような非親和性改変または親和性改変 I g S F ドメイン（非野生型組み合わせまたは非野生型配置にかかわらず）の数は、少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つ、そして、いくつかの実施形態では、正確に2つ、3つ、4つ、または5つの I g S F ドメインである（その親和性改変 I g S F ドメインの数の決定は、あらゆるその非特異的結合部分配列及び/または実質的に免疫学的に不活性なその部分配列を無視する）。

## 【 0 2 5 7 】

本明細書において提供されるスタックされた免疫調節タンパク質のいくつかの実施形態では、I g S F ドメインの数は少なくとも2つであり、親和性改変 I g S F ドメインの数

50

及び非親和性改変 I g S F ドメインの数は、それぞれ独立して、少なくとも 0、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つである。したがって、親和性改変 I g S F ドメインの数及び非親和性改変 I g S F ドメインの数はそれぞれ（親和性改変 I g S F ドメイン：非親和性改変 I g S F ドメイン）、正確にまたは少なくとも 2 : 0（親和性改変：野生型）、0 : 2、2 : 1、1 : 2、2 : 2、2 : 3、3 : 2、2 : 4、4 : 2、1 : 1、1 : 3、3 : 1、1 : 4、4 : 1、1 : 5、または 5 : 1 であることができる。

**【0258】**

スタックされた免疫調節タンパク質のいくつかの実施形態では、非親和性改変 I g S F ドメイン及び/または親和性改変 I g S F ドメインの少なくとも 2 つは、同一の I g S F ドメインである。

10

**【0259】**

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるスタックされた免疫調節タンパク質は、単一の I g S F メンバー由来であるが非野生型配置（あるいは「順列」）の、少なくとも 2 つの親和性改変 I g S F ドメイン及び/または非親和性改変 I g S F ドメインを含む。非野生型配置または順列の 1 つの実例は、その I g S F ドメイン配列が本明細書において提供されるとおりのパリアント I g S F ドメインの供給源としての役割を果たす野生型 P D - L 2 に見いだされるものと比べて、非野生型順序の親和性改変 I g S F ドメイン配列及び/または非親和性改変 I g S F ドメイン配列を含む免疫調節タンパク質である。したがって、一例では、免疫調節タンパク質は、非親和性改変形態及び/または親和性改変形態にかかわらず、膜貫通ドメインに近位の I g V 及び膜貫通ドメインから遠位の I g C を含むことができる。非親和性改変 I g S F ドメイン及び/または親和性改変 I g S F ドメインの非野生型組み合わせ及び非野生型配置の両方が本明細書において提供される免疫調節タンパク質に存在することも、提供される主題の範囲内である。

20

**【0260】**

スタックされた免疫調節タンパク質のいくつかの実施形態では、非親和性改変 I g S F ドメイン及び/または親和性改変 I g S F ドメインは、非同一（すなわち、異なる）I g S F ドメインである。非同一親和性改変 I g S F ドメインは、特異的結合条件下で、異なる同族結合パートナーと特異的に結合し、これらが操作される野生型または非改変 I g S F ドメインが同じであったか否かに関係なく「非同一」である。したがって、例えば、免疫調節タンパク質における少なくとも 2 つの非同一 I g S F ドメインの非野生型組み合わせは、その起源が 1 つの P D - L 2 に由来しかつこれに固有である少なくとも 1 つの I g S F ドメイン配列、及び起源が P D - L 2 ではない別の I g S F ファミリーメンバーに由来しかつこれに固有である少なくとも 1 つの第 2 の I g S F ドメイン配列を含むことができ、該免疫調節タンパク質の I g S F ドメインは、非親和性改変形態及び/または親和性改変形態である。しかしながら、その他の実施形態では、2 つの非同一 I g S F ドメインは、同じ I g S F ドメイン配列に由来するが、少なくとも 1 つは、該非同一 I g S F ドメインが異なる同族結合パートナーに特異的に結合するように親和性が改変されている。

30

**【0261】**

スタックされた免疫調節タンパク質ポリペプチド鎖における複数の非親和性改変 I g S F ドメイン及び/または親和性改変 I g S F ドメインは、互いに直接共有結合的に連結する必要はない。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸残基の介在範囲は、非親和性改変及び/または親和性改変 I g S F ドメインを互いに間接的に共有結合させる。連結は、N 末端から C 末端残基を介して行うことができる。

40

**【0262】**

いくつかの実施形態では、P D - L 2 の v I g D を含む 2 つ以上の I g S F ドメイン、及び別の I g S F ファミリーメンバーの 1 つまたは複数の追加の I g S F ドメイン（例えば、第 2 または第 3 のパリアント I g S F ドメイン）は、共有結合または非共有結合的に連結する。いくつかの実施形態では、2 つ以上の I g S F ドメインは、直接、または、例えばリンカーを介して間接的に連結される。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸残基の介在範囲は、I g S F ドメインを互いに間接的に共有結合する。連結は、

50

N末端からC末端残基を介して行うことができる。いくつかの実施形態では、連結は、IgSFドメイン（複数可）のN末端またはC末端に位置しないアミノ酸残基の側鎖を介してなされ得る。したがって、連結は、末端または内部アミノ酸残基またはそれらの組み合わせを介してなされ得る。

#### 【0263】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、少なくとも2つのIgSFドメインを含有し、それぞれ直接またはリンカーを介して間接的に連結されている。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、少なくとも3つの免疫調節タンパク質を含有し、それぞれ直接またはリンカーを介して間接的に連結されている。様々な配置が図5A及び5Bに示される。

#### 【0264】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の「ペプチドリinker」は、PD-L2のvIgD及び1つまたは複数の追加のIgSFドメイン（例えば、第2または第3のバリエーションIgSFドメイン）を連結する。いくつかの実施形態では、ペプチドリinkerは、単一アミノ酸残基またはそれより大きい長さであることができる。いくつかの実施形態では、ペプチドリinkerは、少なくとも1つのアミノ酸残基を有するが、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸残基長以下である。いくつかの実施形態では、リンカーは柔軟なリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、（一文字アミノ酸コードで）GGGS（「4GS」）または4GSリンカーの多量体、例えば2つ、3つ、4つ、または5つの4GSリンカーの繰り返しである。いくつかの実施形態では、ペプチドリinkerは、（GGGS）<sub>2</sub>（SEQ ID NO: 264）または（GGGS）<sub>3</sub>（SEQ ID NO: 263）である。いくつかの実施形態では、リンカーはまた、一連のアラニン残基を単独で、または別のペプチドリinker（4GSリンカーまたはその多量体など）に加えて含むこともできる。いくつかの実施形態では、各連のアラニン残基の数は、2、3、4、5、または6個のアラニンである。いくつかの実施形態では、リンカーはまた、一連のアラニン残基を単独で、または別のペプチドリinker（4GSリンカーまたはその多量体など）に加えて含むこともできる。いくつかの実施形態では、各連のアラニン残基の数は、2、3、4、5、または6個のアラニンである。いくつかの実施形態では、リンカーは剛性リンカーである。例えば、リンカーはヘリックスリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、（一文字アミノ酸コードで）EAAAKまたはEAAAKリンカーの多量体、例えばSEQ ID NO: 2030に記載されるような（1×EAAAK）、SEQ ID NO: 2031に記載されるような（3×EAAAK）またはSEQ ID NO: 2032に記載されるような（5×EAAAK）、例えば2つ、3つ、4つ、または5つのEAAAKリンカーの繰り返しである。いくつかの実施形態では、リンカーは、クローニングによって及び/または制限部位から導入されたアミノ酸をさらに含むことができ、例えば、リンカーは、制限部位BAMHIの使用によって導入されたアミノ酸GS（1文字のアミノ酸コード）を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、（1文字のアミノ酸コードで）GSGGGGS（SEQ ID NO: 1741）、GS（G<sub>4</sub>S）<sub>3</sub>（SEQ ID NO: 2040）、またはGS（G<sub>4</sub>S）<sub>5</sub>（SEQ ID NO: 2041）である。いくつかの実施例では、リンカーは、2×GGGSの後に3つのアラニンが続く（GGGS GGGGS AAA；SEQ ID NO: 265）。場合によっては、ペプチドリinkerの様々な組み合わせが使用される。

#### 【0265】

いくつかの実施形態では、非親和性改変及び/または親和性改変IgSFドメインは、非親和性改変及び/または親和性改変IgSFドメインのN末端及び/またはC末端に挿入された「野生型ペプチドリinker」によって連結されている。これらのリンカーは、前方（leading）配列（N末端から非親和性改変または親和性改変IgSFドメイン）または後方（trailing）配列（C末端から非親和性改変または親和性改変Ig

10

20

30

40

50

S Fドメイン)とも呼ばれ、I g S FのI gフォールドの構造予測のすぐ外側に伸びる野生型タンパク質に存在する配列である。いくつかの実施形態では、「野生型リンカー」とは、野生型タンパク質のアミノ酸配列において、シグナル配列の後であるが定義されたI g VドメインなどのI g S Fドメインの前に存在するアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、「野生型」リンカーとは、野生型タンパク質のアミノ酸配列において、I g S Fドメインの直後、例えば定義されたI g Vドメインの直後であるがI g Cドメインの前に存在するアミノ酸配列である。これらのリンカー配列は、隣接するI g S Fドメイン(複数可)の適切なフォールディング及び機能に寄与することができる。いくつかの実施形態では、第1のI g S FドメインのN末端に挿入された前方ペプチドリンカー、及び/または第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S FドメインのC末端に挿入された後方配列が存在する。いくつかの実施形態では、第2のI g S FドメインのN末端に挿入された第2の前方ペプチドリンカー、及び/または第2の非親和性改変及び/または親和性改変I g S FドメインのC末端に挿入された第2の後方配列が存在する。第1及び第2の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメインが同じ親タンパク質に由来し、同一方向に接続される場合、第1及び第2の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメイン間の野生型ペプチドリンカーは複製されない。例えば、第1の後方の野生型ペプチドリンカーと第2の前方の野生型ペプチドリンカーが同じ場合、タイプII免疫調節タンパク質は、第1の後方の野生型ペプチドリンカーまたは第2の前方の野生型ペプチドリンカーのいずれも含まない。

10

20

**【0266】**

いくつかの実施形態では、タイプII免疫調節タンパク質は、第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S FドメインのN末端に挿入された第1の前方の野生型ペプチドリンカーを含み、該第1の前方の野生型ペプチドリンカーは、第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメインが親I g S Fドメインと直前のドメイン(シグナルペプチドまたはI g S Fドメインなど)の間に生じる野生型タンパク質の介在配列の少なくとも5個(少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれかなど)の連続アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、第1の前方の野生型ペプチドリンカーは、第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメインが親I g S Fドメインと直前のドメイン(シグナルペプチドまたはI g S Fドメインなど)の間に生じる野生型タンパク質の完全な介在配列を含む。

30

40

**【0267】**

いくつかの実施形態では、タイプII免疫調節タンパク質はさらに、第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S FドメインのC末端に挿入された第1の後方の野生型ペプチドリンカーを含み、該第1の後方の野生型ペプチドリンカーは、第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメインが親I g S Fドメインと直後のドメイン(I g S Fドメインまたは膜貫通ドメインなど)の間に生じる野生型タンパク質の介在配列の少なくとも5個(少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれかなど)の連続アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、第1の後方の野生型ペプチドリンカーは、第1の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメインが親I g S Fドメインと直後のドメイン(I g S Fドメインまたは膜貫通ドメインなど)の間に生じる野生型タンパク質の完全な介在配列を含む。

40

**【0268】**

いくつかの実施形態では、タイプII免疫調節タンパク質はさらに、第2の非親和性改変及び/または親和性改変I g S FドメインのN末端に挿入された第2の前方の野生型ペプチドリンカーを含み、該第2の前方の野生型ペプチドリンカーは、第2の非親和性改変及び/または親和性改変I g S Fドメインが親I g S Fドメインと直前のドメイン(シグナルペプチドまたはI g S Fドメインなど)の間に生じる野生型タンパク質の介在配列の少なくとも5個(少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれかなど)の連続アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、第2の前方の野生型ペプチドリンカーは、第2の非親和性改変及び/または親和性改変I g S F

50

ドメインが親 I g S F ドメインと直前のドメイン（シグナルペプチドまたは I g S F ドメインなど）の間に生じる野生型タンパク質の完全な介在配列を含む。

【0269】

いくつかの実施形態では、タイプ I I 免疫調節タンパク質はさらに、第 2 の非親和性改変及び/または親和性改変 I g S F ドメインの C 末端に挿入された第 2 の後方の野生型ペプチドリンカーを含み、該第 2 の後方の野生型ペプチドリンカーは、第 2 の非親和性改変及び/または親和性改変 I g S F ドメインが親 I g S F ドメインと直後のドメイン（I g S F ドメインまたは膜貫通ドメインなど）の間に生じる野生型タンパク質の介在配列の少なくとも 5 個（少なくとも約 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 またはそれ以上のいずれかなど）の連続アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の後方の野生型ペプチドリンカーは、第 2 の非親和性改変及び/または親和性改変 I g S F ドメインが親 I g S F ドメインと直後のドメイン（I g S F ドメインまたは膜貫通ドメインなど）の間に生じる野生型タンパク質の完全な介在配列を含む。

10

【0270】

いくつかの実施形態では、PD - L 2 の v I g D を含む 2 つ以上の I g S F ドメインと、別の I g S F ファミリーメンバーの 1 つまたは複数の追加の I g S F ドメイン（例えば、第 2 及び/または第 3 のバリエーション I g S F ドメイン）が、多量体化ドメイン、例えば F c に連結または結合して F c 融合体（細胞内で発現すると、いくつかの態様では、二量体のマルチドメインスタック免疫調節タンパク質を産生し得る）を形成する。したがって、二量体のマルチドメイン免疫調節タンパク質も提供される。

20

【0271】

いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチド及び 1 つまたは複数の追加の I g S F ドメインは、多量体化ドメイン、例えば F c 領域の N 末端または C 末端に、直接的または間接的に独立して連結される。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 ポリペプチド及び 1 つまたは複数の追加の I g S F ドメインの少なくとも 1 つは直接的または間接的に連結され、バリエーション PD - L 2 の 1 つ及び 1 つまたは複数の追加の I g S F ドメインの 1 つも多量体化ドメイン、例えば F c 領域の N 末端または C 末端に直接的または間接的に連結される。いくつかの実施形態では、多量体化ドメイン、例えば F c 領域の N 末端または C 末端はバリエーション PD - L 2 ポリペプチドに連結される、または、1 つもしくは複数の追加の I g S F ドメイン及び F c 領域の N 末端もしくは C 末端の他方は、もう一方の PD - L 2 バリエーションまたは 1 つもしくは複数の追加の I g S F ドメインの他方に連結される。いくつかの実施形態では、多量体化ドメイン、例えば F c への連結は、ペプチドリンカー、例えば上記のようなペプチドリンカーを介する。いくつかの実施形態では、バリエーション PD - L 2 と 1 つまたは複数の追加の第 2 の I g S F ドメインとの間の連結は、ペプチドリンカー、例えば上記のようなペプチドリンカーを介する。いくつかの実施形態では、PD - L 2 の v I g D、1 つまたは複数の追加の I g S F ドメイン、及び多量体化ドメイン、例えば F c ドメインは、図 5 A 及び 5 B に示されるように、多数の配置のいずれかで一緒に連結され得る。例示的な配置が、実施例に記載される。

30

【0272】

いくつかの実施形態では、スタック免疫調節タンパク質は、2 つの免疫調節性 F c 融合ポリペプチドによって形成される二量体である。また、スタック免疫調節タンパク質のいずれかをコードする核酸分子も提供される。いくつかの実施形態では、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、二量体 F c 融合タンパク質の生成に応じて上記のようなスタック免疫調節 F c 融合ポリペプチドの発現、または場合によっては共発現によって細胞内で産生され得る。

40

【0273】

いくつかの実施形態では、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、各 F c 領域で二価、各サブユニットで一価、または一方のサブユニットで二価そしてもう一方のサブユニットで四価である。

【0274】

50

いくつかの実施形態では、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、ホモ二量体マルチドメインスタックFcタンパク質である。いくつかの実施形態では、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、第1のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチド、ならびに第1及び第2のポリペプチドが同じである第2のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子は、バリエーションPD-L2及び第2のIgSFドメインを含有する第1のFc融合ポリペプチド、ならびにバリエーションPD-L2及び第2のIgSFドメインを含有する第2のFc融合ポリペプチドを含有する。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子は、バリエーションPD-L2、第2のIgSFドメイン、及び第3のIgSFドメインを含有する第1のFc融合ポリペプチド、ならびにバリエーションPD-L2、第2のIgSFドメイン、及び第3のIgSFドメインを含有する第2のFc融合ポリペプチドを含有する。いくつかの実施形態では、第1及び/または第2の融合ポリペプチドのFc部分は、上記のような任意のFcであり得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2の融合ポリペプチドのFc部分または領域は同じである。

10

#### 【0275】

いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子はヘテロ二量体であり、2つの異なるFc融合ポリペプチド、例えば、第1及び第2のFcポリペプチドを含み、少なくとも1つが、少なくとも1つのバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有するFc融合ポリペプチドであり、及び/または少なくとも1つが、第2のIgSFドメイン（例えば、第2のバリエーションIgSFドメイン）を含有するFc融合ポリペプチド、を含有するFc融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1または第2のFc融合ポリペプチドは、第3のIgSFドメイン（例えば、第3のバリエーションIgSFドメイン）をさらに含有する。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子は、バリエーションPD-L2を含有する第1のFc融合ポリペプチドと、第2のIgSFドメインを含有する第2のFc融合ポリペプチドを含み、場合によっては、第1または第2のFc融合ポリペプチドは加えて、第3のIgSFドメインを含有する。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子は、バリエーションPD-L2、第2のIgSFドメインを含有する第1のFc融合ポリペプチド、場合によっては、第3のIgSFドメイン、及びバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは追加のIgSFドメインのいずれにも連結されていない第2のFc融合ポリペプチドを含有する。いくつかの実施形態では、第1及び第2の融合ポリペプチドのFc部分または領域は同じである。いくつかの実施形態では、第1及び第2の融合ポリペプチドのFc部分または領域は異なる。

20

30

#### 【0276】

いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子は、1、2、3、4、またはそれ以上のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び1、2、3、4、またはそれ以上の追加のIgSFドメインを含有する第1のFc融合ポリペプチドを含有し、該第1のスタックFc融合ポリペプチド中のIgSFドメインの総数は、2、3、4、5、6またはそれ以上よりも多い。そのような実施形態の一例では、第2のスタックFc融合ポリペプチドは、1、2、3、4、またはそれ以上の追加のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び1、2、3、4、またはそれ以上の第2のIgSFドメインを含有し、該第2のスタックFc融合ポリペプチド中のIgSFドメインの総数は、2、3、4、5、6またはそれ以上よりも多い。そのような実施形態の別の例では、第2のFc融合ポリペプチドは、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは追加のIgSFドメインのいずれにも連結されていない。

40

#### 【0277】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体スタック分子は、第1及び第2のポリペプチドが異なる第1スタック免疫調節Fc融合ポリペプチド及び第2のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドを含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体スタック分子は、Fc領域及び第1のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び/または第2のIgSFドメイン（例えば、第2のバリエーションIgSFドメイン）を含有する第1のFc融合ポリペプチド融合体ならびにFc領域及びもう一方の第1のバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは第

50

2のIgSFドメインを含有する第2のFcポリペプチド融合体を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体スタック分子は、Fc領域及び第1のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び/または第2のIgSFドメイン(例えば、第2のバリエーションIgSFドメイン)を含有する第1のFcポリペプチド融合体、ならびに第1のバリエーションPD-L2ポリペプチド及び第2のIgSFドメイン(例えば、第2のバリエーションIgSFドメイン)の両方を含有するが第1のFc領域とは異なる方向または配置である第2のFcサブユニットを含有する。いくつかの実施形態では、第1及び/または第2のFc融合ポリペプチドはまた、第3のIgSFドメイン(例えば、第3のバリエーションIgSFドメイン)を含有する。

**【0278】**

いくつかの実施形態では、第1及び第2のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドの一方または両方のFcドメインは、Fc分子の界面がヘテロ二量体化を促す及び/または促進するように改変されるような改変(例えば、置換)を含む。いくつかの実施形態では、改変には、第1のFcポリペプチドへの突起(ノブ)の導入、及び第2のFcポリペプチドへの空洞(ホール)の導入が含まれ、これにより突起が空洞内に配置され、第1及び第2のFc含有ポリペプチドの複合体形成が促進される。ポリペプチドに突起または空洞を作製するための置換及び/または改変の標的となるアミノ酸は、典型的には、第2のポリペプチドの界面の1つまたは複数のアミノ酸と相互作用または接触する界面アミノ酸である。

**【0279】**

いくつかの実施形態では、Fc配列が配列のN末端部分であった構築物の場合、Fc配列の前にアミノ酸の配列が付加される。場合によっては、アミノ酸配列HMSVSAQ(SEQ ID NO: 1190)が、Fc配列が配列のN末端部分であった構築物のFc配列の直前に付加される。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体スタック分子は、Fc領域(ノブ)及び第1のバリエーションポリペプチド及び/または第2のIgSFドメイン(例えば、第2のバリエーションIgSFドメイン)を含有する第1のFcポリペプチド融合体、ならびにFc領域(ホール)を含有する第2のFcポリペプチド融合体を含み、そして第1及び第2のFcポリペプチド融合体の両方のFc領域の直前にスタッパー配列HMSVSAQ(SEQ ID NO: 1190)を加えた。

**【0280】**

いくつかの実施形態では、突起(ホール)アミノ酸を含有するように改変された第1のポリペプチドは、天然または元のアミノ酸の、第1のポリペプチドの界面から突出する少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸による置換を含み、その結果、第2のポリペプチドの隣接界面の代償性の空洞(ホール)に配置可能である。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基よりも大きな側鎖体積を有するものである。当業者は、アミノ酸残基の特性を決定及び/または評価して、突起を作製するための理想的な置換アミノ酸を特定する方法を知っている。いくつかの実施形態では、突起の形成のための置換残基は、天然に存在するアミノ酸残基であり、例えば、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、またはトリプトファン(W)が挙げられる。いくつかの実施例では、置換のために特定された元の残基は、例えばアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニン、またはバリンなどの小さな側鎖を有するアミノ酸残基である。

**【0281】**

いくつかの実施形態では、空洞(ホール)を含有するように改変された第2のポリペプチドは、天然または元のアミノ酸の、第2のポリペプチドの界面からくぼんだ少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸による置換を含み、これにより、第1のポリペプチドの界面の対応する突起に適合可能である。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有するものである。当業者は、アミノ酸残基の特性を決定及び/または評価して、空洞を形成するための理想的な置換残基を特定する方法を知っている。一般的に、空洞の形成のための置換残基は、天然に存在するアミノ酸であり、例えば、ア

10

20

30

40

50

ラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T)、及びバリン (V) が挙げられる。いくつかの実施例では、置換のために特定された元のアミノ酸は、例えば、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファンなどの大きな側鎖を有するアミノ酸である。

#### 【0282】

例えば、ヒト IgG1 の CH3 界面には、各表面から 1090 2 埋め込まれる 4 つの逆平行 ストランド上に位置する各ドメインに 16 残基が含まれる (例えば、Deisenhofer et al. (1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.* 9:617-621; 米国特許第 5,731,168 号参照のこと)。突起または空洞を作製するための CH3 ドメインの改変は、例えば、第 5,731,168 号; 国際特許出願 WO98/50431 及び WO2005/063816; 及び Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.* 9:617-621 に記載されている。いくつかの実施例では、突起または空洞を作製するための CH3 ドメインの改変は、典型的には 2 つの中央の逆平行 ストランドに位置する残基を標的としている。その目的は、作製された突起が、パートナー CH3 ドメインの代償性の空洞により適合されるのではなく、周囲の溶媒へと突出することにより適合され得るリスクを最小限に抑えることである。

10

#### 【0283】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、「ノブ鎖」の CH3 ドメインに T366W 変異を、「ホール鎖」の CH3 ドメインに T366S、L368A、Y407V 変異を含有する。場合によっては、CH3 ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド架橋も、例えば「ノブ」または「ホール」鎖の CH3 ドメインに Y349C 変異、及び他方の鎖の CH3 ドメインに E356C 変異または S354C 変異を導入することによって、使用することができる (Merchant, A.M., et al., *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681)。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、2 つの CH3 ドメインのうちの一つに S354C、T366W 変異を、2 つの CH3 ドメインのうち他方に Y349C、T366S、L368A、Y407V 変異を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、2 つの CH3 ドメインのうちの一つに E356C、T366W 変異を、2 つの CH3 ドメインうち他方に Y349C、T366S、L368A、Y407V 変異を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、2 つの CH3 ドメインのうちの一つに Y349C、T366W 変異を、2 つの CH3 ドメインうち他方に E356C、T366S、L368A、Y407V 変異を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、2 つの CH3 ドメインのうちの一つに Y349C、T366W 変異を、2 つの CH3 ドメインうち他方に S354C、T366S、L368A、Y407V 変異を含む。他のノブ・イン・ホール技術の例は、例えば欧州特許第 1870459A1 号に記載されるように、当技術分野において公知である。

20

30

#### 【0284】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子の Fc 領域はさらに、上記のいずれかのような 1 つまたは複数の他の Fc 変異を含有することができる。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、エフェクター機能を低下させる変異を有する Fc 領域を含有する。

40

#### 【0285】

いくつかの実施形態では、CH3 突起 (ノブ) または空洞 (ホール) 改変を含有する Fc バリエーションは、スタック免疫調節ポリペプチドのどこかに、但し、典型的には、その N 末端または C 末端を介して第 1 及び/または第 2 のスタック免疫調節ポリペプチドの N 末端または C 末端に結合して、例えば融合ポリペプチドを形成することができる。連結は、直接的またはリンカーを介して間接的であり得る。典型的には、ノブ分子及びホール分子は、CH3 突起改変 (複数可) を含有する Fc バリエーションに連結した第 1 のスタック免疫調節ポリペプチドと、CH3 空洞改変 (複数可) を含有する Fc バリエーションに連結した第

50

2のスタック免疫調節ポリペプチドとの共発現によって生成される。

【0286】

本明細書では、バリエーションCD155ポリペプチドのIgSFドメイン、例えばIgVドメイン、及びバリエーションPD-L2ポリペプチドの第2のIgSFドメイン、例えばIgVを含有するスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドから産生されるホモ二量体マルチドメインスタック分子が提供される。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子の第1及び第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1191、1192、1193、1194、1195もしくは1196のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1191、1192、1193、1194、1195もしくは1196のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有し、ならびにバリエーションPD-L2及び/またはCD155

IgSFドメインにおいてもう1つのアミノ酸改変を含有する、アミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、得られたマルチドメインスタック分子は、TIGIT及びPD-1の両方に結合する。いくつかの態様では、TIGITへの結合は、非改変または野生型CD155の対応するIgSFドメインのTIGITへの結合と比較して、同程度または類似の程度、または、場合によっては、増加する。いくつかの態様では、PD-1への結合は、非改変または野生型PD-L1の対応するIgSFドメインのPD-1への結合と比較して、同程度または類似の程度、または、場合によっては、増加する。いくつかの実施形態では、TIGITまたはPD-1への結合は、非スタック形態のバリエーションCD155 IgSF-FcのTIGITまたはPD-1への結合の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、TIGITへの結合は、非スタック形態のバリエーションCD155 IgSF-FcのTIGITへの結合の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、得られたマルチドメインスタック分子は、例えばレポーターアッセイで測定して、非スタックバリエーションPD-L2 IgSF-Fc及び/またはバリエーションCD155-IgSF-Fcと比較して、T細胞免疫応答を増加させる。いくつかの実施形態では、増加は、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍またはそれ以上より大きい。

【0287】

本明細書では、バリエーションCD155ポリペプチドのIgSFドメイン、例えばIgVドメイン、及びバリエーションPD-L2ポリペプチドの第2のIgSFドメイン、例えばIgVを含有するスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドから産生されるヘテロ二量体マルチドメインスタック分子が提供される。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子の第1及び第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドの1つは、SEQ ID NO: 1197、1198、1199、1200、1201もしくは1203のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1197、1198、1199、1200、1201もしくは1203のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有し、かつバリエーションPD-L2及び/またはCD155 IgSFドメインにおいてもう1つのアミノ酸改変を含有するアミノ酸の配列を有する、ノブ分子を含む。いくつかの実施形態では、マルチドメインスタック分子の第1及び第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドの他方は、SEQ ID NO: 1188、1202もしくは1204のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1188、1202もしくは1204のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有し、かつバリエーションPD-L2及び/またはCD155 IgSFドメインにおいてもう1つのアミノ酸改変を含有するアミノ酸の配列を有する、ホール分子を含む。いくつかの実施形態では、得られたマルチドメイン

スタック分子は、TIGIT及びPD-1の両方に結合する。いくつかの実施形態では、ノブ分子及びホール分子は、様々な組み合わせで発現し、CH3突起改変（複数可）を含有するFcバリエーションに連結した第1のスタック免疫調節ポリペプチドと、CH3空洞改変（複数可）を含有するFcバリエーションに連結した第2のスタック免疫調節ポリペプチドとの共発現によって生成される。例えば、マルチドメインスタック分子の第1及び第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1197+1188、1198+1188、1199+1188、1200+1188、1201+1202、1203+1204、1199+1204、1199+1202、1200+1202、1200+1204のいずれかに記載の配列のペア、またはSEQ ID NO: 1197+1188、1198+1188、1199+1188、1200+1188、1201+1202、1203+1204、1199+1204、1199+1202、1200+1202、1200+1204のペアのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有し、かつバリエーションPD-L2及び/またはCD155 IgSFドメインにおいてもう1つのアミノ酸改変を含有するアミノ酸の配列を有する、ノブ分子及びホール分子を含む。場合によっては、ノブ分子またはホール分子は、SEQ ID NO: 1190に記載のN末端HMSSVSAQを含む。いくつかの態様では、TIGITへの結合は、非改変または野生型CD155の対応するIgSFドメインのTIGITへの結合と比較して、同程度または類似の程度、または、場合によっては、増加する。いくつかの態様では、PD-1への結合は、非改変または野生型PD-L2の対応するIgSFドメインのPD-1への結合と比較して、同程度または類似の程度、または、場合によっては、増加する。いくつかの実施形態では、TIGITまたはPD-1への結合は、非スタック形態のバリエーションCD155 IgSF-FcのTIGITまたはPD-1への結合の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、TIGITへの結合は、非スタック形態のバリエーションCD155 IgSF-FcのTIGITへの結合の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、得られたマルチドメインスタック分子は、例えばレポーターアッセイで測定して、非スタックバリエーションPD-L2 IgSF-Fc及び/またはバリエーションCD155-IgSF-Fcと比較して、T細胞免疫応答を増加させる。いくつかの実施形態では、増加は、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍またはそれ以上より大きい。

10

20

30

#### 【0288】

C. バリエーションポリペプチド及び免疫調節タンパク質のコンジュゲート及び融合体

いくつかの実施形態では、IgSFファミリーのIgドメインのバリエーション(vIgD)を含む免疫調節タンパク質である本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドは、部分、例えばエフェクター部分、例えば別のタンパク質と、直接的または間接的に、コンジュゲートまたは融合して、コンジュゲートを形成することができる(「IgSFコンジュゲート」)。いくつかの実施形態では、結合は、共有結合または非共有結合(例えば、ビオチン-ストレプトアビジン非共有結合性相互作用を介したもの)であることができる。いくつかの実施形態では、部分は、標的指向性部分、小分子薬物(500ダルトンモル質量未満の非ポリペプチド薬物)、毒素、細胞増殖抑制剤、細胞傷害剤、免疫抑制剤、診断目的に好適な放射性物質、治療目的の放射性金属イオン、プロドラッグ活性化酵素、生物学的半減期を延長させる物質、または診断用もしくは検出可能物質であることができる。

40

#### 【0289】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、治療用物質、例えばがん治療用物質であり、細胞傷害性、細胞増殖抑制性であるか、またはさもなければいくらかの治療効果をもたらす。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、標的指向性部分または物質、例えば、細胞表面抗原、例えば腫瘍細胞の表面上の抗原を標的とする物質である。いくつ

50

かの実施形態では、エフェクター部分は、検出可能シグナルを直接的または間接的のいずれかで生成することができる標識である。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、毒素である。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子またはナノ粒子である。

【0290】

いくつかの実施形態では、同一であっても異なってもよい1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のエフェクター部分は、バリエーションポリペプチドまたはタンパク質にコンジュゲート、連結、または融合してIgSFコンジュゲートを形成する。いくつかの実施形態では、そのようなエフェクター部分を、当技術分野において公知かつ以下に記載される様々な分子生物学的または化学的コンジュゲーション及び連結法を使用して、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質に結合させることができる。いくつかの実施形態では、リンカー、例えばペプチドリリンカー、切断可能リンカー、非切断可能リンカー、またはコンジュゲーション反応を助けるリンカーを使用して、エフェクター部分をバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質に連結するまたはコンジュゲートすることができる。

10

【0291】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは、以下の成分、すなわち(タンパク質またはポリペプチド)、 $(L)_q$ 及び(エフェクター部分) $_m$ を含み、該タンパク質またはポリペプチドは、記載される1つまたは複数の同族カウンター構造体リガンドと結合することができる記載のバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質のいずれかであり；Lは、タンパク質またはポリペプチドを部分に連結するためのリンカーであり；mは、少なくとも1であり；qは、0以上であり；得られたIgSFコンジュゲートは、1つまたは複数のカウンター構造体リガンドに結合する。特定の実施態様では、mは1~4であり、qは0~8である。

20

【0292】

いくつかの実施形態では、細胞表面分子に結合する標的指向性物質とコンジュゲートされた本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を含むIgSFコンジュゲートであって、例えば、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を特定の細胞へ標的指向送達するための、IgSFコンジュゲートが提供される。いくつかの実施形態では、標的指向性物質は、対象における正常な細胞/組織及び/または腫瘍細胞/腫瘍上に存在する分子を局在化してそれに結合する能力を有する分子(複数可)である。言い換えると、標的指向性物質を含むIgSFコンジュゲートは、細胞、例えば腫瘍細胞上に存在するリガンドに結合(直接的または間接的に)することができる。使用が企図される本発明の標的指向性物質は、標的細胞または分子の成分と結合することができる、抗体、ポリペプチド、ペプチド、アプタマー、他のリガンド、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

30

【0293】

いくつかの実施形態では、標的指向性物質は、対象への投与後に、腫瘍細胞(複数可)と結合するか、または腫瘍細胞(複数可)の近く(例えば、腫瘍血管系または腫瘍微小環境)に結合することができる。標的指向性物質は、がん細胞の表面上の受容体またはリガンドに結合し得る。本発明の別の態様において、非がん性細胞または組織に特異的である標的指向性物質が選択される。例えば、標的指向性物質は、特定の細胞または組織上に通常存在する分子に特異的であることができる。さらに、いくつかの実施形態では、同じ分子が正常細胞及びがん細胞上に存在することができる。様々な細胞成分及び分子が公知である。例えば、標的指向性物質がEGFRに特異的である場合、得られたIgSFコンジュゲートは、EGFRを発現するがん細胞もEGFRを発現する正常な皮膚上皮細胞も標的とすることができる。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のIgSFコンジュゲートは、2つの別々の機序(がん細胞及び非がん細胞を標的とする)によって作用することができる。

40

【0294】

50

本明細書に開示される本発明の種々の態様において、本発明のIgSFコンジュゲートは、細胞成分、例えば腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、寄生生物由来の抗原と結合する/標的とすることができる、標的指向性物質を含む。いくつかの態様では、細胞成分、抗原または分子は各々、標的指向性物質の所望の標的を意味するために使用することができる。例えば、各種実施形態では、標的指向性物質は、限定されないが、上皮成長因子受容体(EGFR、ErbB-1、HER1)、ErbB-2(HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFRリガンドファミリー；インスリン様成長因子受容体(IGFR)ファミリー、IGF結合タンパク質(IGFBP)、IGFRリガンドファミリー；血小板由来成長因子受容体(PDGFR)ファミリー、PDGFRリガンドファミリー；線維芽細胞成長因子受容体(FGFR)ファミリー、FGFRリガンドファミリー、血管内皮成長因子受容体(VEGFR)ファミリー、VEGFファミリー；HGF受容体ファミリー；TRK受容体ファミリー；エフリン(EPH)受容体ファミリー；AXL受容体ファミリー；白血球チロシンキナーゼ(LTK)受容体ファミリー；TIE受容体ファミリー、アンジオポエチン1,2；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体(ROR)受容体ファミリー、例えば、ROR1；CD171(L1CAM)；B7-H6(NCR3LG1)；PD-L2、腫瘍グリコシル化抗原、例えば、sTnまたはTn、例えばMUC1のsTn Ag；LHR(LHCGR)；ホスファチジルセリン、ジスコイジンドメイン受容体(DDR)ファミリー；RET受容体ファミリー；KLG受容体ファミリー；RYK受容体ファミリー；MUSK受容体ファミリー；トランスフォーミング成長因子-(TGF-)受容体、TGF-；サイトカイン受容体、クラスI(ヘマトポエチンファミリー)及びクラスII(インターフェロン/IL-10ファミリー)受容体、腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリー(TNFRSF)、死受容体ファミリー；がん-精巢(CT)抗原、系列特異的抗原、分化抗原、-アクチニン-4、ARTC1、切断点クラスター領域-アベルソン(Abelson)(Bcr-abl)融合産物、B-RAF、カスパーゼ-5(CASP-5)、カスパーゼ-8(CASP-8)、-カテニン(CTNNB1)、細胞分裂周期27(CDC27)、サイクリン依存性キナーゼ4(CDK4)、CDKN2A、COA-I、dek-can融合タンパク質、EFTUD-2、伸長因子2(ELF2)、Etsバリエーション遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子ETS(ETC6-AML1)融合タンパク質、フィブロネクチン(FN)、例えば、フィブロネクチンのエクストラドメインA(EDA)、GPNMB、低密度脂質受容体/GDP-Lフコース：-Dガラクトース2--Lフコシルトランスフェラーゼ(LDLR/FUT)融合タンパク質、HLA-A2.HLA-A2遺伝子における2ドメインのヘリックスの残基170におけるアルギニン-イソロイシン交換(HLA-A\*201-R170I)、HLA-A11、熱ショックタンパク質70-2変異型(HSP70-2M)、K1AA0205、MART2、黒色腫瘍遍在性変異型1、2、3(MUM-I、2、3)、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、ネオ-PAP、ミオシンクラスI、NFYC、OGT、OS-9、pm1-RAR融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras(KRAS2)、N-ras(NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1または-SSX2融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGK-1、BAGE-2,3,4,5、GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8、GnT-V(異常なN-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼV、MGAT5)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-I、LAGE、LAGE-I、黒色腫瘍上のCTL認識抗原(CAMEL)、MAGE-A1(MAGE-I)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-AI1、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1(MUC1)、MART-1/Melan-A(MLANA)、gp100、gp100/Pmel17(SILV)、チロシナーゼ(TYR)、TRP-I、HAGE、NA-88、NY-E

10

20

30

40

50

SO-I、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1, 2, 3, 4、TRP2-INT2、がん胎児性抗原(CEA)、カリクレイン4、マンマグロビン-A、OAl、前立腺特異抗原(PSA)、TRP-1/gp75、TRP-2、アデイポフィリン、黒色腫には存在しないインターフェロン誘導性タンパク質2(AIM-2)、BING-4、CPSF、サイクリンD1、上皮細胞接着分子(Ep-CAM)、EphA3、線維芽細胞成長因子-5(FGF-5)、糖タンパク質250(gp250)、EGFR(ERBB1)、HER-2/neu(ERBB2)、インターロイキン13受容体2鎖(IL13R2)、IL-6受容体、腸カルボキシエステラーゼ(iCE)、-フェトタンパク質(AFP)、M-CSF、mdm-2、MUC1、p53(TP53)、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-I、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、サバイピン(BIRC5)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、テロメラーゼ、ウィルムス腫瘍遺伝子(WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIPI1、CTAGE-I、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF15q14、HCA661、LDHC、MORC、SGY-I、SPO11、TPX1、NY-SAR-35、FTHL17、NXF2、TDRD1、TEX15、FATE、TPTE、免疫グロブリンイデオタイプ、ベンスジョーンズタンパク質、エストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、がん抗原72-4(CA72-4)、がん抗原15-3(CA15-3)、がん抗原27-29(CA27-29)、がん抗原125(CA125)、がん抗原19-9(CA19-9)、-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、-2ミクログロブリン、扁平上皮がん抗原、神経特異的エノラーゼ、熱ショックタンパク質gp96、GM2、サルグラモスチム、CTLA-4、707アラニンプロリン(707-AP)、T細胞によって認識される腺がん抗原4(ART-4)、がん胎児性抗原ペプチド-1(CAP-I)、カルシウム活性化クロライドチャンネル-2(CLCA2)、シクロフィリンB(Cyp-B)、ヒト印環腫瘍-2(HST-2)、ヒトパピローマウイルス(HPV)タンパク質(HPV-E6、HPV-E7、メジャーまたはマイナーカプシド抗原、他)、エプスタイン・パール・ウイルス(EBV)タンパク質(EBV潜伏膜タンパク質-LMP1、LMP2;他)、BまたはC型肝炎ウイルスタンパク質、ならびにHIVタンパク質を含む成分に特異的であるかまたはそれに結合する。

#### 【0295】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは、その標的指向性物質により、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍微小環境の細胞成分に結合し、それにより免疫応答の調節(例えば、共刺激分子の活性化または免疫細胞活性化の負の調節分子の阻害による)、生存シグナルの阻害(例えば、成長因子またはサイトカインまたはホルモン受容体拮抗物質)、死シグナルの活性化、及び/または免疫媒介性細胞傷害性(例えば、抗体依存性細胞傷害性による)を介して、標的とした細胞の殺傷を促進する。このようなIgSFコンジュゲートは、例えばIgSFコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスにより、例えば、コンジュゲートされたエフェクター部分の腫瘍標的への送達を促すなど、腫瘍細胞を抑制、低減または排除するようにいくつかの機序によって機能することができる;または、そのようなコンジュゲートは、免疫細胞(例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞)を動員、それと結合、及び/またはそれを活性化することができる。さらに、場合によっては、前述の経路の1つまたは複数が、本発明の1つまたは複数のIgSFコンジュゲートの投与によって作用し得る。

#### 【0296】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは、その標的指向性物質により、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍微小環境の細胞成分に局在化、例えば結合し、これにより腫瘍の近くで免疫応答の細胞を調節する。いくつかの実施形態では、標的指向性物質は、コンジュゲートされたIgSF(例えば、vIgD)の腫瘍標的への送達を促し、例えばその同族結合パートナーと相互作用して、同族結合パートナーを保有する免疫細胞(例え

ば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞)のシグナル伝達を変化させる。いくつかの実施形態では、局在化送達は、PD-1阻害性受容体の拮抗作用または遮断作用を媒介する。いくつかの実施形態では、局在化送達は、PD-1阻害性受容体を作動させ、これは場合により、活性化受容体のクラスタリングが近接する場合に起こる可能性がある。

#### 【0297】

いくつかの実施形態では、標的指向性物質は、免疫グロブリンである。本明細書において使用される場合、「免疫グロブリン」という用語は、限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生される断片、単鎖Fv(scFv)；抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、及び上のいずれかのエピトープ結合断片を含む、天然または人工の一価または多価抗体を含む。「抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、例えば、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を指す。本発明の免疫グロブリン分子は、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)またはサブクラスの免疫グロブリン分子であることができる。

10

#### 【0298】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは、その抗体標的指向性部分により、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍微小環境の細胞成分と結合し、それにより免疫応答の調節(例えば、共刺激分子の活性化または免疫細胞活性化の負の調節分子の阻害による)、生存シグナルの阻害(例えば、成長因子またはサイトカインまたはホルモン受容体拮抗物質)、死シグナルの活性化、及び/または免疫媒介性細胞傷害性(例えば、抗体依存性細胞傷害性による)を介して、標的とした細胞のアポトーシスを促進する。このようなIgSFコンジュゲートは、例えばIgSFコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスにより、例えば、コンジュゲートされたエフェクター部分の腫瘍標的への送達を促すなど、腫瘍細胞を抑制、低減または排除するようにいくつかの機序によって機能することができる；または、そのようなコンジュゲートは、免疫細胞(例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞)を動員、それと結合、及び/またはそれを活性化することができる。

20

30

#### 【0299】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは、その抗体標的指向性部分により、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍微小環境の細胞成分と結合し、それにより免疫応答を調節する(例えば、共刺激分子の活性化または免疫細胞活性化の負の調節分子の阻害による)。いくつかの実施形態では、そのようなコンジュゲートは、免疫細胞(例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞)を認識し、それと結合し、及び/またはそれを調節(例えば、阻害または活性化)することができる。

#### 【0300】

本発明の抗体標的指向性部分は、限定されないが、Fab、Fab'(及びF(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連結されたFv(sdFv)ならびにVLまたはVHドメインのいずれかを含む断片を含む抗体断片を含む。単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域(複数可)を、単独でまたは以下：ヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインの全体もしくは一部分と組み合わせて含み得る。また、可変領域(複数可)とヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインの任意の組み合わせをまた含む抗原結合断片も本発明に含まれる。また、Fc断片、抗原-Fc融合タンパク質、及びFc-標的指向性部分コンジュゲートまたは融合産物(Fc-ペプチド、Fc-アダプター)も本発明に含まれる。本発明の抗体標的指向性部分は、鳥類及び哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。一態様では、抗体標的指向性部分は、ヒト、ネズミ(例えば、マウス及びラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラ

40

50

クダ、ウマ、またはニワトリである。さらに、そのような抗体は、動物抗体のヒト化バージョンであってもよい。本発明の抗体標的指向性部分は、単一特異性、二重特異性、三重特異性であっても、より高次の多重特異性のものであってもよい。

#### 【0301】

各種実施形態では、抗体/標的指向性部分は、免疫細胞（例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞）を、Fc（抗体内）とFc受容体（免疫細胞上）との間の相互作用を介して及び本明細書において提供されるコンジュゲートされたバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を介して、動員、結合、及び/または活性化する。いくつかの実施形態では、抗体/標的指向性部分は、本明細書において提供されるコンジュゲートされたバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を介して、腫瘍物質を認識するまたはそれと結合して、それを腫瘍細胞に局在化し、腫瘍の近くで免疫細胞の調節を促す。

10

#### 【0302】

IgSFコンジュゲートに組み込むことができる抗体の例は、限定されないが、抗体、例えば、セツキシマブ（IMC-C225；Erbibitux（登録商標））、トラスツズマブ（Herceptin（登録商標））、リツキシマブ（Rituxan（登録商標）；MabThera（登録商標））、ペバシズマブ（Avastin（登録商標））、アレムツズマブ（Campath（登録商標）；Campath-1H（登録商標）；Mabcampath（登録商標））、パニツムマブ（ABX-EGF；Vectibix（登録商標））、ラニビズマブ（Lucentis（登録商標））、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン（Zevalin（登録商標））、トシツモマブ、ヨウ素I 131トシツモマブ（BEXXAR（登録商標））、カツマキソマブ（Removab（登録商標））、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン（Mylotarg（登録商標））、アパタセプト（CTLA4-Ig；Orencia（登録商標））、ベラタセプト（L104EA29YIg；LEA29Y；LEA）、イピリムマブ（MDX-010；MDX-101）、トレメリムマブ（チシリムマブ；CP-675,206）、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト（VEGF Trap、AVE005）、ポロキシマブ（M200）、F200、MORAb-009、SS1P（CAT-5001）、シクスツムマブ（IMC-A12）、マツズマブ（EMD72000）、ニモツズマブ（h-R3）、ザルツムマブ（HuMax-EGFR）、ネシツムマブIMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004、mAb-425、Panorex@（17-1A）（ネズミモノクローナル抗体）；Panorex@（17-1A）（キメラネズミモノクローナル抗体）；IDEC-Y2B8（ネズミ、抗CD20MAb）；BEC2（抗イディオタイプMAb、GDエピトープを模倣）（BCGを含む）；Oncolymp（Lym-1モノクローナル抗体）；SMARTMI95Ab、ヒト化13'I LYM-I（Oncolymp）、Ovarex（B43.13、抗イディオタイプマウスMAb）；MDX-210（ヒト化抗HER-2二重特異性抗体）；腺がん上のEGP40（17-1A）汎がん腫（pancarcinoma）抗原に結合する3622W94 Mab；抗VEGF、Zenapax（SMART抗Tac（IL-2受容体）；SMARTMI95Ab、ヒト化Ab、ヒト化）；MDX-210（ヒト化抗HER-2二重特異性抗体）；MDX-447（ヒト化抗EGF受容体二重特異性抗体）；NovoMAb-G2（汎がん腫特異的Ab）；TNT（ヒストン抗原に対するキメラMAb）；TNT（ヒストン抗原に対するキメラMAb）；Gliomab-H（Monoclonals-ヒト化Ab）；GNI-250 Mab；EMD-72000（キメラ-EGF拮抗物質）；LymphoCide（ヒト化LL2抗体）；及びMDX-260二重特異性、標的GD-2、ANA Ab、SMARTIDLO Ab、SMARTABL364 AbまたはImmuraIT-CEAを含む。前述のリストに例示されるとおり、特定の標的エピトープに対する抗体を作製することは慣用的である。

20

30

40

#### 【0303】

いくつかの実施形態では、抗体標的指向性部分は、Fcドメインを含有する、完全長抗

50

体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、例えば抗体のFc部分のN末端へのコンジュゲーションによって、抗体標的指向性部分のFc部分にコンジュゲートされる。

#### 【0304】

いくつかの実施形態では、vIgDは、直接的または間接的に、抗体の軽鎖及び/または重鎖のN末端またはC末端に連結されている。いくつかの実施形態では、連結は、ペプチドリンカー、例えば上記のいずれかを介した連結であることができる。様々な配置を構築することができる。図7A~7Cは、例示的な配置を示す。いくつかの実施形態では、抗体コンジュゲートを、細胞において抗体の重鎖及び軽鎖の共発現によって産生することができる。

10

#### 【0305】

本発明の一態様において、標的指向性物質は、アプタマー分子である。例えば、いくつかの実施形態では、アプタマーは、標的指向性物質として機能する核酸からなる。各種実施形態では、本発明のIgSFコンジュゲートは、腫瘍細胞、腫瘍血管系、及び/または腫瘍微小環境上の分子に特異的なアプタマーを含む。いくつかの実施形態では、アプタマーはそれ自体が、標的指向性モジュール(配列)に加えて、生物学的に活性な配列を含むことができ、該生物学的に活性な配列は、標的細胞に対する免疫応答を誘導することができる。言い換えれば、そのようなアプタマー分子は、二重使用物質である。いくつかの実施形態では、本発明のIgSFコンジュゲートは、アプタマーの抗体へのコンジュゲーションを含み、該アプタマー及び抗体は、腫瘍細胞、腫瘍血管系、腫瘍微小環境、及び/または免疫細胞上の別々の分子への結合に特異的である。

20

#### 【0306】

「アプタマー」という用語は、特定の分子への特異的結合特性に基づいて選択された、DNA、RNAまたはペプチドを含む。例えば、本明細書に開示されるとおりの腫瘍細胞、腫瘍血管系、腫瘍微小環境、及び/または免疫細胞内の特定の遺伝子または遺伝子産物と結合するように、アプタマー(複数可)を選択することができ、この場合、選択は、当技術分野において公知及び当業者によく知られている方法によってなされる。

#### 【0307】

本発明のいくつかの態様では、標的指向性物質はペプチドである。例えば、本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、がんまたは腫瘍細胞の成分と結合することができるペプチドにコンジュゲートすることができる。したがって、本発明のそのようなIgSFコンジュゲートは、腫瘍細胞、腫瘍血管系の細胞成分、及び/または腫瘍微小環境の成分に結合するペプチド標的指向性物質を含む。いくつかの実施形態では、標的指向性物質ペプチドは、インテグリンの拮抗物質または作動物質であることができる。及びサブユニットを含むインテグリンは、当業者に周知の多数のタイプを含む。

30

#### 【0308】

一実施形態では、標的指向性物質は、Vv<sub>3</sub>である。インテグリンVv<sub>3</sub>は、多種多様な細胞上で発現され、骨マトリックスへの破骨細胞の接着、血管平滑筋細胞の遊走、及び血管新生を含むいくつかの生物学的に関連するプロセスを媒介することが示されている。インテグリンに対する好適な標的指向性分子は、他のインテグリン、例えばV4<sub>i</sub>(VLA-4)、V4-P7(例えば、米国特許第6,365,619号; Chang et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:159-163(2002); Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:133-136(2002)を参照のこと)などに対する、RGDペプチドまたはペプチドミメティック及び非RGDペプチドまたはペプチドミメティック(例えば、米国特許第5,767,071号及び第5,780,426号を参照のこと)を含む。

40

【0309】

いくつかの実施形態では、治療用物質とコンジュゲートした本明細書において提供され

50

るバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を含むIgSFコンジュゲートが提供される。いくつかの実施形態では、治療用物質は、例えば、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、及びビンデシンを含む(Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187, 1986)。いくつかの実施形態では、治療用物質は、細胞内活性を有する。いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは内在化され、治療用物質は、細胞のタンパク質合成を遮断し細胞内で細胞死を導く細胞毒素である。いくつかの実施形態では、治療用物質は、例えば、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、プリオジン、ジフテリア毒素、レストリクトシン(restrictocin)、Pseudomonas外毒素A及びそのバリエーションを含む、リボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒素である。いくつかの実施形態では、治療用物質がリボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒素である場合、タンパク質が細胞に対して細胞傷害性となるために、IgSFコンジュゲートは標的細胞に結合したときに内在化されなければならない。

#### 【0310】

いくつかの実施形態では、毒素とコンジュゲートした本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を含むIgSFコンジュゲートが提供される。いくつかの実施形態では、毒素は、例えば、細菌毒素、例えばジフテリア毒素、植物毒素、例えばリシン、小分子毒素、例えばゲルダナマイシン(Mandler et al., J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581(2000); Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028(2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-791(2002))、メイタンシノイド(欧州特許第1391213号; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996))、及びカリケアミシン(Lode et al., Cancer Res. 58:2928(1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342(1993))を含む。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含む機序によって、それらの細胞傷害性及び細胞増殖阻害効果を発揮し得る。

#### 【0311】

いくつかの実施形態では、間接的または直接的に検出可能なシグナルを生成できる標識とコンジュゲートした本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を含むIgSFコンジュゲートが提供される。これらのIgSFコンジュゲートを、研究または診断用途に、例えばがんのin vivo検出に使用することができる。標識は、好ましくは、直接的または間接的のいずれかで、検出可能シグナルを産生することができる。例えば、標識は、放射線不透過性または放射性同位体、例えば<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I; 蛍光(フルオロフォア)もしくは化学発光(クロモフォア)化合物、例えばフルオレセインイソチオシアナート、ローダミンもしくはルシフェリン; 酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ; イメージング剤; または金属イオンであり得る。いくつかの実施形態では、標識は、シンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば<sup>99</sup>Tcもしくは<sup>123</sup>I、または核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージング、MRIとしても公知)用のスピン標識、例えばジルコニウム-89、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンもしくは鉄である。ジルコニウム-89を、例えばPETイメージング用に、様々な金属キレート剤に錯体化して抗体にコンジュゲートしてよい(WO2011/056983)。いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートは、間接的に検出可能である。例えば、IgSFコンジュゲートに特異的かつ検出可能標識を含有する二次抗体を使用して、IgSFコンジュゲートを検出することができる。

#### 【0312】

IgSFコンジュゲートを、当技術分野において公知の任意の方法を使用して調製して

10

20

30

40

50

よい。例えば、WO2009/067800、WO2011/133886、及び米国特許出願公開第2014322129号（その全体が本明細書に参照により組み込まれる）を参照のこと。

【0313】

IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質がエフェクター部分と会合またはそれに連結できる任意の手段によって、エフェクター部分に「結合」され得る。例えば、IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、化学的または組換え手段によって、エフェクター部分に結合され得る。融合体またはコンジュゲートを調製するための化学的手段は、当技術分野において公知であり、これを使用してIgSFコンジュゲートを調製することができる。バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質とエフェクター部分をコンジュゲートするために使用される方法は、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質のそれらの1つまたは複数のカウンター構造体リガンドに結合する能力に干渉することなく、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質とエフェクター部分とを接続できなければならない。

10

【0314】

IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、エフェクター部分に間接的に連結してよい。例えば、IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、数種類のうちの1種のエフェクター部分を含有するリポソームに直接連結してよい。エフェクター部分（複数可）及び/またはバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、固体表面に結合させてもよい。

20

【0315】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質とエフェクター部分は共にタンパク質であり、当技術分野において周知の技術を使用してこれらをコンジュゲートすることができる。2つのタンパク質をコンジュゲートできる利用可能な数百のクロスリンカーがある。（例えば、“Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking,” 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arborを参照のこと）。クロスリンカーは、一般的に、バリエーションポリペプチドもしくは免疫調節タンパク質及び/またはエフェクター部分上で利用可能であるかまたはそこに挿入される反応性官能基に基づいて選択される。加えて、反応性基がない場合、光活性化可能クロスリンカーを使用することができる。場合によっては、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質とエフェクター部分との間にスペーサーを含むことが望ましい場合がある。当技術分野に公知の架橋剤は、ホモ二官能性物質：グルタルアルデヒド、ジメチルアジピミデート及びビス（ジアゾベンジジン）、ならびにヘテロ二官能性物質：mマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド及びスルホ-mマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドを含む。

30

【0316】

いくつかの実施形態では、IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、エフェクター部分の化学的結合のために特定の残基で操作してよい。当技術分野に公知の分子の化学的結合に使用される特定の残基は、リジン及びシステインを含む。クロスリンカーは、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質上に挿入される及びエフェクター部分上で利用可能な反応性官能基に基づいて選択される。

40

【0317】

IgSFコンジュゲートをまた、組換えDNA技術を使用して調製してもよい。そのような場合、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードするDNA配列を、エフェクター部分をコードするDNA配列に融合させることで、キメラDNA分子が得られる。キメラDNA配列は、融合タンパク質を発現する宿主細胞にトランスフェクトされる。細胞培養物から融合タンパク質を回収し、当技術分野において公知の技術を使用して精製することができる。

50

## 【0318】

標識であるエフェクター部分をバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質に結合させる例は、Hunter, et al., Nature 144:945 (1962); David, et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982); Wensel and Meares, Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983); 及び Colcher et al., "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", Meth. Enzymol., 121:802-16 (1986) に記載されている方法を含む。

10

## 【0319】

放射性標識または他の標識を公知の方法でコンジュゲートに組み込んでよい。例えば、ペプチドを、生合成しても、例えば水素の代わりにフッ素-19を含む好適なアミノ酸前駆体を使用する化学アミノ酸合成によって合成してもよい。99Tcまたは123I、186Re、188Re及び111Inのような標識を、ペプチド内のシステイン残基を介して結合させることができる。イットリウム-90を、リジン残基を介して結合させることができる。IODOGEN法 (Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)) を使用してヨウ素-123を組み込むことができる。"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatral, CRC Press 1989) は、他の方法を詳細に記載している。

20

## 【0320】

バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質と細胞傷害性物質のコンジュゲートを、多種多様な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、アジブイミド酸ジメチルHCI)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアナート (例えば、トルエン2,6-ジイソシアナート)、及びビス活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) を使用して作製してよい。例えば、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) に記載のとおりリシン免疫毒素を調製することができる。炭素-14で標識された1-p-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。例えば、WO94/11026を参照のこと。リンカーは、細胞中での細胞傷害性薬物の放出を容易にする「切断可能リンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光分解性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); 米国特許第5,208,020号) を使用してよい。

30

40

## 【0321】

本発明のIgSFコンジュゲートは、限定されないが、クロスリンカー試薬：市販 (例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.Aから) のBMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-

50

EMCS、スルホ - G M B S、スルホ - K M U S、スルホ - M B S、スルホ - S I A B、スルホ - S M C C、及びスルホ - S M P B、及び S V S B (スクシンイミジル - (4 - ニルスルホン)ベンゾアート)によって調製された薬物コンジュゲートを明示的に企図する。2003 - 2004 Applications Handbook and Catalogの467 ~ 498頁を参照されたい。

#### 【0322】

D. 膜貫通型及び分泌可能な免疫調節タンパク質ならびに操作された細胞

免疫調節バリエーションPD - L2ポリペプチドを発現する操作細胞(あるいは、「操作された細胞」)が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、発現する免疫調節バリエーションPD - L2ポリペプチドは、膜貫通型タンパク質であり、かつ表面で発現する。いくつかの実施形態では、免疫調節バリエーションPD - L2ポリペプチドは発現して、細胞から分泌される。

10

#### 【0323】

1. 膜貫通型免疫調節タンパク質

いくつかの実施形態では、バリエーションPD - L2を含む免疫調節ポリペプチドは、膜結合タンパク質であることができる。以下でより詳細に記載のとおり、免疫調節ポリペプチドは、少なくとも1つの親和性改変IgSFドメイン(IgVまたはIgC)を含有するエクストドメイン、膜貫通ドメイン、及び任意で、細胞質ドメインを含有する、バリエーションPD - L2を含む膜貫通型免疫調節ポリペプチドであることができる。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、リンパ球(例えば、T細胞またはNK細胞)または抗原提示細胞の表面を含む、免疫細胞、例えば哺乳動物細胞の表面上で発現され得る。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞(あるいは、細胞傷害性Tリンパ球またはCTL)、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、メモリーT細胞、またはT細胞のようなT細胞を含む、哺乳動物T細胞の表面上で発現する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、抗原提示細胞(APC)である。典型的には、しかし限定するものではないが、エクストドメイン(あるいは、「細胞外ドメイン」)は、本発明のバリエーションPD - L2の1つまたは複数のアミノ酸置換(例えば、アミノ酸置換)を含む。したがって、例えば、いくつかの実施形態では、膜貫通型タンパク質は、本発明のバリエーションPD - L2の1つまたは複数のアミノ酸置換を含むエクストドメインを含む。

20

30

#### 【0324】

いくつかの実施形態では、操作された細胞は、膜貫通型タンパク質のような膜タンパク質であることができる膜貫通型免疫調節ポリペプチド(TIP)であるバリエーションPD - L2ポリペプチドを発現する。典型的な実施形態では、膜タンパク質のエクストドメインは、記載される少なくとも1つのIgSFドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含有する、本明細書において提供されるバリエーションPD - L2の細胞外ドメインまたはそのIgSFドメインを含む。本明細書において提供される膜貫通型免疫調節タンパク質は、エクストドメインに連結された膜貫通ドメインをさらに含有する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞上の細胞表面発現のためにコードされたタンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、エクストドメインに直接連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、1つまたは複数のリンカーまたはスペーサーを介して、エクストドメインに間接的に連結されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、主に疎水性アミノ酸残基、例えばロイシン及びバリンを含有する。

40

#### 【0325】

いくつかの実施形態では、完全長膜貫通アンカードメインを使用して、確実にTIPが操作された細胞、例えば操作されたT細胞の表面上で発現するようにすることができる。好都合なことに、これは、親和性が改変されている特定の天然タンパク質(例えば、PD - L2または他の天然IgSFタンパク質)由来であることもでき、天然IgSFタンパク質(例えば、PD - L2)と同じ様式で第1の膜近位ドメインの配列に簡単に融合させることもできる。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、対応する野

50

生型または非改変 I g S F メンバーの膜貫通ドメイン、例えば、S E Q I D N O : 4 に記載のアミノ酸配列に含有される膜貫通ドメイン（表 2）を含む。いくつかの実施形態では、膜結合形態は、例えば S E Q I D N O : 4 の残基 2 2 1 ~ 2 4 1 に対応する、対応する野生型または非改変ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。

【 0 3 2 6 】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、天然 P D - L 2 の膜貫通ドメインではない非天然膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、膜結合タンパク質であるかまたは膜貫通型タンパク質である別の非 P D - L 2 ファミリーメンバーポリペプチド由来の膜貫通ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、T 細胞上の別のタンパク質由来の膜貫通アンカードメインを使用することができる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 に由来する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、スパーサードメインとして機能する C D 8 の細胞外部分をさらに含有することができる。例示的な C D 8 由来膜貫通ドメインは、S E Q I D N O : 2 6 6 もしくは 1 2 1 2 に記載される、または C D 8 膜貫通ドメインを含有するその一部分である。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、合成膜貫通ドメインである。

10

【 0 3 2 7 】

いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインに連結されたエンドドメイン、例えば細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含有する。いくつかの実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、細胞シグナル伝達を誘導する。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインは、対応する野生型または非改変ポリペプチドの細胞質ドメイン、例えば、S E Q I D N O : 4 に記載のアミノ酸配列に含有される細胞質ドメイン（表 2 を参照のこと）を含む。

20

【 0 3 2 8 】

いくつかの実施形態では、バリエーション P D - L 2 であるか、またはそれを含む提供される膜貫通型免疫調節タンパク質は、S E Q I D N O : 2 1 6 に対して少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、記載される少なくとも 1 つの親和性改変 P D - L 2 I g S F ドメインを含むエクトドメイン及び膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、表 1 に記載のいずれかを含む、記載される I g S F ドメイン（例えば、I g V ドメイン）に任意の 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含有する。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、記載される細胞質ドメインをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、シグナルペプチドをさらに含有することができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、例えば S E Q I D N O : 4 に記載のアミノ酸配列に含有される、野生型 I g S F メンバーの天然シグナルペプチドである（例えば、表 2 を参照のこと）。

30

【 0 3 2 9 】

また、膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸分子も提供される。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸分子は、S E Q I D N O : 2 1 6 に対して少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列をコードするヌクレオチド配列を含み、記載される少なくとも 1 つの親和性改変 I g S F ドメインを含むエクトドメイン、膜貫通ドメイン、及び任意で細胞質ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、シグナルペプチドをコードするヌクレオチドの配列をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、対応する野生型 I g S F メンバーの天然シグナルペプチドである（例えば、表 2 を参照のこと）。

40

【 0 3 3 0 】

いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインが、少なくとも 1 つの I T A M （免疫受容体チロシン活性化モチーフ）含有シグナル伝達ドメインを含

50

む細胞質シグナル伝達ドメインを含む、CAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質が提供される。ITAMは、T細胞受容体シグナルトランスダクションに關与するCD3-鎖(「CD3-z」)を含む、免疫細胞のシグナルトランスダクションに關与する多数のタンパク質シグナル伝達ドメインに見いだされる保存モチーフである。いくつかの実施形態では、エンドドメインは、CD3-シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD3-シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 243に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 243に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%を示し、かつT細胞シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインは、T細胞の免疫調節応答をさらに調節する共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、ICOS、41BBまたはOX40である。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、SEQ ID NO: 1213~1216のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 1213~1216に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%を示すアミノ酸の配列を含み、かつT細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持する。いくつかの実施形態では、提供されるCAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質は、同族結合パートナーまたはカウンター構造体への親和性改変IgSFドメインの結合によってT細胞シグナル伝達を刺激する、CARの特徴を有する。いくつかの実施形態では、親和性改変IgSFドメインによるそのカウンター構造体への特異的結合によって、細胞傷害性、増殖またはサイトカイン産生の変化によって反映されるとおり、T細胞活性の免疫活性の変化をもたらすことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0331】

いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、細胞質シグナル伝達を媒介することができるエンドドメインを含有しない。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、野生型または非改変ポリペプチドのシグナルトランスダクション機序を欠いており、したがって、それ自体は細胞シグナル伝達を誘導しない。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、対応する野生型または非改変ポリペプチドの細胞内(細胞質)ドメインまたは該細胞内ドメインの一部、例えばSEQ ID NO: 4に記載のアミノ酸配列に含有される細胞質シグナル伝達ドメインを欠いている(表2を参照のこと)。いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、例えばIgSFファミリーの阻害性受容体(例えば、PD-1またはTIGIT)を含む特定の阻害性受容体に含有されるITIM(免疫受容体チロシン阻害性モチーフ)を含有しない。したがって、いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質は、エクドドメイン及び膜貫通ドメイン(例えば、記載のとおり)のみを含有する。

#### 【0332】

##### 2. 分泌型免疫調節タンパク質及び操作された細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるアミノ酸変異のいずれか1つまたは複数を含むPD-L2バリエーション免疫調節ポリペプチドは、例えば細胞で発現する際に分泌可能である。そのようなバリエーションPD-L2免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2免疫調節タンパク質は、半減期延長部分(例えば、Fcドメインまたは多量体化ドメイン)にコンジュゲートされない。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2免疫調節タンパク質は、ドメインを細胞外に出すシグナルペプチド、例えば抗体シグナルペプチドまたは他の有効なシグナル配列を含む。免疫調節タンパク質がシグナルペプチドを含み、操作された細胞によって発現される場合、該シグナルペプチドは、免疫調節タンパク質が操作された細胞によって分泌されるようにする。一般的に、シグナルペプチド、または該シグナルペプチドの一部は、分泌と共に免疫調節タンパク質から切断される。免疫調節タンパク質は、核酸(発

現ベクターの一部であることができる)によってコードされることができる。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、細胞(例えば免疫細胞、例えば初代免疫細胞)によって発現及び分泌される。

【0333】

したがって、いくつかの実施形態では、シグナルペプチドをさらに含むバリエーションPD-L2免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドをコードする分泌配列に機能的に接続されたバリエーションPD-L2免疫調節タンパク質をコードする核酸分子が本明細書において提供される。

【0334】

シグナルペプチドは、細胞からの免疫調節タンパク質の分泌を合図する免疫調節タンパク質のN末端上の配列である。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、約5~約40アミノ酸長(例えば、約5~約7、約7~約10、約10~約15、約15~約20、約20~約25、または約25~約30、約30~約35、または約35~約40アミノ酸長)である。

【0335】

いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、対応する野生型PD-L2由来の天然シグナルペプチドである(表2を参照のこと)。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、非天然シグナルペプチドである。例えば、いくつかの実施形態では、非天然シグナルペプチドは、対応する野生型PD-L2由来の変異した天然シグナルペプチドであり、かつ、1つまたは複数(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10またはそれ以上)の置換、挿入、または欠失を含むことができる。いくつかの実施形態では、非天然シグナルペプチドは、野生型IgSFファミリーメンバーと同じIgSFファミリー由来のファミリーメンバーのシグナルペプチドまたはその変異体である。いくつかの実施形態では、非天然シグナルペプチドは、野生型IgSFファミリーメンバーとは異なるIgSFファミリー由来のIgSFファミリーメンバー由来のシグナルペプチドまたはその変異体である。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、非IgSFタンパク質ファミリー由来のシグナルペプチドまたはその変異体、例えば免疫グロブリン(例えば、IgG重鎖またはIgG軽鎖)、サイトカイン(例えば、インターロイキン-2(IL-2)、またはCD33)、血清アルブミンタンパク質(例えば、HSAまたはアルブミン)、ヒトアズロシジンプレタンパク質シグナル配列、ルシフェラーゼ、トリプシノーゲン(例えば、キモトリプシノーゲンまたはトリプシノーゲン)由来のシグナルペプチド、または細胞からタンパク質を効率的に分泌することができる他のシグナルペプチドである。例示的なシグナルペプチドは、表9に記載のいずれかを含む。

【0336】

(表9)例示的なシグナルペプチド

10

20

30

SEQ ID NO	シグナルペプチド	ペプチド配列
SEQ ID NO: 245	HSAシグナルペプチド	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 246	Ig κ 軽鎖	MDMRAPAGIFGFLLVLPFGYRS
SEQ ID NO: 247	ヒトアズロジジンプレタンパク質シグナル配列	MTRLTLVALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 248	IgG 重鎖シグナルペプチド	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 249	IgG 重鎖シグナルペプチド	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 250	IgG 重鎖シグナルペプチド	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS
SEQ ID NO: 251	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 252	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDWTWRFLFVVAATGVQS
SEQ ID NO: 253	IgG 重鎖シグナルペプチド	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 254	IgG 重鎖シグナルペプチド	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 255	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAAPRWVLS
SEQ ID NO: 256	IgG κ 軽鎖シグナル配列:	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC
SEQ ID NO: 257	IgG κ 軽鎖シグナル配列:	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO: 258	ガウシアルシフェラーゼ	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 259	ヒトアルブミン	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 260	ヒトキモトリプシノーゲン	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 261	ヒトインターロイキン2	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO: 262	ヒトトリプシノーゲン2	MNLLLILTFVAAAVA

10

20

## 【 0 3 3 7 】

分泌可能なバリエーション PD - L 2 免疫調節タンパク質のいくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、発現された際にシグナルペプチドを含み、そしてシグナルペプチド（またはその一部分）は、分泌によって免疫調節タンパク質から切断される。

## 【 0 3 3 8 】

いくつかの実施形態では、操作された細胞は、細胞から分泌されるバリエーション PD - L 2 ポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、そのようなバリエーション PD - L 2 ポリペプチドは、分泌のためのシグナル配列の操作可能な制御下で、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子によってコードされる。いくつかの実施形態では、コードされる免疫調節タンパク質は、細胞から発現された際に分泌される。いくつかの実施形態では、核酸分子によってコードされる免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインを含まない。いくつかの実施形態では、核酸分子によってコードされる免疫調節タンパク質は、半減期延長部分（例えば、Fcドメインまたは多量体化ドメイン）を含まない。いくつかの実施形態では、核酸分子によってコードされる免疫調節タンパク質は、シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本発明の核酸は、免疫調節タンパク質をコードする核酸に作動可能に連結された分泌性またはシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、それにより免疫調節タンパク質の分泌が可能となる。

30

## 【 0 3 3 9 】

## 3. 細胞及び細胞の操作

提供される免疫調節ポリペプチドのいずれかを発現する操作された細胞が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、それらの表面上に、提供される膜貫通型免疫調節ポリペプチドのいずれかを発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、免疫調節タンパク質を発現して、タンパク質の分泌に好適な条件下で細胞から分泌可能であるか、または分泌することができる。いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質は、リンパ球、例えば腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、T細胞もしくはNK細胞上または中で、または骨髄系細胞上で発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、抗原提示細胞（APC）である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、改変された哺乳動物T細胞または改変された哺乳動物抗原提示細胞（APC）である。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞またはAPCは、ヒトまたはネズミ細胞である。

40

50

## 【0340】

いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、限定されないが、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞（あるいは、細胞傷害性Tリンパ球またはCTL）、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、メモリーT細胞、またはT細胞を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、CD4+またはCD8+である。

## 【0341】

いくつかの実施形態では、操作されたAPCは、例えば、MHC I Iを発現するAPC、例えばマクロファージ、B細胞、及び樹状細胞、ならびに細胞及び無細胞（例えば、生分解性高分子微粒子）a APCの両方を含む人工APC（a APC）を含む。人工APC（a APC）は、これらが抗原をT細胞に提示し、それらを活性化するという点でAPCと類似の様式で作用することができる、APCの合成バージョンである。抗原提示は、MHC（クラスIまたはクラスII）によって実施される。いくつかの実施形態では、a APCのような操作されたAPCでは、MHC上に負荷される抗原は、いくつかの実施形態では、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原である。MHC上に負荷される抗原は、場合によっては、PD-1、または本明細書において提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドによって認識される他の分子を発現することができる、T細胞のT細胞受容体（TCR）によって認識される。a APCを操作するために使用することができる材料は、ポリグリコール酸、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）、酸化鉄、リポソーム、脂質二重層、セファロース、及びポリスチレンが挙げられる。

10

## 【0342】

いくつかの実施形態では、養子細胞療法で使用されるTIP及びTCR作動物質を含有するように操作することができる。いくつかの実施形態では、細胞のa APCは、例えば患者への再導入のために、投与前などに、ヒトT細胞のex vivo増殖に使用されるTIP及びTCR作動物質を含有するように操作することができる。いくつかの態様では、a APCは、例えばOKT3及び/またはUCHL1などの少なくとも1つの抗CD3抗体クローンの発現を含み得る。いくつかの態様では、a APCは不活性化（例えば照射された）されていてもよい。いくつかの実施形態では、TIPは、T細胞上の同族結合パートナーに対して結合親和性を示す任意のバリエーションIgSFドメインを含むことができる。

20

## 【0343】

いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質または分泌可能な免疫調節タンパク質などの本明細書で提供される免疫調節タンパク質は、共発現または操作されて、抗原結合受容体、例えば組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）を発現する細胞になる。いくつかの実施形態では、操作された細胞、例えば操作されたT細胞は、がん、炎症性及び自己免疫性障害、またはウイルス感染に関連する所望の抗原を認識する。特定の実施形態では、抗原結合受容体は、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原などの抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン（例えばscFv）を含むCAR（キメラ抗原受容体）T細胞である。いくつかの実施形態では、TIPタンパク質は、操作されたT細胞受容体細胞または操作されたキメラ抗原受容体細胞で発現する。かかる実施形態では、操作された細胞はTIPとCARまたはTCRを共発現する。いくつかの実施形態では、SIPタンパク質は、操作されたT細胞受容体細胞または操作されたキメラ抗原受容体細胞で発現する。かかる実施形態では、操作された細胞はSIPとCARまたはTCRを共発現する。

30

40

## 【0344】

いくつかの実施形態では、SIPタンパク質は、操作されたT細胞受容体細胞または操作されたキメラ抗原受容体細胞で発現する。かかる実施形態では、操作された細胞はSIPとCARまたはTCRを共発現する。

## 【0345】

キメラ抗原受容体（CAR）は、抗原結合ドメイン（エクトドメイン）、膜貫通ドメイ

50

ン、及び抗原の結合後にT細胞への活性化シグナルを誘導または媒介できる細胞内シグナル伝達領域（エンドドメイン）を含む組換え受容体である。いくつかの実施例では、CAR発現細胞は、活性化ドメイン、及び場合によっては共刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達部分に連結された特定の腫瘍抗原に対して特異性を有する細胞外単鎖可変断片（scFv）を発現するように操作される。共刺激ドメインは、例えば、CD28、OX-40、4-1BB/CD137、誘導性T細胞共刺激因子（ICOS）に由来し得、活性化ドメインは、例えばCD3、例えばCD3、 、 、 などに由来し得る。特定の実施形態では、CARは、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の共刺激ドメインを持つように設計される。CAR scFvは、疾患または状態に関連する細胞、例えば腫瘍抗原、例えばCD19などで発現する抗原を標的とするように設計することができ、これはB細胞系の細胞（NHL、CLL、及び非T細胞ALLを含むがこれらに限定されない全ての正常なB細胞及びB細胞悪性腫瘍を含む）によって発現される膜貫通型タンパク質である。例示的なCAR+T細胞療法及び構築物は、米国特許公開第2013/0287748号、第2014/0227237号、第2014/0099309号、及び第2014/0050708号に記載されており、これらの参考文献はその全体が参照により組み込まれる。

10

#### 【0346】

いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片、例えば単鎖断片（scFv）である。いくつかの実施形態では、抗原は、腫瘍またはがん細胞で発現する。抗原の例はCD19である。CARの例は、抗CD19 CAR、例えばSEQ ID NO: 1163またはSEQ ID NO: 1174に記載の抗CD19 scFvを含有するCARである。いくつかの実施形態では、CARは、スペーサー、膜貫通ドメイン、及びITAMシグナル伝達ドメイン、例えばCD3シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインまたは領域をさらに含有する。いくつかの実施形態では、CARは、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサー及び膜貫通ドメインは、CD8に由来するヒンジ及び膜貫通ドメインであり、例えば、SEQ ID NO: 266、1212、2022に記載の例示的な配列またはSEQ ID NO: 266、1212、2022に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、エンドドメインは、CD3シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD3シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 243に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 243に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつT細胞シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、CARのエンドドメインは、T細胞の免疫調節応答をさらに調節する共刺激シグナル伝達ドメインまたは領域をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、共刺激領域であるか、またはそれを含むか、またはCD28、ICOS、4-1BBもしくはOX40の共刺激領域に由来する。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、SEQ ID NO: 1213~1216のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 1213~1216に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつT細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持する。

20

30

40

#### 【0347】

いくつかの実施形態では、CARをコードする構築物は、自己切断ペプチド配列によってCARから分離されたマーカー、例えば検出可能なタンパク質などの第2のタンパク質をさらにコードする。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチド配列は、F2A、T2

50

A、E2A、またはP2A自己切断ペプチドである。T2A自己切断ペプチドの例示的な配列は、SEQ ID NO: 1217、1225もしくは2029のいずれか1つ、またはSEQ ID NO: 1217、1225もしくは2029のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列に記載される。いくつかの実施形態では、T2Aは、SEQ ID NO: 1255に記載のヌクレオチド配列、またはSEQ ID NO: 1255のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示す配列によってコードされる。P2A自己切断ペプチドの例示的な配列は、SEQ ID NO: 2038、またはSEQ ID NO: 2038に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列において設定される。場合によっては、核酸構築物は2つ以上のP2A自己切断ペプチド(例えばP2A1及びP2A2)をコードし、ヌクレオチド配列P2A1及びP2A2はそれぞれSEQ ID NO: 2038に記載のP2Aをコードし、該ヌクレオチド配列は配列間の組換えを避けるため異なってもよい。

10

**【0348】**

いくつかの実施形態では、マーカーは、蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)または青色蛍光タンパク質(BFP)などの検出可能なタンパク質である。蛍光タンパク質マーカーの例示的な配列は、SEQ ID NO: 1218、2028もしくは2035~2037、またはSEQ ID NO: 1218、2028もしくは2035~2037に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列に記載されている。

20

**【0349】**

いくつかの実施形態では、CARは、SEQ ID NO: 1208、1219、1220、1221、2023、2024、2026もしくは2027のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 1208、1219、1220、1221、2023、2024、2026もしくは2027のいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、CARは、SEQ ID NO: 1223もしくは2025に記載のヌクレオチド配列、またはSEQ ID NO: 1223もしくは2025のいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列によってコードされる。

30

**【0350】**

別の実施形態では、操作されたT細胞は、組換えまたは操作されたTCRを含むTCRを有する。いくつかの実施形態では、TCRは、天然TCRであることができる。当業者は、一般的に天然の哺乳動物T細胞受容体が、抗原特異的認識及び結合に参与する及び鎖(または及び鎖)を含むことを認識するだろう。いくつかの実施形態では、TCRは、改変されている操作されたTCRである。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞のTCRは、APCによって提示された腫瘍関連または腫瘍特異的抗原に特異的に結合する。

40

**【0351】**

いくつかの実施形態では、免疫調節ポリペプチド、例えば膜貫通型免疫調節ポリペプチドまたは分泌可能な免疫調節ポリペプチドを、組換え宿主細胞に採用されるもののような多種多様な方法によって、操作された細胞、例えば操作されたT細胞または操作されたA

50

PCに組み込むことができる。DNA構築物を初代T細胞に導入するための多種多様な方法が当技術分野において公知である。いくつかの実施形態では、ウイルス形質導入またはプラスミドエレクトロポレーションが採用される。典型的な実施形態では、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子、または発現ベクターは、発現された膜貫通型免疫調節タンパク質を細胞膜に局在化させるかまたは分泌のためのシグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本発明の膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸は、ウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターにサブクロニングされ、これにより宿主哺乳動物細胞での発現が可能になる。発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入することができ、宿主細胞培養条件下で、免疫調節タンパク質が表面上で発現するかまたは分泌される。

#### 【0352】

例示的な例では、初代T細胞を、*ex vivo*で精製して(CD4細胞またはCD8細胞または両方)、様々なTCR/CD28作動物質、例えば抗CD3/抗CD28コートピースからなる活性化プロトコルで刺激することができる。2または3日の活性化プロセス後、免疫調節ポリペプチドを含有する組換え発現ベクターを、当技術分野で標準的なレンチウイルスもしくはレトロウイルス形質導入プロトコルまたはプラスミドエレクトロポレーション法により、初代T細胞に安定的に導入することができる。細胞を、例えば、天然親分子、及びバリエーションPD-L2を含むポリペプチドと交差反応する抗エピトープタグまたは抗体を使用するフローサイトメトリーによって、免疫調節ポリペプチド発現についてモニタリングすることができる。免疫調節ポリペプチドを発現するT細胞を、用途に応じて、抗エピトープタグ抗体を用いたソーティングにより濃縮することも、高または低発現のために濃縮することもできる。

#### 【0353】

免疫調節ポリペプチドが発現されると、操作されたT細胞を多種多様な手段によって、適切な機能についてアッセイすることができる。操作されたCARまたはTCR共発現を検証して、操作されたT細胞のこの部分が免疫調節タンパク質の発現による影響をほとんど受けなかったことを示すことができる。検証すると、標準的な*in vitro*細胞傷害性、増殖、またはサイトカインアッセイ(例えば、IFN- $\gamma$ 発現)を使用して、操作されたT細胞の機能を評価することができる。例示的な標準エンドポイントは、腫瘍株の溶解率、操作されたT細胞の増殖率、または培養上清中のIFN- $\gamma$ タンパク質発現率である。対照構築物に対して、統計的に有意な腫瘍株の溶解の増加、操作されたT細胞の増殖の増加、またはIFN- $\gamma$ 発現の増加をもたらす操作された構築物を選択することができる。加えて、操作されていない細胞、例えば天然の初代または内在性T細胞を同じ*in vitro*アッセイに組み込んで、操作された細胞、例えば操作されたT細胞上で発現する免疫調節ポリペプチド構築物の、活性を調節する(いくつかの場合では、バスタンダー天然T細胞におけるエフェクター機能を活性化及び生成することを含む)能力を測定することもできる。活性化マーカー、例えばCD69、CD44、またはCD62Lの増加した発現を内在性T細胞上でモニタリングすることもでき、増加した増殖及び/またはサイトカイン産生は、改変されたT細胞上で発現する免疫調節タンパク質の所望の活性を示すこともできる。

#### 【0354】

いくつかの実施形態では、類似のアッセイを使用して、CARまたはTCR単独を含有する操作されたT細胞の機能を、CARまたはTCR及びTIP構築物を含有するものと比較することができる。典型的には、これらの*in vitro*アッセイは、様々な比率の操作されたT細胞及び同族CARまたはTCR抗原を含有する「腫瘍」細胞株と一緒に培養下でプレティングすることによって実施される。標準エンドポイントは、腫瘍株の溶解率、操作されたT細胞の増殖率、または培養上清中のIFN- $\gamma$ 産生率である。同じTCRまたはCAR構築物単独に対して、統計的に有意な腫瘍株の溶解の増加、操作されたT細胞の増殖の増加、またはIFN- $\gamma$ 産生の増加をもたらした操作された免疫調節タンパク質を選択することができる。操作されたヒトT細胞を、マウスのT細胞、NK細胞及びB細胞を欠いているNSG系統のような免疫不全マウスで分析することができる。C

10

20

30

40

50

A RまたはT C Rが異種移植片上の標的カウンター構造体に結合しかつT I Pの親和性改変I g S Fドメインと共発現する操作されたヒトT細胞を、異種移植片と比較して異なる細胞数及び比率にて*in vivo*で養子移入することができる。例えば、ルシフェラーゼ/G F Pベクターを含有するC D 1 9 +白血球腫瘍株の生着を、生物発光によりまたは*ex vivo*でフローサイトメトリーによってモニタリングすることができる。ある共通の実施形態では、異種移植片がネズミモデルに導入され、続いて数日後に操作されたT細胞が導入される。免疫調節タンパク質を含有する操作されたT細胞を、C A RまたはT C R単独を含有する操作されたT細胞と比べて、増加した生存、腫瘍クリアランス、または操作されたT細胞の増殖数についてアッセイすることができる。*in vitro*アッセイと同様に、内在性の天然(すなわち、操作されていない)ヒトT細胞を共養子移入して、その集団において、より良好な生存または腫瘍クリアランスをもたらすエピトープ拡大の成功を予測することができる。

10

## 【0355】

E. バリエーションポリペプチド及び免疫調節タンパク質を発現する感染性物質

また、本明細書に記載の分泌可能な免疫調節タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばP D - L 2 v I g Dポリペプチドのいずれかをコードする核酸を含有する感染性物質も提供される。いくつかの実施形態では、そのような感染性物質は、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチド、例えばP D - L 2 v I g Dポリペプチドをコードする核酸を、対象の標的細胞、例えば対象の免疫細胞及び/または抗原提示細胞(A P C)または腫瘍細胞に送達することができる。また、そのような感染性物質に含有される核酸、及び/または、そのような感染性物質の生成もしくは改変のための核酸、例えばベクター及び/またはプラスミド、ならびにそのような感染性物質を含有する組成物が提供される。

20

## 【0356】

いくつかの実施形態では、感染性物質は、微生物または病原菌である。いくつかの実施形態では、感染性物質は、ウイルスまたは細菌である。いくつかの実施形態では、感染性物質は、ウイルスである。いくつかの実施形態では、感染性物質は、細菌である。いくつかの実施形態では、そのような感染性物質は、本明細書に記載の分泌可能な免疫調節タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばP D - L 2 v I g Dポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を送達することができる。したがって、いくつかの実施形態では、感染性物質に感染されるまたは接触される対象の細胞は、バリエーション免疫調節ポリペプチドを細胞表面上で発現させるかまたは分泌させることができる。いくつかの実施形態では、感染性物質はまた、1つまたは複数の他の治療薬または他の治療薬をコードする核酸を対象内の細胞及び/または環境に送達することもできる。いくつかの実施形態では、感染性物質によって送達されることができる他の治療薬は、サイトカインまたは他の免疫調節分子を含む。

30

## 【0357】

いくつかの実施形態では、感染性物質、例えば、ウイルスまたは細菌は、本明細書に記載の分泌可能な免疫調節タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばP D - L 2 v I g Dポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を含有し、対象の細胞の接触及び/または感染によって、該細胞は、感染性物質に含有される核酸配列によってコードされた分泌可能な免疫調節タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばP D - L 2 v I g Dポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、感染性物質を対象に投与することができる。いくつかの実施形態では、感染性物質を対象由来の細胞と*ex vivo*で接触させることができる。

40

## 【0358】

いくつかの実施形態では、感染性物質によって感染された細胞によって発現する膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばP D - L 2 v I g Dポリペプチドは、膜貫通型タンパク質であり、表面で発現する。いくつかの実施形態では、感

50

染性物質によって感染された細胞によって発現される分泌可能な免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばPD-L2 vIgDポリペプチドは、細胞から発現されかつ分泌される。膜貫通型免疫調節タンパク質または分泌型免疫調節タンパク質は、本明細書に記載のいずれかであることができる。

#### 【0359】

いくつかの実施形態では、感染性物質によって標的とされる対象の細胞は、腫瘍細胞、免疫細胞、及び/または抗原提示細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、感染性物質は、腫瘍微小環境（TME）にある細胞を標的とする。いくつかの実施形態では、感染性物質は、分泌可能な免疫調節タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばPD-L2 vIgDポリペプチドをコードする核酸を、適切な細胞（例えば、APC、例えばペプチド/MHC複合体をその細胞表面上に提示する細胞、例えば樹状細胞）または組織（例えば、リンパ組織）に送達し、それにより、所望の効果、例えば免疫調節及び/または特異的な細胞媒介性免疫応答、例えばCD4及び/またはCD8 T細胞応答を誘導する及び/または増強させ、そのCD8 T細胞応答は、細胞傷害性T細胞（CTL）応答を含み得る。いくつかの実施形態では、感染性物質は、APC、例えば樹状細胞（DC）を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の感染性物質によって送達される核酸分子は、特定の標的細胞において、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切な核酸配列、例えば、調節エレメント、例えばプロモーターを含む。

10

#### 【0360】

いくつかの実施形態では、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸配列を含有する感染性物質はまた、1つまたは複数の追加の遺伝子産物、例えば、サイトカイン、プロドラッグ変換酵素、細胞毒素及び/または検出可能遺伝子産物をコードする核酸配列を含有することもできる。例えば、いくつかの実施形態では、感染性物質は、腫瘍溶解性ウイルスであり、該ウイルスは、追加の治療用遺伝子産物をコードする核酸配列を含むことができる（例えば、Kirn et al., (2009) Nat Rev Cancer 9: 64-71; Garcia-Aragoncillo et al., (2010) Curr Opin Mol Ther 12: 403-411を参照のこと；米国特許第7,588,767号、第7,588,771号、第7,662,398号及び第7,754,221号、ならびに米国特許出願公開第2007/0202572号、第2007/0212727号、第2010/0062016号、第2009/0098529号、第2009/0053244号、第2009/0155287号、第2009/0117034号、第2010/0233078号、第2009/0162288号、第2010/0196325号、第2009/0136917号及び第2011/0064650号を参照のこと。いくつかの実施形態では、追加の遺伝子産物は、標的細胞（例えば、腫瘍細胞）の死をもたらすことができる治療用遺伝子産物、または免疫応答を増強もしくは強化もしくは調節できる遺伝子産物（例えば、サイトカイン）であることができる。例示的な遺伝子産物はまた、抗がん剤、抗転移剤、抗血管新生剤、免疫調節分子、免疫チェックポイント阻害剤、抗体、サイトカイン、成長因子、抗原、細胞傷害性遺伝子産物、プロアポトーシス遺伝子産物、抗アポトーシス遺伝子産物、細胞マトリックス分解性遺伝子、組織再生及びヒト体細胞をリプログラミングして多能性にするための遺伝子、ならびに本明細書に記載のまたは当業者に公知の他の遺伝子の中に含まれる。いくつかの実施形態では、追加の遺伝子産物は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）である。

20

30

40

#### 【0361】

##### 1. ウイルス

いくつかの実施形態では、感染性物質は、ウイルスである。いくつかの実施形態では、感染性物質は、腫瘍溶解性ウイルス、または、特定の細胞、例えば免疫細胞を標的とするウイルスである。いくつかの実施形態では、感染性物質は、対象の腫瘍細胞及び/またはがん細胞を標的とする。いくつかの実施形態では、感染性物質は、免疫細胞または抗原提示細胞（APC）を標的とする。

50

## 【0362】

いくつかの実施形態では、感染性物質は、腫瘍溶解性ウイルスである。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に蓄積しかつ腫瘍細胞において複製するウイルスである。該細胞における複製、及び本明細書に記載のパリアントPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドをコードする核酸の任意の送達によって、腫瘍細胞は溶解され、腫瘍は縮小し、排除されることができる。腫瘍溶解性ウイルスは、広範な宿主及び細胞タイプの範囲を有することができる。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍及び/または転移を含み、かつ創傷組織及び細胞も含む、免疫特権を有する細胞または免疫特権を有する組織に蓄積し、これにより本明細書に記載のパリアント免疫調節ポリペプチドをコードする核酸の、広範な細胞タイプにおける送達及び発現が可能となる。腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍細胞特異的に複製することもでき、その結果、腫瘍細胞溶解及び効率的な腫瘍退縮をもたらすことができる。

10

## 【0363】

例示的な腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口腔ウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パルボウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、コクサッキーウイルス及びワクシニアウイルスが挙げられる。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、他の臓器に感染することなく固体腫瘍に特異的に定着することができ、感染性物質として使用して、本明細書に記載のパリアント免疫調節ポリペプチドをコードする核酸をそのような固体腫瘍に送達することができる。

20

## 【0364】

本明細書に記載のパリアントPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドをコードする核酸の送達に使用するための腫瘍溶解性ウイルスは、当業者に公知のものいずれかであることができ、例えば、水疱性口内炎ウイルス(例えば、米国特許第7,731,974号、第7,153,510号、第6,653,103号、及び米国特許出願公開第2010/0178684号、第2010/0172877号、第2010/0113567号、第2007/0098743号、第20050260601号、第20050220818号、及び欧州特許第1385466号、第1606411号及び第1520175号を参照のこと)；単純ヘルペスウイルス(例えば、米国特許第7,897,146号、第7,731,952号、第7,550,296号、第7,537,924号、第6,723,316号、第6,428,968号、及び米国特許出願公開第2014/0154216号、第2011/0177032号、第2011/0158948号、第2010/0092515号、第2009/0274728号、第2009/0285860号、第2009/0215147号、第2009/0010889号、第2007/0110720号、第2006/0039894号、第2004/0009604号、第2004/0063094号、国際特許公開WO2007/052029、WO1999/038955を参照のこと)；レトロウイルス(例えば、米国特許第6,689,871号、第6,635,472号、第5,851,529号、第5,716,826号、第5,716,613号及び米国特許出願公開第20110212530号を参照のこと)；ワクシニアウイルス(例えば、2016/0339066号を参照のこと)、及びアデノ随伴ウイルス(例えば、米国特許第8,007,780号、第7,968,340号、第7,943,374号、第7,906,111号、第7,927,585号、第7,811,814号、第7,662,627号、第7,241,447号、第7,238,526号、第7,172,893号、第7,033,826号、第7,001,765号、第6,897,045号、及び第6,632,670号を参照のこと)が挙げられる。

30

40

## 【0365】

腫瘍溶解性ウイルスはまた、それらの病原性を減弱し、それらの安全性プロファイルを改善し、それらの腫瘍特異性を増強するように遺伝子が増えられたウイルスを含み、そして、これらはまた、ウイルスの有効性を改善する追加の遺伝子、例えば細胞毒素、サイトカイン、プロドラッグ変換酵素を備えている(例えば、Kirn et al., (

50

2009) Nat Rev Cancer 9:64-71; Garcia-Arago ncillo et al., (2010) Curr Opin Mol Ther 12:403-411を参照のこと; 米国特許第7,588,767号、第7,588,771号、第7,662,398号及び第7,754,221号、ならびに米国特許出願公開第2007/0202572号、第2007/0212727号、第2010/0062016号、第2009/0098529号、第2009/0053244号、第2009/0155287号、第2009/0117034号、第2010/0233078号、第2009/0162288号、第2010/0196325号、第2009/0136917号及び第2011/0064650号を参照のこと)。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、がん性細胞において選択的に複製するように改変されているもの、したがって腫瘍溶解性である、ウイルスであることができる。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍治療のため、及びまた遺伝子治療ベクターとして、改変された指向性を有するように操作されているアデノウイルスである。その例は、ONYX-015、H101及びAd5 CR (Hallden and Portella (2012) Expert Opin Ther Targets, 16:945-58)及びTNFerade (McLoughlin et al. (2005) Ann. Surg. Oncol., 12:825-30)、または制限増殖型アデノウイルスOncorine (登録商標)である。

10

## 【0366】

いくつかの実施形態では、感染性物質は、改変された単純ヘルペスウイルスである。いくつかの実施形態では、感染性物質は、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチドのいずれか、例えば本明細書に記載のバリエーションPD-L2または免疫調節ポリペプチドをコードする核酸を含有するように改変された、タリモジーン・ラハープレベック (T-Vec、ImlygicまたはOncovex GM-CSFとしても公知)の改変されたバージョンである。いくつかの実施形態では、感染性物質は、例えば、WO2007/052029、WO1999/038955、US2004/0063094、US2014/0154216に記載されている改変された単純ヘルペスウイルス、またはそのバリエーションである。

20

## 【0367】

いくつかの実施形態では、感染性物質は、ウイルスが投与される対象において特定タイプの細胞を標的とするウイルス、例えば免疫細胞または抗原提示細胞 (APC) を標的とするウイルスである。樹状細胞 (DC) は、免疫応答の開始及び制御に必須のAPCである。DCは、抗原を捕捉及びプロセッシングすることができ、末梢からリンパ系臓器へ遊走し、抗原を静止T細胞に主要組織適合複合体 (MHC) 拘束様式で提示することができる。いくつかの実施形態では、感染性物質は、DCを特異的に標的としてDCにおける発現のためにバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドをコードする核酸を送達できるウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、レンチウイルスまたはそのバリエーションもしくは誘導体、例えば組み込み欠損型レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、細胞表面マーカーである樹状細胞特異的細胞間接着分子-3-捕捉ノンインテグリン (DC-SIGN) を発現する細胞、例えばDCに効率的に結合して生産的に感染するようシュードタイプ化されたレンチウイルスである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、シンドビスウイルスE2糖タンパク質またはその改変された形態でシュードタイプ化されたレンチウイルス、例えばWO2013/149167に記載されているものである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、関心対象の配列 (例えば、本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドのいずれかをコードする核酸) のDCへの送達及び発現を可能にする。いくつかの実施形態では、ウイルスは、WO2008/011636またはUS2011/0064763、Tareen et al. (2014) Mol. Ther., 22:575-587に記載されているもの、またはそのバリエーションを含む。樹状細胞指向性ベクタープラットフォームの例は、ZVex (商標) である。

30

40

50

## 【0368】

## 2. 細菌

いくつかの実施形態では、感染性物質は、細菌である。例えば、いくつかの実施形態では、細菌は、本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドのいずれかをコードする核酸を、対象の標的細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞、抗原提示細胞及び/または貪食細胞に送達することができる。いくつかの実施形態では、細菌は、バリエーション免疫調節ポリペプチドの発現及び/または分泌のため、及び/または、バリエーション免疫調節ポリペプチドの発現のための環境において特定の細胞を標的とするため、対象内の特定の環境、例えば腫瘍微小環境(TME)に優先的に標的とされることができる。

10

## 【0369】

いくつかの実施形態では、細菌は、哺乳動物細胞へのプラスミドDNAの細菌媒介性移送(「バクトフェクション」とも称される)を介して核酸を細胞に送達する。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝物質の送達は、細菌全体の標的細胞への侵入により達成される。いくつかの実施形態では、自発的なまたは誘導された溶菌が、その後の真核細胞発現のためのプラスミドの放出をもたらすことができる。いくつかの実施形態では、細菌は、非貪食哺乳動物細胞(例えば、腫瘍細胞)及び/または貪食細胞、例えば、特定の免疫細胞及び/またはAPCに、核酸を送達することができる。いくつかの実施形態では、細菌によって送達される核酸を、発現のために対象の細胞の核に移すことができる。いくつかの実施形態では、核酸はまた、特定の宿主細胞において、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする作動可能に連結された配列の発現に必要な適切な核酸配列、例えば、調節エレメント、例えばプロモーターまたはエンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、細菌である感染性物質は、免疫調節タンパク質をコードする核酸を、標的細胞の機構により翻訳のために標的細胞の細胞質に送達されるRNA、例えば予め作製された翻訳能力のあるRNAの形態で送達することができる。

20

## 【0370】

いくつかの実施形態では、細菌は、標的細胞、例えば腫瘍細胞を複製し、溶解することができる。いくつかの実施形態では、細菌は、標的細胞の細胞質で核酸配列及び/または遺伝子産物を含む及び/または放出することができ、それにより、標的細胞、例えば腫瘍細胞を殺傷することができる。いくつかの実施形態では、感染性物質は、対象の特定の環境、例えば、腫瘍微小環境(TME)で特異的に複製することができる細菌である。例えば、いくつかの実施形態では、細菌は、嫌気性または低酸素微小環境で特異的に複製することができる。いくつかの実施形態では、特定の環境に存在する条件または因子、例えばTMEにおいて細胞によって産生されるアスパラギン酸、セリン、クエン酸、リボースまたはガラクトースは、細菌を該環境に誘引する化学誘引物質として作用することができる。いくつかの実施形態では、細菌は、本明細書に記載の免疫調節タンパク質を、環境、例えばTMEにおいて、発現及び/または分泌することができる。

30

## 【0371】

いくつかの実施形態では、感染性物質は、Listeria属、Bifidobacterium属、Escherichia属、Clostridium属、Salmonella属、Shigella属、Vibrio属、またはYersinia属である細菌である。いくつかの実施形態では、細菌は、Listeria monocytogenes、Salmonella typhimurium、Salmonella choleraesuis、Escherichia coli、Vibrio cholera、Clostridium perfringens、Clostridium butyricum、Clostridium novyi、Clostridium acetobutylicum、Bifidobacterium infantis、Bifidobacterium longum及びBifidobacterium adolescentisの1つまたは複数の中から選択される。いくつかの実施形態では、細菌は、操作された細菌である。いくつかの実施形態では、細菌は、操作された細菌、

40

50

例えば、Seow and Wood (2009) Molecular Therapy 17 (5) : 767 - 777 ; Baban et al. (2010) Bioengineered Bugs 1 : 6 , 385 - 394 ; Patyar et al. (2010) J Biomed Sci 17 : 21 ; Tangney et al. (2010) Bioengineered Bugs 1 : 4 , 284 - 287 ; van Pijkeren et al. (2010) Hum Gene Ther. 21 (4) : 405 - 416 ; WO2012 / 149364 ; WO2014 / 198002 ; US9103831 ; US9453227 ; US2014 / 0186401 ; US2004 / 0146488 ; US2011 / 0293705 ; US2015 / 0359909 及び EP3020816 に記載されているものである。細菌は、本明細書において提供されるバリエーション免疫調節ポリペプチド、コンジュゲート及び / または融合体のいずれかをコードする核酸配列を送達するように、及び / またはそのようなバリエーション免疫調節ポリペプチドを対象において発現するように、改変されることができる。

10

#### 【0372】

F. ポリペプチドまたは細胞を産生するための核酸、ベクター及び方法

本明細書において提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドの種々の提供される実施形態のいずれかをコードする、単離された核酸または組換え核酸（まとめて「核酸」と称される）が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、後述の全てを含む本明細書において提供される核酸は、本明細書において提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドの組換え産生（例えば、発現）に有用である。いくつかの実施形態では、後述の全てを含む本明細書において提供される核酸は、細胞、例えば操作された細胞、例えば免疫細胞、または感染性物質細胞における、本明細書において提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドの発現に有用である。本明細書において提供される核酸は、RNAの形態またはDNAの形態であることができ、mRNA、cRNA、組換えまたは合成RNA及びDNA、ならびにcDNAを含むことができる。本明細書において提供される核酸は、典型的には、DNA分子、通常二本鎖のDNA分子である。しかしながら、本発明のヌクレオチド配列のうちの一つを含む、一本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、及びハイブリッドDNA/RNA核酸またはその組み合わせも提供される。

20

#### 【0373】

また、本明細書において提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドを産生する際に有用な、組換え発現ベクター及び組換え宿主細胞も本明細書において提供される。

30

#### 【0374】

また、提供される核酸分子またはコードされたバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドのいずれか、例えば膜貫通型免疫調節ポリペプチドまたは分泌可能な免疫調節ポリペプチドのいずれかを含有する、操作された細胞、例えば操作された免疫細胞も本明細書において提供される。

#### 【0375】

また、提供される核酸分子またはコードされたバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドのいずれか、例えば膜貫通型免疫調節ポリペプチドまたは分泌可能な免疫調節ポリペプチドのいずれかを含有する、感染性物質、例えば細菌細胞またはウイルス細胞も本明細書において提供される。

40

#### 【0376】

上に提供される実施形態のいずれかでは、本明細書において提供される免疫調節ポリペプチドをコードする核酸を、組換えDNA及びクローニング技術を使用して細胞に導入することができる。そのようにするために、免疫調節ポリペプチドをコードする組換えDNA分子が調製される。そのようなDNA分子を調製する方法は、当技術分野において周知である。例えば、ペプチドをコードする配列を好適な制限酵素を使用してDNAから切り取ることができる。あるいは、ホスホロアミダイト法のような化学合成技術を使用してD

50

NA分子を合成することができる。また、これらの技術の組み合わせを使用することができる。場合によっては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により組換えまたは合成核酸を生成してもよい。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの親和性改変IgSFドメインと、いくつかの実施形態では、シグナルペプチド、膜貫通ドメイン、及び/またはエンドドメインを含有する1つまたは複数のバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードするDNAインサートを、提供される説明に従って生成することができる。このDNAインサートを、当業者に公知のとおり、適切な形質導入/トランスフェクションベクターにクローニングすることができる。また、該核酸分子を含有する発現ベクターも提供される。

#### 【0377】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、タンパク質の発現に適する条件下で免疫調節タンパク質を適切な細胞において発現することができる。いくつかの態様では、核酸分子または発現ベクターは、適切な発現制御配列に作動可能に連結された免疫調節タンパク質をコードするDNA分子を含む。DNA分子がベクターに挿入される前または後のいずれかに、この機能的連結を達成する方法は周知である。発現制御配列は、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル、及び転写または翻訳の制御に関与する他のシグナルを含む。

#### 【0378】

いくつかの実施形態では、免疫調節タンパク質の発現は、プロモーターまたはエンハンサーによって制御されて、発現を制御または調節する。プロモーターは、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸分子の部分に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的に活性なプロモーター（例えば、組織特異的な構成的に活性なプロモーターまたは他の構成的プロモーター）である。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導物質（例えば、T細胞活性化シグナル）に応答性であり得る誘導性プロモーターである。

#### 【0379】

いくつかの実施形態では、構成的プロモーターは、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸分子に作動可能に連結されている。例示的な構成的プロモーターは、サル空胞ウイルス40（SV40）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ユビキチンC（Ubc）プロモーター、及びEF-1（EF1a）プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、構成的プロモーターは、組織特異的である。例えば、いくつかの実施形態では、プロモーターは、特定の組織、例えば免疫リンパ球、またはT細胞における免疫調節タンパク質の構成的発現を可能にする。例えば、フェトタンパク質、DF3、チロシナーゼ、CEA、界面活性タンパク質、及びErbb2プロモーターを含む、例示的な組織特異的プロモーターが米国特許第5,998,205号に記載されている。

#### 【0380】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、転写の適切な誘導因子の有無を制御することによって核酸の発現が制御可能であるように、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸分子に作動可能に連結されている。例えば、プロモーター及び転写因子発現系、例えば公開されているテトラサイクリン調節系または他の調節可能な系（例えば、公開されている国際PCT出願WO01/30843を参照のこと）であることができる。例示的な調節可能なプロモーター系は、例えばClontech（Pallo Alto, CA）から入手可能なTet-On（及びTet-Off）系である。このプロモーター系は、テトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体、例えばドキシサイクリンによって制御される、導入遺伝子の調節された発現を可能にする。他の調節可能なプロモーター系が公知である（例えば、リガンド結合ドメイン及び転写調節ドメイン、例えばホルモン受容体由来のものを含む）遺伝子スイッチを説明している「Regulation of Gene Expression Using Single

10

20

30

40

50

- Chain, Monomeric, Ligand Dependent Polypeptide Switches」という表題の公開されている米国特許出願第2002-0168714号を参照のこと)。

【0381】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、T細胞活性化シグナル伝達に応答性のエレメントに応答性である。単なる一例として、いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、免疫調節タンパク質、及び免疫調節タンパク質の発現を制御するために作動可能に連結されたプロモーターをコードする発現ベクターを含む。操作されたT細胞を、例えば操作されたT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)によるシグナル伝達によって活性化することができ、それにより応答性プロモーターによる免疫調節タンパク質の発現及び分泌を引き起こすことができる。

10

【0382】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、免疫調節タンパク質が活性化T細胞の核因子(NFAT)または活性化B細胞の核因子 軽鎖エンハンサー(NF-B)に 応答して発現するように、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子に作動可能に連結されている。例えば、いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、NFATまたはNF-Bの結合部位を含む。例えば、いくつかの実施形態では、プロモーターは、NFATもしくはNF-Bプロモーター、またはその機能的バリエーションである。したがって、いくつかの実施形態では、核酸は、免疫調節タンパク質の毒性を低減または排除もしながら、免疫調節タンパク質の発現を制御することを可能にする。具体的には、本発明の核酸を含む操作された免疫細胞は、細胞(例えば、該細胞によって発現されるT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR))が抗原によって特異的に刺激される際、及び/または、細胞(例えば、細胞のカルシウムシグナル伝達経路)が、例えばホルボールミリストアセテート(PMA)/イオノマイシンによって非特異的に刺激される際のみ、免疫調節タンパク質を発現及び分泌する。したがって、免疫調節タンパク質の発現、及び場合によっては分泌を、それが必要な時及び場合にのみ(例えば、感染症惹起物質、がんの存在下、または腫瘍部位で)起こるように制御することができ、それにより望ましくない免疫調節タンパク質相互作用を減少または回避することができる。

20

【0383】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の免疫調節タンパク質をコードする核酸は、NFATプロモーター、NF-Bプロモーター、またはその機能的バリエーションをコードする好適なヌクレオチド配列を含む。「NFATプロモーター」は、本明細書において使用される場合、最小プロモーターに連結された1つまたは複数のNFAT応答性エレメントを意味する。「NF-Bプロモーター」は、最小プロモーターに連結された1つまたは複数のNF-B応答性エレメントを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子の最小プロモーターは、最小ヒトIL-2プロモーターまたはCMVプロモーターである。NFAT応答性エレメントは、例えば、NFAT1、NFAT2、NFAT3、及び/またはNFAT4応答性エレメントを含み得る。NFATプロモーター、NF-Bプロモーター、またはその機能的バリエーションは、任意の数の結合モチーフ、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または最大で12個の結合モチーフを含み得る。

30

40

【0384】

DNA分子をその上に有する得られた組換え発現ベクターを使用して、適切な宿主を形質転換する。当技術分野において周知の方法を使用して、この形質転換を実施することができる。いくつかの実施形態では、本明細書において提供される核酸は、得られる可溶性免疫調節ポリペプチドが培養培地、宿主細胞、または宿主細胞ペリプラズムから回収されるように、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結された分泌型またはシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。他の実施形態では、免疫調節ポリペプチドの膜発現が可能となるように適切な発現制御シグナルが選択される。さ

50

らに、市販のキット及び委託製造会社を利用して、本明細書において提供される操作された細胞または組換え宿主細胞を作製することもできる。

【0385】

いくつかの実施形態では、DNA分子をその上に有する得られた換え発現ベクターを使用して、適切な細胞を形質転換する。導入は、当技術分野において周知の方法を使用して実施することができる。例示的な方法は、ウイルス、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、及びエレクトロポレーションを介することを含む、受容体をコードする核酸の移送のためのものを含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、核酸は、レンチウイルスまたはレトロウイルス形質導入法によって細胞に移送される。

10

【0386】

哺乳動物T細胞またはAPCを含む、多数の公的に入手可能かつ周知の哺乳動物宿主細胞のいずれかを、ポリペプチドまたは操作された細胞の調製に使用することができる。細胞の選択は、当技術分野によって認識される多数の要因に依存する。これらは、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、DNA分子によってコードされたペプチドの毒性、形質転換率、ペプチドの回収の容易さ、発現特性、生物安全性及びコストが含まれる。全ての細胞が特定のDNA配列の発現に等しく有効であるとは限らないという理解をもって、これらの要因のバランスをとらねばならない。

【0387】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、酵母細胞のような多種多様な真核細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞もしくはHEK293細胞のような哺乳動物細胞であることができる。いくつかの実施形態では、宿主細胞は懸濁細胞であり、ポリペプチドは培養浮遊CHO細胞、例えばCHO-S細胞などの培養懸濁液で操作または産生される。いくつかの実施例では、細胞株は、DHFRが欠損している(DHFR-)CHO細胞株、例えばDG44及びDUXB11である。いくつかの実施形態では、細胞は、グルタミンシンターゼ(GS)、例えばCHO-S細胞、CHOK1SV細胞、及びCHOZN((R))GS-/細胞を欠損している。いくつかの実施形態では、CHO細胞、例えば浮遊CHO細胞は、CHO-S-2H2細胞、CHO-S-クローン14細胞、またはExpicho-S細胞であってもよい。

20

【0388】

いくつかの実施形態では、宿主細胞はまた、原核細胞、例えばE.coliであることもできる。形質転換された組換え宿主は、ポリペプチドを発現する条件下で培養され、次いで精製されて可溶性タンパク質を得る。組換え宿主細胞を、所望のポリペプチドを発現するような従来の発酵条件下で培養することができる。そのような発酵条件は、当技術分野において周知である。最後に、本明細書において提供されるポリペプチドを、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及び親和性クロマトグラフィーを含む当技術分野において周知の多数の方法のいずれかによって、組換え細胞培養物から回収及び精製することができる。所望の場合、成熟タンパク質の配置を完了する際にタンパク質のリフォールディングステップを使用することができる。最後に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を最終精製ステップに用いることができる。

30

40

【0389】

いくつかの実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば操作された細胞の調製と関連して上記のいずれかである。いくつかの実施形態では、そのような操作された細胞は、初代細胞である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、対象に対して自家である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、対象に対して同種他家である。いくつかの実施形態では、操作された細胞を、対象から、例えば白血球除去療法によって得て、これを免疫調節ポリペプチド、例えば膜貫通型免疫調節ポリペプチドまたは分泌可能な免疫調節ポリペプチドの発現のためにex vivoで形質転換する。

50

## 【0390】

また、本明細書に記載の感染性物質に含有されるバリエーション免疫調節ポリペプチドのいずれかをコードする核酸も提供される。いくつかの実施形態では、感染性物質は、核酸を対象の細胞に送達し、及び/または細胞においてコードされたバリエーションポリペプチドの発現を可能にする。また、そのような感染性物質を生成する、産生する、または改変するために使用される核酸も提供される。例えば、いくつかの実施形態では、感染性物質の生成、対象の細胞への送達、及び/または対象の細胞におけるバリエーション免疫調節ポリペプチドの発現のための、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸を含有するベクター及び/またはプラスミドが提供される。

## 【0391】

いくつかの実施形態では、提供される核酸は、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸配列を含有する、組換えウイルスまたは細菌ベクターである。いくつかの実施形態では、組換えベクターを使用して、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸配列を含有する感染性物質を産生することができる、及び/または、標的細胞による発現のために対象の標的細胞に送達することができる。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、発現ベクターである。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、感染性物質の生成及び/または産生ならびに標的細胞における発現に必要な適切な配列を含む。

## 【0392】

いくつかの実施形態では、組換えベクターは、プラスミドまたはコスミドである。本明細書に記載されるバリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸配列を含有するプラスミドまたはコスミドは、当技術分野において周知の標準的な技術を使用して容易に構築される。感染性物質の生成のために、ベクターまたはゲノムをプラスミド形態で構築ことができ、これを次いで、パッケージングもしくは産生細胞株または宿主細菌へトランスフェクトすることができる。組換えベクターは、当技術分野において公知の組換え技術のいずれかを使用して生成することができる。いくつかの実施形態では、ベクターは、原核生物の複製起点、及び/または、発現が検出可能または選択可能マーカー（例えば原核生物系における伝播及び/または選択のための薬剤耐性）を付与する遺伝子を含むことができる。

## 【0393】

いくつかの実施形態では、組換えベクターは、ウイルスベクターである。例示的な組換えウイルスベクターは、レンチウイルスベクターゲノム、ボックスウイルスベクターゲノム、ワクシニアウイルスベクターゲノム、アデノウイルスベクターゲノム、アデノウイルス随伴ウイルスベクターゲノム、ヘルペスウイルスベクターゲノム、及びアルファウイルスベクターゲノムを含む。ウイルスベクターは、生ウイルスベクター、弱毒化ウイルスベクター、複製条件付きもしくは複製欠損ウイルスベクター、非病原性（欠陥）ウイルスベクター、複製能力のあるウイルスベクターであることができ、及び/または、異種の遺伝子産物、例えば、本明細書において提供されるバリエーション免疫調節ポリペプチドを発現するように改変される。ウイルスの生成のためのベクターはまた、転写または翻訳負荷を増加または低減する任意の方法を含む、ウイルスの弱毒化を変化させるように改変することもできる。

## 【0394】

使用することができる例示的なウイルスベクターは、改変されたワクシニアウイルスベクター（例えば、Guerra et al., J. Virol. 80: 985 - 98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8: 1445 - 47 (1992); Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86: 2925 - 36 (2005); Mayr et al., Infection 3: 6 - 14 (1975); Hu et al., J. Virol. 75: 10300 - 308 (2001); 米国特許第5,698,530号、第6,998,252号、第5,443,964号、第7,247,615号及び第7,368,116号を参照のこと); アデノウイルスベクターまたはアデ

10

20

30

40

50

ノウイルス随伴ウイルスベクター（例えば、Molin et al., J. Virol. 72: 8358-61 (1998); Narumi et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19: 936-41 (1998); Mercier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 6188-93 (2004); 米国特許第6,143,290号;第6,596,535号;第6,855,317号;第6,936,257号;第7,125,717号;第7,378,087号;第7,550,296号を参照のこと);ネズミ白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、エコトロピックレトロウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、及び組み合わせに基づくものを含むレトロウイルスベクター（例えば、Buchscher et al., J. Virol. 66: 2731-39 (1992); Johann et al., J. Virol. 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt et al., Virology 176: 58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63: 2374-78 (1989); Miller et al., J. Virol. 65: 2220-24 (1991); Miller et al., Mol. Cell Biol. 10: 4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4: 43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2: 215 (1991); ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)、HIV-2、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、馬伝染性貧血ウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)、及びマエディ/ビスナウイルスに基づくものを含むレンチウイルスベクター（例えば、Pfeifer et al., Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211 (2001); Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72: 8150, 1998; Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18: 483, 2007; Engelmann et al., J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale et al., Mol. Therapy, 13: 1121, 2006; Brown et al., J. Virol. 73: 9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams et al., J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell et al., J. Virol. 70: 5288, 1996を参照のこと)もしくはその任意のバリエーション、及び/または上記のウイルスのいずれかを生成するために使用することができるベクターを含む。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、例えばRNAウイルスの場合、パッケージング細胞株において、ウイルスゲノムの発現を調節することができる、調節配列、例えばプロモーターまたはエンハンサー配列を含むことができる(例えば、米国特許第5,385,839号及び第5,168,062号を参照のこと)。

#### 【0395】

いくつかの実施形態では、組換えベクターは、発現ベクター、例えば、標的細胞、例えば対象の細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞及び/またはAPCに送達された際にコードされた遺伝子産物の発現を可能にする発現ベクターである。いくつかの実施形態では、感染性物質に含有される組換え発現ベクターは、タンパク質の発現に適する条件下で、対象の標的細胞において免疫調節タンパク質を発現することができる。

#### 【0396】

いくつかの態様では、核酸または発現ベクターは、適切な発現制御配列に作動可能に連結された免疫調節タンパク質をコードする核酸配列を含む。免疫調節タンパク質をコードする核酸配列がベクターに挿入される前または後のいずれかに、この機能的連結に作用する方法は周知である。発現制御配列は、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル、及び転写または翻訳の制御に関する他のシグナルを含む。プロモーターは、免疫調節タンパク質をコードする核酸配列の部分に作動可能に連結される

ことができる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、標的細胞における構成的に活性なプロモーター（例えば、組織特異的な構成的に活性なプロモーターまたは他の構成的プロモーター）である。例えば、組換え発現ベクターはまた、リンパ組織特異的な転写調節エレメント（TRE）、例えばBリンパ球、Tリンパ球、または樹状細胞特異的なTREも含み得る。リンパ組織特異的TREは、当技術分野において公知である（例えば、Thompson et al., Mol. Cell. Biol. 12: 1043-53 (1992); Todd et al., J. Exp. Med. 177: 1663-74 (1993); Penix et al., J. Exp. Med. 178: 1483-96 (1993)を参照のこと）。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導物質（例えば、T細胞活性化シグナル）に応答性であり得る誘導性プロモーターである。いくつかの実施形態では、対象の標的細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞及び/またはAPCに送達される核酸は、上記の調節エレメントのいずれかに作動可能に連結されることができる。

10

#### 【0397】

いくつかの実施形態では、ベクターは、細菌ベクター、例えば細菌プラスミドまたはコスミドである。いくつかの実施形態では、細菌ベクターは、哺乳動物細胞へのプラスミドDNAの細菌媒介性移送（「バクトフェクション」とも称される）を介して、標的細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞及び/またはAPCに送達される。いくつかの実施形態では、送達される細菌ベクターはまた、標的細胞における発現のための適切な発現制御配列、例えばプロモーター配列及び/またはエンハンサー配列、または上記の任意の調節もしくは制御配列のうちのいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細菌ベクターは、感染性物質、例えば、細菌におけるコードされたバリエーションポリペプチドの発現及び/または分泌のための適切な発現制御配列を含有する。

20

#### 【0398】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるポリペプチドは、合成法によって作製することもできる。固相合成は、小ペプチドを作製する最も費用効果の高い方法であるので、個々のペプチドを作製する好ましい技術である。例えば、周知の固相合成技術は、保護基、リンカー、及び固相支持体の使用、ならびに特定の保護及び脱保護反応条件、リンカー切断条件、スカベンジャーの使用、及び固相ペプチド合成の他の態様を含む。次いで、ペプチドは本明細書において提供されるとおりポリペプチドへと会合することができる。

30

#### 【0399】

IV. バリエーションPD-L2ポリペプチド及び免疫調節タンパク質の免疫調節活性を評価する方法

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチド（例えば、その完全長及び/または特異的結合断片またはコンジュゲート、スタック構築物または誘導體、操作された細胞、または感染性物質）は、T細胞活性化を調節する免疫調節活性を示す。いくつかの実施形態では、PD-L2ポリペプチドは、T細胞アッセイにおいて、野生型または非改変PD-L2対照と比べて、IFN- $\gamma$ 発現を調節する。場合によっては、IFN- $\gamma$ 発現の調節は、対照と比べて、IFN- $\gamma$ 発現を増加または減少させることができる。特異的結合及びIFN- $\gamma$ 発現を決定するアッセイは、当技術分野において周知であり、培養上清中のインターフェロン- $\gamma$ サイトカインレベルを測定するMLR（混合リンパ球反応）アッセイ（Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9): 846-56）、SEB（ブドウ球菌エンテロトキシンB（staphylococcal enterotoxin B））T細胞刺激アッセイ（Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9): 846-56）、及び抗CD3 T細胞刺激アッセイ（Li and Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104）を含む。

40

#### 【0400】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドは、初代T細胞アッセイ

50

において、野生型PD-L2対照と比べてIFN- $\gamma$ （インターフェロン- $\gamma$ ）発現を、いくつかの実施形態において増加させることができ、またはその他の実施形態において減少させることができる。いくつかの実施形態では、そのような活性は、バリエーションPD-L2ポリペプチドが拮抗活性の形態で提供されるか、または作動活性の形態で提供されるかに依存し得る。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、活性化刺激、例えばCD3及び/またはCD28共刺激シグナルまたは分裂促進シグナルに対する応答を低下させるために起こり得る細胞内の阻害性シグナルを遮断するなど、阻害性受容体の拮抗物質である。当業者は、IFN- $\gamma$ 発現の増減を決定するために使用される初代T細胞アッセイの異なるフォーマットを認識するだろう。

#### 【0401】

初代T細胞アッセイにおいてIFN- $\gamma$ 発現を増減させるバリエーションPD-L2の能力をアッセイする際に、混合リンパ球反応（MLR）アッセイを使用することができる。いくつかの実施形態では、拮抗物質形態、例えば可溶性形態で提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質、例えばバリエーションPD-L2-Fcまたは分泌可能な免疫調節タンパク質は、PD-1阻害性受容体の活性を遮断し、これによりアッセイにおいてIFN- $\gamma$ の産生の増加によって観察されるようにアッセイにおいてMLR活性を増加させる。いくつかの実施形態では、作動物質形態で提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質、例えば腫瘍局在化部分または提供される膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する操作された細胞を含有する局在化vIgDスタックまたはコンジュゲートは、PD-1阻害性受容体の活性を遮断し得、これによりIFN- $\gamma$ 産生の減少などMLR活性を減少させる。いくつかの実施形態では、作動物質形態で提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質、例えば腫瘍局在化部分または提供される膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する操作された細胞を含有する局在化vIgDスタックまたはコンジュゲートは、PD-1阻害性受容体の活性を遮断し得、これによりIFN- $\gamma$ 産生の増加などMLR活性を増加させる。

#### 【0402】

あるいは、初代T細胞アッセイにおいてIFN- $\gamma$ 発現の増減を調節するバリエーションPD-L2の能力をアッセイする際に、共固定アッセイを使用することができる。共固定アッセイでは、TCRシグナル（いくつかの実施形態では、抗CD3抗体によって提供される）を共固定されたバリエーションPD-L2と併用して、PD-L2の非改変または野生型対照と比べたIFN- $\gamma$ 発現を増減させる能力を決定する。いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質、例えば、共固定されたバリエーションPD-L2-Fcは、共固定アッセイにおいてIFN- $\gamma$ の産生を減少させる。

#### 【0403】

いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$ 発現の増減を調節するバリエーションPD-L2の能力をアッセイする際に、T細胞レポーターアッセイを使用することができる。いくつかの実施形態では、T細胞は、Jurkat T細胞株であるか、またはJurkat T細胞株に由来する。レポーターアッセイでは、レポーター細胞株（例えば、Jurkatレポーター細胞）も生成され、バリエーションIgSFドメインポリペプチドの同族結合パートナーである阻害性受容体を過剰発現する。例えば、バリエーションPD-L2の場合、レポーター細胞株（例えば、Jurkatレポーター細胞）が生成され、PD-1を過剰発現する。いくつかの実施形態では、レポーターT細胞はまた、レポーターに作動可能に連結されたT細胞活性化に応答する誘導性プロモーターを含有するレポーター構築物も含有する。いくつかの実施形態では、レポーターは、蛍光または発光レポーターである。いくつかの実施形態では、レポーターは、ルシフェラーゼである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CD3シグナル伝達に応答する。いくつかの実施形態では、プロモーターは、NFATプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、共刺激シグナル伝達、例えばCD28共刺激シグナル伝達に応答する。いくつかの実施形態では、プロモーターは、IL-2プロモーターである。

#### 【0404】

10

20

30

40

50

レポーターアッセイの態様では、レポーター細胞株は、阻害性受容体の野生型リガンド、例えばPD-L2を発現する抗原提示細胞（APC）との共インキュベーションなどにより刺激される。いくつかの実施形態では、APCは、人工APCである。人工APCは、当業者に周知である。いくつかの実施形態では、人工APCは、1つまたは複数の哺乳動物細胞株、例えばK562、CHOまたは293細胞に由来する。

#### 【0405】

いくつかの実施形態では、Jurkatレポーター細胞は、バリエーション分子または免疫調節タンパク質、例えばバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質の存在下で阻害性リガンドを過剰発現する人工APCと共インキュベートされる。いくつかの実施形態では、レポーターの発現は、細胞の発光または蛍光を測定するなどして監視される。いくつかの実施形態では、阻害性受容体とリガンド間の正常な相互作用により、対照（例えば、阻害性受容体及びリガンドの相互作用が存在しない対照T細胞とAPC（例えば、PD-L2を過剰発現しないAPC）の共インキュベーションによるレポーター発現など）と比較してレポーターシグナルの阻害または減少がもたらされる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、例えばバリエーションPD-L2-Fcとして可溶性形態で提供される場合、または分泌可能な免疫調節タンパク質としてAPCから発現される場合、相互作用に拮抗し、これにより、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が存在しない場合と比較して、レポーターシグナルが増加する。場合によっては、本明細書で提供されるようなバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質の特定のフォーマットは作動活性をもたらし得、これにより、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が存在しない場合と比較して、レポーター発現が減少する。

#### 【0406】

適切な対照の使用は当業者に公知であるが、前述の実施形態では、対照は、典型的には、非改変PD-L2、例えばバリエーションPD-L2が由来したまたは発生したのと同じ哺乳動物種由来の野生型の天然PD-L2アイソフォームの使用を伴う。いくつかの実施形態では、野生型または天然PD-L2は、バリエーションと同じ形態または対応する形態のものである。例えば、バリエーションPD-L2がFcタンパク質に融合したバリエーションECDを含有する可溶性形態である場合、対照はFcタンパク質に融合したPD-L2の野生型または天然ECDを含有する可溶性形態である。PD-1に対する結合親和性及び/または選択性が増加または減少するかどうかに関係なく、バリエーションPD-L2は、T細胞アッセイにおいて、野生型PD-L2対照と比べてIFN- $\gamma$ 発現を、いくつかの実施形態において増加させ、そしてその他の実施形態において減少させる。

#### 【0407】

いくつかの実施形態では、バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、野生型または非改変PD-L2対照と比べて、IFN- $\gamma$ 発現（すなわち、タンパク質発現）を少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはより多く増加させる。他の実施形態では、バリエーションPD-L2または免疫調節タンパク質は、野生型または非改変PD-L2対照と比べて、IFN- $\gamma$ 発現（すなわち、タンパク質発現）を少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはより多く減少させる。いくつかの実施形態では、野生型PD-L2対照は、野生型ネズミPD-L2配列の配列から配列が変化したバリエーションPD-L2に典型的に使用されるような、ネズミPD-L2である。いくつかの実施形態では、野生型PD-L2対照は、野生型ヒトPD-L2配列の配列から配列が変化したバリエーションPD-L2に典型的に使用されるような、ヒトPD-L2である。

#### 【0408】

##### V. 医薬製剤

本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュ

10

20

30

40

50

ゲート、操作された細胞または感染性物質のいずれかを含有する組成物が本明細書において提供される。薬学的組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤をさらに含むことができる。例えば、薬学的組成物は、例えば、組成物の pH、モル浸透圧濃度、粘性、透明性、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解もしくは放出の速度、吸着または浸透を、修正、維持、または保存するための 1 つまたは複数の賦形剤を含有することができる。いくつかの態様では、当業者は、細胞を含有する薬学的組成物がタンパク質を含有する薬学的組成物と異なってよいことを理解する。

#### 【0409】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、固体、例えば散剤、カプセル剤、または錠剤である。例えば、薬学的組成物の成分は、凍結乾燥することができる。いくつかの実施形態では、固体薬学的組成物は、投与の前に液体中で再構成されるかまたは溶解される。

10

#### 【0410】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、液体、例えば、水溶液（例えば、生理食塩水またはリンゲル液）に溶解されたバリエーション PD-L2 ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、薬学的組成物の pH は、約 4.0 ~ 約 8.5（例えば、約 4.0 ~ 約 5.0、約 4.5 ~ 約 5.5、約 5.0 ~ 約 6.0、約 5.5 ~ 約 6.5、約 6.0 ~ 約 7.0、約 6.5 ~ 約 7.5、約 7.0 ~ 約 8.0、または約 7.5 ~ 約 8.5）である。

#### 【0411】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤、例えば充填剤、結合剤、コーティング剤、保存剤、滑沢剤、着色料、甘味剤、着色剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、または安定剤を含む。薬学的に許容し得る充填剤の例は、セルロース、第二リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルトール、アルファ化デンプン、トウモロコシデンプン、またはジャガイモデンプンを含む。薬学的に許容し得る結合剤の例は、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、またはセルロースを含む。薬学的に許容し得るコーティング剤の例は、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、またはゼラチンを含む。薬学的に許容し得る崩壊剤の例は、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、またはデンプングリコール酸ナトリウムを含む。薬学的に許容し得る滑沢剤の例は、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、またはステアリン酸を含む。薬学的に許容し得る保存剤の例は、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、またはソルビン酸を含む。薬学的に許容し得る甘味剤の例は、スクロース、サッカリン、アスパルテム、またはソルビトールを含む。薬学的に許容し得る緩衝剤の例は、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、または酒石酸塩を含む。

20

30

#### 【0412】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、産物の制御放出または徐放性のための物質、例えば注射用マイクロスフェア、生体内分解性粒子、高分子化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、ビーズ、またはリポソームをさらに含む。

#### 【0413】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌されている。滅菌は、滅菌濾過膜に通す濾過、または照射によって達成してよい。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用した滅菌は、凍結乾燥及び再構成の前に実行してもその後に実行してもよい。非経口投与用組成物は、凍結乾燥形態で貯蔵しても溶液で貯蔵してもよい。加えて、非経口組成物は、一般的に滅菌アクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静注液バッグまたはバイアルへと入れられる。

40

#### 【0414】

いくつかの実施形態では、膜貫通型免疫調節タンパク質であって、そのような膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する操作された細胞を含む、膜貫通型免疫調節タンパク質を含有する薬学的組成物が提供される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物及び製剤は、

50

1つまたは複数の任意の薬学的に許容し得る担体または賦形剤を含む。そのような組成物は、緩衝剤、例えば中性の緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など；糖質、例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン；酸化防止剤；キレート剤、例えばEDTAまたはグルタチオン；補助剤（例えば、水酸化アルミニウム）；及び保存剤を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化される。

#### 【0415】

そのような製剤は、例えば、静脈内注射に好適な形態であり得る。薬学的に許容し得る担体は、1つの組織、臓器、または身体の一部から別の組織、臓器、または身体の一部への関心対象の細胞の運搬または輸送に關与する、薬学的に許容し得る材料、組成物、またはビヒクルであり得る。例えば、担体は、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、もしくは封入材料、またはいくつかのそれらの組み合わせであり得る。担体の各成分は、製剤のその他の有効成分と適合可能でなければならないという点で「薬学的に許容し得る」でなければならない。それはまた、その治療効果を過度に上回る毒性、刺激、アレルギー応答、免疫原性、または任意の他の合併症のリスクを有するべきではないという意味で、直面し得るあらゆる組織、臓器、または身体の一部との接触に好適でなければならない。

10

#### 【0416】

##### VI. 製造物品及びキット

また、本明細書に記載の薬学的組成物を好適な包装に含む製造物品が本明細書において提供される。本明細書に記載の組成物（例えば、眼科用組成物）用の好適な包装は、当技術分野において公知であり、例えば、バイアル（例えば、密封バイアル）、容器（vessels）、アンプル、ボトル、ジャー、フレキシブル包装（例えば、密封マイラーまたはプラスチック袋）などを含む。これらの製造物品は、さらに滅菌及び/または密封されてよい。

20

#### 【0417】

さらに、本明細書に記載の薬学的組成物（または製造物品）を含むキットが提供され、該キットは、本明細書に記載の用途のような組成物の使用方法に関する説明書（複数可）をさらに含んでよい。本明細書に記載のキットはまた、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び本明細書に記載の任意の方法を実施するための説明書を含む添付文書を含む、商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料を含んでもよい。

30

#### 【0418】

##### VII. 治療用途

本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュゲート、操作された細胞または感染性物質を含有する提供される薬学的組成物を使用して、ヒト患者などの対象の疾患または状態の治療に關連することを含む免疫応答を調節する方法が本明細書において提供される。本明細書に記載の薬学的組成物（本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュゲート、操作された細胞、または感染性物質を含む薬学的組成物を含む）を、多種多様な治療用途、例えば疾患の治療に使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、薬学的組成物を使用して、哺乳動物において炎症性または自己免疫性障害、がん、臓器移植、ウイルス感染、及び/または細菌感染が治療される。薬学的組成物は、免疫応答を調節（例えば増加または減少）して、疾患を治療することができる。

40

#### 【0419】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、本明細書に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュゲート、操作された細胞、及び感染性物質の治療的投与に適用可能である。提供される開示を考慮して、望まれる免疫応答の調節のタイプ（例えば、増加または減少）に応じて適応症に対してフォーマットを選択することは、当業者のレベル内である。

#### 【0420】

50

いくつかの実施形態では、例えば、がん、ウイルス感染または細菌感染の治療において有用であることができる、免疫応答を刺激する本明細書において提供される薬学的組成物が投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、バリエーションPD-L2ポリペプチドを、その同族結合パートナーPD-1の拮抗活性を示す及び/またはPD-1を介した共刺激シグナル伝達を阻害するフォーマットで含有する。そのような治療用途に関連して使用するためのPD-L2ポリペプチドの例示的なフォーマットは、例えば、可溶性のバリエーションPD-L2ポリペプチド（例えば、バリエーションPD-L2-Fc融合タンパク質）、免疫調節タンパク質、またはバリエーションPD-L2ポリペプチド及び別のIgSFドメイン（Fc融合体であるその可溶性形態を含む）の「スタック」、分泌可能な免疫調節タンパク質を発現する操作された細胞、または感染細胞（例えば、腫瘍細胞またはAPC、例えば樹状細胞）における分泌可能な免疫調節タンパク質の発現及び分泌などのための分泌可能な免疫調節タンパク質をコードする核酸分子を含む感染性物質を含む。そのような方法の中には、可溶性フォーマットのバリエーションPD-L2ポリペプチドの送達によって実施される方法がある。例示的な可溶性フォーマットは本明細書に記載されており、親和性改変IgSFドメイン（例えばIgV）を含有するバリエーションPD-L2ポリペプチドの細胞外部分が、直接的または間接的に多量体化ドメイン、例えばFcドメインまたは領域に連結されるフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、そのような治療用物質は、バリエーションPD-L2-Fc融合タンパク質である。

10

#### 【0421】

免疫応答を調節するために提供される方法は、腫瘍またはがんなどの疾患または状態を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、哺乳動物がん細胞（ヒトがん細胞など）の成長を阻害するために使用することができる。がんの治療方法は、有効量の本明細書に記載の薬学的組成物のいずれかをがんを有する対象に投与することを含むことができる。有効量の薬学的組成物を投与して、例えば提供されるバリエーションまたは免疫調節タンパク質による免疫学的活性の調節に感受性のあるがんを含むがんの進行を阻害、停止、または回復することができる。ヒトがん細胞は、*in vivo*または*ex vivo*で治療できる。ヒト患者の*ex vivo*治療では、がん細胞を含む組織または体液が体外で処理され、その後、当該組織または体液が患者に再導入される。いくつかの実施形態では、がんは、患者に治療用組成物を投与することにより、*in vivo*でヒト患者において治療される。したがって、本発明は、対照による治療と比較して、腫瘍の進行を阻害、停止、または回復させるか、そうでなければ無増悪生存期間（すなわち、患者が悪化しないがんを患いながら生存している治療中及び治療後の期間）または全生存期間（「生存率」とも呼ばれる；すなわち、がんと診断後またはこれを治療後、一定期間生存する試験群または治療群の人々の割合）の統計的に優位な延長をもたらす*ex vivo*及び*in vivo*の方法を提供する。

20

30

#### 【0422】

本明細書に記載の薬学的組成物及び治療法によって治療できるがんは、限定されないが、黒色腫、膀胱癌、血液学的悪性腫瘍（白血病、リンパ腫、骨髄腫）、肝臓癌、脳癌、腎臓癌、乳癌、膵臓癌（腺癌）、大腸癌、肺癌（小細胞肺癌及び非小細胞肺癌）、脾臓癌、胸腺もしくは血液細胞の癌（すなわち、白血病）、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、筋骨格癌、頭頸部癌、消化管癌、生殖細胞癌、または内分泌及び神経内分泌癌を含む。いくつかの実施形態では、がんは、ユーイング肉腫である。いくつかの実施形態では、がんは、リンパ腫、リンパ性白血病、骨髄性白血病、子宮頸癌、神経芽細胞腫、または多発性骨髄腫である。

40

#### 【0423】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、単剤療法として（すなわち、単一の薬剤として）、または併用療法として（すなわち、1つまたは複数の追加の抗がん剤、例えば化学療法剤、がんワクチン、または免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて）投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物をまた、放射線療法と共に投与することもできる。本開示のいくつかの態様では、免疫チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、トレ

50

メリムマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブなどである。

【0424】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、免疫応答を抑制し、炎症性または自己免疫性障害の治療、または臓器移植に有用であることができる。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、バリエーションPD-L2ポリペプチドを、その同族結合パートナーPD-1の作動活性を示す及び/またはPD-1を介した阻害性シグナル伝達を刺激するフォーマットで含有する。そのような治療用途に関連して使用するためのPD-L2ポリペプチドの例示的なフォーマットは、例えば、炎症環境の細胞または組織に局在する、免疫調節タンパク質、またはバリエーションPD-L2ポリペプチド及びIgSFドメインもしくはそのバリエーションの「スタック」、炎症環境の細胞または組織に局在する部分に連結されたバリエーションPD-L2ポリペプチドを含有するコンジュゲート、膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する操作された細胞、または感染細胞における膜貫通型免疫調節タンパク質の発現などのための膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸分子を含む感染性物質を含む。

10

【0425】

免疫応答を調節するために提供される方法は、炎症性または自己免疫性障害などの疾患または状態を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、炎症性または自己免疫性障害は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植、リウマチ性疾患、炎症性消化管疾患、炎症性眼疾患、炎症性神経疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己免疫性血液疾患である。

20

【0426】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬学的組成物によって治療できる炎症性及び自己免疫性障害は、アジソン病、アレルギー、円形脱毛症、アルツハイマー病、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群(ヒューズ症候群)、喘息、アテローム性動脈硬化、関節リウマチ、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、無精子症、ベーチェット病、ベルジエ病、水疱性類天疱瘡、心筋症、心血管疾患、セリアックスブルー/シリアック病、慢性疲労免疫不全症候群(CFIDS)、慢性特発性多発神経炎、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー(chronic inflammatory demyelinating, polyradical neuropathy)(CIPD)、慢性再発性多発ニューロパチー(ギラン・バレー症候群)、チャグ・ストラウス症候群(CSS)、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症(CAD)、COPD(慢性閉塞性肺疾患)、CREST症候群、クローン病、皮膚炎、疱疹状皮膚炎(herpetiformis)、皮膚筋炎、糖尿病、円板状ループス、湿疹、後天性表皮水疱症、本態性混合型クリオグロブリン血症、エヴァンス症候群、眼球突出、線維筋痛症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、免疫増殖性疾患もしくはは障害、炎症性腸疾患(IBD)、間質性肺疾患、若年性関節炎、若年性特発性関節炎(JIA)、川崎病、ランバート・イトン筋無力症候群、扁平苔癬、ループス腎炎、リンパ球性下垂体炎、メニエール病、ミラー・フィッシャー症候群/急性散在性脳脊髄神経根障害(acute disseminated encephalomyelopathy)、混合性結合組織病、多発性硬化症(MS)、筋肉リウマチ、筋痛性脳脊髄炎(ME)、重症筋無力症、眼炎症、落葉状天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群(polyglandular syndromes)(ウイテカー症候群(Whitaker's syndrome))、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変/自己免疫性胆管症、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群/反応性関節炎、再狭窄、リウマチ熱、リウマチ性疾患、サルコイドーシス、シュミット症候群、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性強皮症、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、甲状腺炎、1型糖尿病、潰瘍

30

40

50

性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、白斑、間質性腸疾患またはウェゲナー肉芽腫症である。いくつかの実施形態では、炎症性または自己免疫性障害は、間質性腸疾患、移植、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、及び乾癬から選択される。

#### 【0427】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、自己免疫状態を調節するために投与される。例えば、免疫応答を抑制することは、レシピエントによるドナーからの、組織、細胞、または臓器移植の拒絶反応を阻害するための方法において有益であることができる。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬学的組成物は、移植片関連または移植関連疾患または障害、例えば移植片対宿主疾患（GVHD）を制限または予防するために使用される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、移植されたまたは生着された（grafted）骨髄、臓器、皮膚、筋肉、ニューロン、膵島、または実質細胞の自己免疫拒絶反応を抑制するために使用される。

10

#### 【0428】

本明細書に記載の、操作された細胞を含む薬学的組成物及び方法を、養子細胞移入用途において使用することができる。いくつかの実施形態では、操作された細胞を含む細胞組成物を、関連する方法において使用して、例えば免疫活性を、例えば哺乳動物がんの治療、または他の実施形態では自己免疫性障害の治療への免疫療法アプローチにおいて調節することができる。用いられる方法は、一般的に、本発明のTIPと哺乳動物細胞とを、親和性改変IgSFドメインの特異的結合及び哺乳動物細胞の免疫活性の調節に対して許容的な条件下で、接触させる方法を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞（例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、T細胞（CD8+またはCD4+T細胞を含む）、またはAPC）は、本明細書に記載される膜タンパク質として及び/または可溶性バリエーションPD-L2ポリペプチド、免疫調節タンパク質、もしくはコンジュゲートとして発現するように操作される。次いで、操作された細胞を、免疫活性の調節が望まれるAPC、第2のリンパ球または腫瘍細胞のような哺乳動物細胞と、哺乳動物細胞において免疫活性が調節され得るような哺乳動物細胞上のカウンター構造体への親和性改変IgSFドメインの特異的結合を可能にする条件下で接触させることができる。細胞は、in vivoまたはex vivoで接触させることができる。

20

#### 【0429】

いくつかの実施形態では、操作された細胞は、対象に対して自家である。他の実施形態では、細胞は同種である。いくつかの実施形態では、細胞は、それが単離された哺乳動物に再注入される自家操作細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物に注入される同種操作細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、患者の血液または腫瘍から採取し、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載されるバリエーションPD-L2ポリペプチド、免疫調節タンパク質、またはコンジュゲート）を発現するように操作し、in vitro培養系で増殖させ（例えば、細胞を刺激することによって）、そして患者に再注入して腫瘍破壊を媒介する。いくつかの実施形態では、該方法は、TIPを発現する細胞（例えば、T細胞）を患者に注入して戻す養子細胞移入によって実施される。いくつかの実施形態では、本発明の治療用組成物及び方法は、リンパ腫、リンパ性白血病、骨髄性白血病、子宮頸癌、神経芽細胞腫、または多発性骨髄腫のようながんの哺乳動物患者の治療において使用される。

30

40

#### 【0430】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、対象に投与される。一般的に、薬学的組成物の投与量及び投与経路は、対象のサイズ及び状態に応じて、標準的な薬務に従って決定される。例えば、最初に、細胞培養アッセイまたはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、もしくはサルのような動物モデルのいずれかで治療的有効用量を推定することができる。適切な濃度範囲及び投与経路を決定するために動物モデルを使用してもよい。次いで、そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量及び投与経路を決定することができる。正確な投与量は、対象が必要とする治療に関連する要因に照らして決定されるだろう。投与量及び投与は、活性化化合物の十分なレベルを提供するように、または所望の効果を

50

維持するように調整される。考慮され得る要因は、疾患状態の重症度、対象の通常の状態、対象の年齢、体重、及び性別、投与の時間及び頻度、薬物併用、反応感受性、ならびに治療への応答を含む。

#### 【0431】

長時間作用性薬学的組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス速度に応じて、3～4日毎、毎週、または隔週で投与してもよい。投薬頻度は、使用される製剤中の分子の薬物動態パラメータに依存する。典型的には、組成物は、所望の効果を達成する投与量に達するまで投与される。したがって、組成物は、単回用量として、または複数回用量（同じまたは異なる濃度/投与量で）として経時的に、または持続注入として投与してもよい。適切な投与量のさらなる改良が日常的に行われる。適切な投与量は、適切な用量 反応データを使用することによって確認され得る。T細胞活性化もしくは増殖、サイトカイン合成もしくは産生（例えば、TNF-、IFN-、IL-2の産生）、様々な活性化マーカー（例えば、CD25、IL-2受容体）の誘導、炎症、関節の腫脹もしくは圧痛、C-反応性タンパク質の血清レベル、抗コラーゲン抗体産生、及び/またはT細胞依存性抗体応答を含む、治療効果についての多数のバイオマーカーまたは生理学的マーカーをモニタリングすることができる。

10

#### 【0432】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、経口、経皮、吸入による、静脈内、動脈内、筋肉内、創傷部位への直接適用、手術部位への適用、腹腔内、坐剤による、皮下、皮内、経皮、噴霧による、胸膜内、脳室内、関節内、眼内、または髄腔内を含む、任意の経路を通して対象に投与される。

20

#### 【0433】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物の投与は、単回投与または反復投与である。いくつかの実施形態では、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回以上、対象に投与される。いくつかの実施形態では、1週間に約1用量以上（例えば、約2用量以上、約3用量以上、約4用量以上、約5用量以上、約6用量以上、または約7用量以上）が与えられる。いくつかの実施形態では、複数回用量が、数日、数週間、数ヶ月間、または数年間にわたって与えられる。いくつかの実施形態では、一連の治療は、約1用量以上（例えば、約2用量以上、約3用量以上、約4用量以上、約5用量以上、約7用量以上、約10用量以上、約15用量以上、約25用量以上、約40用量以上、約50用量以上、または約100用量以上）である。

30

#### 【0434】

いくつかの実施形態では、投与される薬学的組成物の用量は、対象の体重1kg当たりタンパク質約1µg以上（例えば、対象の体重1kg当たりタンパク質約2µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約5µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約10µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約25µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約50µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約100µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約250µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約500µg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約1mg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約2mg以上、または対象の体重1kg当たりタンパク質約5mg以上）である。

40

#### 【0435】

いくつかの実施形態では、細胞組成物の治療量が投与される。典型的には、投与されるべき本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の範囲、及び状態の個々の違いを考慮して医師が決定することができる。一般的に、本明細書に記載される操作された細胞、例えばT細胞を含む薬学的組成物を、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞/kg体重、例えば $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/kg体重の投与量（これらの範囲内の全ての整数値を含む）で投与してよいと記載することができる。操作細胞組成物、例えばT細胞組成物をこれらの投与量で複数回投与してもよい。該細胞を、免疫療法において通常知られている注入技術を使用することによって投与することができる（例え

50

ば、Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照のこと)。特定の患者に対する最適な投与量及び治療レジメンは、医薬分野の当業者が、患者の疾患の兆候をモニタリングし、それに応じて治療を調整することによって、容易に決定することができる。

#### 【0436】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、免疫調節バリエーションポリペプチドをコードする核酸配列を含有する感染性物質を含有する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、治療に好適である対象への投与に好適な感染性物質の用量を含有する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、ウイルスである感染性物質を、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$  もしくは約  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$  プラーク形成単位 (pfu)、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu もしくは約  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu、または  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu もしくは約  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu を各々包含する、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$  pfu または約  $1 \times 10^{10}$  pfu の単一または複数の投与量で含有する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、 $10^5 \sim 10^{10}$  もしくは約  $10^5 \sim 10^{10}$  pfu/mL、例えば、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$  もしくは約  $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$ 、または  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  もしくは約  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  pfu/mL、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $10^6$  pfu/mL、 $10^7$  pfu/mL、 $10^8$  pfu/mL または  $10^9$  pfu/mL の細菌濃度を含有することができる。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、細菌である感染性物質を、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$  もしくは約  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$  コロニー形成単位 (cfu)、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$  cfu もしくは約  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$  cfu、または  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  cfu もしくは約  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  cfu を各々包含する、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  または  $1 \times 10^9$  cfu の単一または複数の投与量で含有する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、 $10^3 \sim 10^8$  もしくは約  $10^3 \sim 10^8$  cfu/mL、例えば、 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$  もしくは約  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 、または  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  もしくは約  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cfu/mL、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $10^5$  cfu/mL、 $10^6$  cfu/mL、 $10^7$  cfu/mL または  $10^8$  cfu/mL の細菌濃度を含有することができる。

#### 【0437】

望ましくない免疫応答を媒介するもしくは媒介することができる免疫細胞を排除、隔離、もしくは不活性化すること；防御免疫応答を媒介するもしくは媒介することができる免疫細胞を誘導、生成、もしくは刺激すること；免疫細胞の物理的もしくは機能的特性を変化させること；またはこれらの効果の組み合わせによって、本発明の治療用組成物の投与が免疫活性を十分に調節するかどうかを決定するための多種多様な手段が公知である。免疫活性の調節の測定例は、限定されないが、免疫細胞集団の有無の検査（フローサイトメトリー、免疫組織化学、組織診、電子顕微鏡法、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用する）；シグナルにตอบสนองして増殖もしくは分化する能力または増殖もしくは分化への抵抗性を含む、免疫細胞の機能的能力の測定（例えば、T細胞増殖アッセイ、及び抗CD3抗体、抗T細胞受容体抗体、抗CD28抗体、カルシウムイオノフォア、PMA（ホルボール12-ミリストート13-アセート）、ペプチドまたはタンパク質抗原を負荷した抗原提示細胞で刺激後の3H-チミジン取り込みに基づいたpepsc分析；B細胞増殖アッセイを使用する）；他の細胞を殺傷または溶解する能力の測定（例えば、細胞傷害性T細胞アッセイ）；サイトカイン、ケモカイン、細胞表面分子、抗体及び細胞の他の産物の測定（例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ、ウェスタンブロット分析、タンパク質マイクロアレイ分析、免疫沈降分析による）；免疫細胞または免疫細胞内のシグナル伝達経路の活性化の生化学マーカーの測定（例えば、チロシン、セリンまたはトレオニンのリン酸化、ポリペプチド切断、及びタンパク質複合体の形成または解

離のウェスタンブロット及び免疫沈降分析；タンパク質アレイ分析；DNAアレイまたはサブトラクティブハイブリダイゼーションを使用するDNA転写プロファイリング）；アポトーシス、壊死または他の機序による細胞死の測定（例えば、アネキシンV染色、TUNELアッセイ、DNAラダリングを測定するゲル電気泳動、組織診；蛍光発生カスパーゼアッセイ、カスパーゼ基質のウェスタンブロット分析）；免疫細胞によって産生される遺伝子、タンパク質、及び他の分子の測定（例えば、ノーザンブロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応、DNAマイクロアレイ、タンパク質マイクロアレイ、2次元ゲル電気泳動、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着アッセイ、フローサイトメトリー）；ならびに自己タンパク質または自己ポリペプチドが関与する自己免疫疾患、神経変性性疾患、及び他の疾患の臨床症状または転帰（例えば改善）の、例えば、多発性硬化症の場合には再発率または疾患重症度を測定することによる（当業者に公知の臨床スコアを使用する）、I型糖尿病の場合には血糖を、または関節リウマチの場合には関節の炎症を測定することによる、測定（臨床スコア、追加の治療法を使用する要件、機能的状態、画像研究）を含む。

10

## 【0438】

V I I I . 例示的な実施形態

提供される実施形態としては、以下の実施形態が挙げられる。

## 【0439】

1 . I g Vドメインもしくはその特異的結合断片、I g Cドメインもしくはその特異的結合断片、またはその両方を含むバリエーションPD - L 2ポリペプチドであって、SEQ ID NO : 31の番号付けに基づいた2、12、13、15、18、23、24、28、31、32、33、36、37、39、44、45、46、47、48、58、59、65、67、69、71、72、73、74、75、76、77、82、85、86、89、または91から選択される位置（複数可）に対応する、非改変PD - L 2またはその特異的結合断片における1つまたは複数の位置に、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、バリエーションPD - L 2ポリペプチド。

20

## 【0440】

2 . アミノ酸改変が、アミノ酸の置換、挿入、または欠失である、実施形態1に記載のバリエーションPD - L 2ポリペプチド。

## 【0441】

3 . 非改変PD - L 2が、哺乳動物PD - L 2またはその特異的結合断片である、実施形態1または実施形態2に記載のバリエーションPD - L 2ポリペプチド。

30

## 【0442】

4 . 非改変PD - L 2が、ヒトPD - L 2またはその特異的結合断片である、実施形態1～3のいずれかに記載のバリエーションPD - L 2ポリペプチド。

## 【0443】

5 . 非改変PD - L 2が、( i ) SEQ ID NO : 31に記載のアミノ酸の配列、( i i ) SEQ ID NO : 31に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸の配列、または( i i i ) I g VドメインもしくはI g Cドメインもしくはその特異的結合断片または両方を含むそれらの一部を含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載のバリエーションPD - L 2ポリペプチド。

40

## 【0444】

6 . I g VドメインまたはI g Cドメインの特異的結合断片が、少なくとも50、60、70、80、90、100、110、またはそれ以上のアミノ酸長を有するか、またはI g Vドメインの特異的結合断片が、SEQ ID NO : 4の24～130アミノ酸として記載のI g Vドメインの長さの少なくとも80%の長さを含み、及び/またはI g Cドメインの特異的結合断片が、SEQ ID NO : 4の122～203アミノ酸として記載のI g Cドメインの長さの少なくとも80%の長さを含む、実施形態1～5のいずれか1つに記載のバリエーションPD - L 2ポリペプチド。

## 【0445】

50

7. バリエーション PD-L2 が、最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 もしくは 20 個のアミノ酸改変（任意で、アミノ酸置換、挿入、及び/または欠失）を含むか、または

バリエーション PD-L2 ポリペプチドが、SEQ ID NO: 31 に対して少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を示すアミノ酸配列もしくはその特異的結合断片を含む、

実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載のバリエーション PD-L2 ポリペプチド。

【0446】

8. バリエーション PD-L2 ポリペプチドが、非改変 PD-L2 と比較して、PD-1 または RGMb のエクストドメインに対して変化した結合を示す、実施形態 1 ~ 7 のいずれかに記載のバリエーション PD-L2 ポリペプチド。

【0447】

9. バリエーション PD-L2 ポリペプチドが、非改変 PD-L2 と比較して、PD-1 のエクストドメインに対して変化した結合を示す、実施形態 1 ~ 8 のいずれかに記載のバリエーション PD-L2 ポリペプチド。

【0448】

10. 変化した結合が、変化した結合親和性及び/または変化した結合選択性である、実施形態 8 または実施形態 9 に記載のバリエーション PD-L2 ポリペプチド。

【0449】

11. 1 つまたは複数のアミノ酸改変が、F2L、I12V、I13V、H15Q、N18D、N24S、C23S、G28V、N24D、V31A、V31M、N32D、L33P、L33H、L33F、I36V、T37A、S48C、S39I、E44D、N45S、D46E、T47A、E58G、E59G、K65R、S67L、H69L、P71S、Q72H、V73A、Q74R、R76G、D77N、Q82R、I85F、I86T、V89D、W91R またはその保存的アミノ酸置換から選択される、実施形態 1 ~ 10 のいずれかに記載のバリエーション PD-L2 ポリペプチド。

【0450】

12. 1 つまたは複数のアミノ酸改変が、

10

20

H15Q, N24D, E44D, V89D, Q82R/V89D,  
 E59G/Q82R, S39I/V89D, S67L/V89D, S67L/I85F, S67L/I86T, H15Q/K65R,  
 H15Q/Q72H/V89D, H15Q/S67L/R76G, H15Q/R76G/I85F, H15Q/T47A/Q82R,  
 H15Q/Q82R/V89D, H15Q/C23S/I86T, H15Q/S39I/I86T, E44D/V89D/W91R,  
 I13V/S67L/V89D, H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/S67L/I86T, I13V/H15Q/E44D/V89D,  
 I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D, I13V/E44D/Q82R/V89D, I13V/Q72H/R76G/I86T,  
 I13V/H15Q/R76G/I85F, H15Q/S39I/R76G/V89D, H15Q/S67L/R76G/I85F,  
 H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/T47A/Q72H/R76G, I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G,  
 H15Q/E44D/R76G/I85F, H15Q/S39I/S67L/V89D, H15Q/N32D/S67L/V89D,  
 N32D/S67L/V89D, H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D, H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T,  
 G28V/Q72H/R76G/I86T, I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L, E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D,  
 H15Q/V89D, H15Q/T47A, I13V/H15Q/Q82R, I13V/H15Q/V89D, I13V/S67L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/Q82R/V89D, H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R,  
 I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D, H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D, I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D, I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D, I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D,  
 H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D,  
 I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T, H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D,  
 F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D, I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D, H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D,  
 I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D, H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D,  
 I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D, H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D,  
 I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T, H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89D,  
 H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D,またはI13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89D

10

20

30

の中から選択される、実施形態 1 ~ 11 のいずれかに記載のパリアント PD - L2 ポリペプチド。

【0451】

13. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、13、15、39、44、47、67、72、76、82、85、86または89から選択される位置(複数可)に対応し、任意で該1つまたは複数のアミノ酸置換が、I13V、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I85F、I86T、V89Dまたはその保存的アミノ酸置換から選択される、実施形態 1 ~ 12 のいずれかに記載のパリアント PD - L2 ポリペプチド。

40

【0452】

14. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、13、15、44、47、67、72、76、82、86または89から選択される位置(複数可)に対応し、任意で該1つまたは複数のアミノ酸置換が、I13V、H15Q、E44D、T47A、S67L、Q72H、R76G、Q82R、I86T、V89Dまたはその保存的アミノ酸置換から選択される、実施形態 1 ~ 13 のいずれかに記載のパリアント PD - L2 ポリペプチド。

【0453】

15. アミノ酸置換 I13V/H15Q、I13V/T47A、I13V/S67L、I13V/Q72H、I13V/Q72H、I13V/R76G、I13V/Q82R、

50

I 1 3 V / I 8 6 T、I 1 3 V / V 8 9 D、H 1 5 Q / T 4 7 A、H 1 5 Q / S 6 7 L、  
 H 1 5 Q / Q 7 2 H、H 1 5 Q / Q 7 2 H、H 1 5 Q / R 7 6 G、H 1 5 Q / Q 8 2 R、  
 H 1 5 Q / I 8 6 T、H 1 5 Q / V 8 9 D、T 4 7 A / S 6 7 L、T 4 7 A / Q 7 2 H、  
 T 4 7 A / Q 7 2 H、T 4 7 A / R 7 6 G、T 4 7 A / Q 8 2 R、T 4 7 A / I 8 6 T、  
 T 4 7 A / V 8 9 D、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / Q 7 2 H、S 6 7 L / R 7 6 G、  
 S 6 7 L / Q 8 2 R、S 6 7 L / I 8 6 T、S 6 7 L / V 8 9 D、Q 7 2 H / R 7 6 G、  
 Q 7 2 H / Q 8 2 R、Q 7 2 H / I 8 6 T、Q 7 2 H / V 8 9 D、R 7 6 G / Q 8 2 R、  
 R 7 6 G / I 8 6 T、R 7 6 G / V 8 9 D、Q 8 2 R / I 8 6 T、Q 8 2 R / V 8 9 D 又  
 は I 8 6 T / V 8 9 D を含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のバリエーション PD -  
 L 2 ポリペプチド。

10

## 【0454】

16. アミノ酸改変 H 1 5 Q / S 6 2 L / Q 8 2 R、H 1 5 Q / S 6 2 L / V 8 9 D、  
 H 1 5 Q / Q 8 2 R / V 8 9 D、または S 6 2 L / Q 8 2 R / V 8 9 D を含む、実施形態  
 1 ~ 1 1 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

## 【0455】

17. アミノ酸改変 H 1 5 Q / T 4 7 A / K 6 5 R / S 6 7 L / Q 8 2 R / V 8 9 D を  
 含む、実施形態 1 ~ 1 6 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

## 【0456】

18. I g V ドメインまたはその特異的断片、及び I g C ドメインまたはその特異的断  
 片を含むか、またはそれから構成される、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれかに記載のバリエーション  
 PD - L 2 ポリペプチド。

20

## 【0457】

19. SEQ ID NO : 5 6 ~ 1 0 6、1 0 8 ~ 1 1 4、1 1 6 ~ 1 3 2 のいずれ  
 かに記載のアミノ酸の配列もしくはその特異的結合断片、または SEQ ID NO : 5  
 6 ~ 1 0 6、1 0 8 ~ 1 1 4、1 1 6 ~ 1 3 2 のいずれかに対して少なくとも 9 5 % の配  
 列同一性を示しかつ一つもしくは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列もしくはそ  
 の特異的結合断片を含むか、またはそれから構成される、実施形態 1 ~ 1 8 のいずれかに  
 記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

## 【0458】

20. I g V ドメインまたはその特異的結合断片を含むか、またはそれから構成される  
 、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

30

## 【0459】

21. I g V ドメインまたはその特異的結合断片が、バリエーション PD - L 2 ポリペプチ  
 ドの唯一の PD - L 2 部分である、実施形態 1 ~ 1 7 及び 2 0 のいずれか一つに記載のバ  
 リエーション PD - L 2 ポリペプチド。

## 【0460】

22. SEQ ID NO : 1 3 3 ~ 1 8 3、1 8 5 ~ 1 9 1、1 9 3 ~ 2 0 9、2 6  
 8 ~ 3 1 8、3 2 0 ~ 3 4 3 のいずれかに記載のアミノ酸の配列もしくはその特異的結合  
 断片、または SEQ ID NO : 1 3 3 ~ 1 8 3、1 8 5 ~ 1 9 1、1 9 3 ~ 2 0 9、  
 2 6 8 ~ 3 1 8、3 2 0 ~ 3 4 3 のいずれかに対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を示  
 しかつ一つもしくは複数のアミノ酸改変を含むアミノ酸配列もしくはその特異的結合断片  
 を含むか、またはそれから構成される、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれかに記載のバリエーション  
 PD - L 2 ポリペプチド。

40

## 【0461】

23. I g C ドメインまたはその特異的結合断片が、バリエーション PD - L 2 ポリペプチ  
 ドの唯一の PD - L 2 部分である、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれかに記載のバリエーション PD  
 - L 2 ポリペプチド。

## 【0462】

24. PD - 1 または R G M b のエクトドメインへの非改変 PD - L 2 の結合と比較し  
 て増加した親和性で、PD - 1 または R G M b のエクトドメインに特異的に結合する、実

50

施形態 1 ~ 2 3 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 6 3 】

2 5 . PD - 1 のエクストドメインへの非改変 PD - L 2 の結合と比較して増加した親和性で、PD - 1 のエクストドメインに特異的に結合する、実施形態 1 ~ 2 4 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 6 4 】

2 6 . PD - 1 のエクストドメイン及び R G M b のエクストドメインへの非改変 PD - L 2 の結合と比較して増加した親和性で、それぞれ PD - 1 のエクストドメイン及び R G M b のエクストドメインに特異的に結合する、実施形態 1 ~ 2 5 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

10

【 0 4 6 5 】

2 7 . R G M b の他方のエクストドメインへの非改変 PD - L 2 の結合と比較して増加した親和性で、PD - 1 のエクストドメインに特異的に結合し、減少した親和性で R G M b の他方のエクストドメインに特異的に結合する、実施形態 1 ~ 2 6 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 6 6 】

2 8 . PD - 1 のエクストドメインに対する増加した親和性が、非改変 PD - L 2 と比較して、1 . 2 倍、1 . 5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、または 6 0 倍より大きく増加する、実施形態 2 4 ~ 2 7 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

20

【 0 4 6 7 】

2 9 . R G M b のエクストドメインに対する増加した親和性が、非改変 PD - L 2 と比較して、1 . 2 倍、1 . 5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、または 6 0 倍より大きく増加する、実施形態 2 4 または実施形態 2 6 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 6 8 】

3 0 . R G M b のエクストドメインに対する減少した親和性が、非改変 PD - L 2 と比較して、1 . 2 倍、1 . 5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、または 6 0 倍より大きく減少する、実施形態 2 7 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

30

【 0 4 6 9 】

3 1 . 非改変 PD - L 2 と比較して増加した選択性で、PD - 1 のエクストドメインに特異的に結合する、実施形態 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 7 0 】

3 2 . 選択性の増加が、非改変 PD - L 2 ポリペプチドの PD - 1 への結合対 R G M b への結合の比と比較して、より大きな、バリエーションポリペプチドの PD - 1 への結合対 R G M b への結合の比を含む、実施形態 3 1 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 7 1 】

3 3 . 該比率が、少なくとも 1 . 5 倍、2 . 0 倍、3 . 0 倍、4 . 0 倍、5 . 0 倍、1 0 倍、1 5 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍もしくはそれ以上だけ、または少なくとも約 1 . 5 倍、約 2 . 0 倍、約 3 . 0 倍、約 4 . 0 倍、約 5 倍、約 1 0 倍、約 1 5 倍、約 2 0 倍、約 3 0 倍、約 4 0 倍、約 5 0 倍もしくはそれ以上だけ大きい、実施形態 3 2 に記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

40

【 0 4 7 2 】

3 4 . PD - 1 が、ヒト PD - 1 である、実施形態 9 ~ 3 3 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

【 0 4 7 3 】

3 5 . R G M b が、ヒト R G M b である、実施形態 9 ~ 3 4 のいずれかに記載のバリエーション PD - L 2 ポリペプチド。

50

## 【0474】

36. 結合活性が、非改変PD-L2と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より大きく変化（増加または減少）する、実施形態1～35のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0475】

37. 可溶性タンパク質である、実施形態1～34のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0476】

38. PD-L2膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを欠き、及び/または細胞表面で発現することができない、実施形態1～37のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0477】

39. ポリペプチドの生物学的半減期を延長する部分に連結された、実施形態1～38のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0478】

40. 多量体化ドメインに連結された、実施形態1～39のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0479】

41. Fcドメインに連結されるか、または低下したエフェクター機能を有するバリエーションFcドメインに連結される、実施形態40に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0480】

42. Fcドメインが、哺乳動物、任意でヒトであるか、またはバリエーションFcドメインが、哺乳動物、任意でヒトである非改変Fcドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、実施形態39～41のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0481】

43. Fcドメインまたはそのバリエーションが、SEQ ID NO: 211もしくはSEQ ID NO: 212に記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 211もしくはSEQ ID NO: 212に対して少なくとも85%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態41及び実施形態42のいずれか1つに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0482】

44. Fcドメインが、E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236del、G237A、S267K、N297G、V302C、及びK447del（それぞれEU番号付けによる）の中から選択される1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、実施形態41～43のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0483】

45. Fcドメインが、アミノ酸改変C220S（EU番号付けによる）を含む、実施形態40～44のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0484】

46. Fcドメインが、SEQ ID NO: 1189、1205、1206、1207、1739、1738、1739、1740のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 1189、1205、1206、1207、1739、1738、1739、1740のいずれかに対して少なくとも85%の配列同一性を示し、低下したエフェクター機能を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態40～45のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

## 【0485】

47. リンカー、任意でG4Sリンカーを介して間接的に連結された、実施形態41～

10

20

30

40

50

46のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

【0486】

48. 膜貫通ドメインをさらに含む膜貫通型免疫調節タンパク質であり、任意で該膜貫通ドメインが、バリエーションPD-L2ポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)またはその特異的結合断片に直接的または間接的に連結されている、実施形態1~47のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

【0487】

49. 膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 4の残基221~241として記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 4の残基221~241に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含む、実施形態48に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

10

【0488】

50. 細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含み、任意で該細胞質ドメインが膜貫通ドメインに直接的または間接的に連結される、実施形態48または実施形態49に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

【0489】

51. 細胞質シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 4の残基242~273として記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 4の残基242~273に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含む、実施形態50に記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

20

【0490】

52. *in vitro* T細胞アッセイにおいて非改変PD-L2と比べてIFN-(インターフェロン-)発現を増加させる、実施形態1~51のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

【0491】

53. *in vitro* T細胞アッセイにおいて非改変PD-L2と比べてIFN-(インターフェロン-)発現を減少させる、実施形態1~51のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

【0492】

54. 脱グリコシル化した、実施形態1~53のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド。

30

【0493】

55. 直接的またはリンカーを介して間接的に免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)メンバーのIgSFドメインを含む第2のポリペプチドに連結された実施形態1~54のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む、免疫調節タンパク質。

【0494】

56. IgSFドメインが、親和性改変IgSFドメインであり、該親和性改変IgSFドメインが、IgSFファミリーメンバーの非改変または野生型IgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、実施形態55に記載の免疫調節タンパク質。

40

【0495】

57. 親和性改変IgSFドメインが、1つまたは複数のその同族結合パートナー(複数可)に対し、IgSFファミリーメンバーの非改変または野生型IgSFドメインの、同じ1つまたは複数の同族結合パートナー(複数可)に対する結合と比較して変化した結合を示す、実施形態56に記載の免疫調節タンパク質。

【0496】

58. IgSFドメインが、1つまたは複数のその同族結合パートナー(複数可)に対し、同じ1つまたは複数の同族結合パートナー(複数可)に対する非改変または野生型IgSFドメインの結合と比較して増加した結合を示す、実施形態57に記載の免疫調節タ

50

ンパク質。

【0497】

59. バリエントPD-L2が第1のPD-L2バリエントであり、第2のポリペプチドのIgSFドメインが実施形態1～58のいずれかに記載の第2のバリエントPD-L2に由来するIgSFドメインであり、該第1及び第2のPD-L2バリエントが同一または異なる、実施形態56～58のいずれか1つに記載の免疫調節ポリペプチド。

【0498】

60. バリエントPD-L2ポリペプチドがPD-1またはRGMbに特異的に結合することができ、第2のポリペプチドのIgSFドメインがPD-L2バリエントポリペプチドによって特異的に結合されるもの以外の同族結合パートナーに結合することができる、実施形態55～59のいずれか1つに記載の免疫調節タンパク質。

10

【0499】

61. IgSFドメインがB7ファミリーのメンバー由来である、実施形態55～60のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0500】

62. IgSFドメインが、腫瘍で発現するリガンドに結合する腫瘍局在化部分、または炎症環境の細胞または組織で発現するリガンドに結合する炎症局在化部分である、実施形態55～60のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0501】

63. リガンドがB7H6である、実施形態62に記載の免疫調節タンパク質。

20

【0502】

64. IgSFドメインがNKp30由来である、実施形態62または実施形態63に記載の免疫調節タンパク質。

【0503】

65. IgSFドメインまたはその親和性改変IgSFドメイン、任意で第2または第3のポリペプチドが、IgVドメインであるか、またはそれを含む、実施形態55～64のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0504】

66. バリエントPD-L2ポリペプチドが、IgVドメインであるか、またはそれを含む、実施形態55～65のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

30

【0505】

67. バリエントPD-L2ポリペプチドまたは第2のポリペプチドの少なくとも1つに連結された多量体化ドメインをさらに含み、任意で、該多量体化ドメインがFcドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエントである、実施形態55～66のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0506】

68. 第2のポリペプチドのIgSFドメインが、阻害性受容体に結合するリガンドのIgSFドメイン、またはその親和性改変IgSFドメインであり、任意で親和性改変IgSFドメインが、同じ阻害性受容体への非改変IgSFドメインの結合と比較して阻害性受容体に対する結合親和性及び/または結合選択性の増加を示す、実施形態55～67のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

40

【0507】

69. 阻害性受容体がTIGITもしくはCTLA-4である、または該阻害性受容体のリガンドがCD155、CD112もしくはCD80である、実施形態68に記載の免疫調節タンパク質。

【0508】

70. 第2のポリペプチドが、

(i) SEQ ID NO: 47、344もしくは387のいずれかに記載のIgSFを含む野生型CD155、またはSEQ ID NO: 345～386、388～699、1527～1736のいずれかに記載のIgSFドメインを含むバリエントCD155

50

ポリペプチド、

( i i ) S E Q I D N O : 4 8、7 0 0 もしくは 7 9 5 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含む野生型 C D 1 1 2、または S E Q I D N O : 7 0 1 ~ 7 9 4、7 9 6 ~ 9 6 5、1 4 5 5 ~ 1 5 2 6 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 1 1 2 ポリペプチド、

( i i i ) S E Q I D N O : 2 8、1 0 3 9 もしくは 2 0 3 9 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含む野生型 C D 8 0、または S E Q I D N O : 9 6 6 ~ 9 9 8、1 0 0 0 ~ 1 0 3 8、1 0 4 0 ~ 1 0 7 2、1 0 7 4 ~ 1 1 1 2、1 1 1 4 ~ 1 1 4 6、1 1 4 7 ~ 1 1 8 6 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 8 0 ポリペプチド、

( i v ) S E Q I D N O : 3 0、1 8 1 2、1 2 5 8 もしくは 1 4 5 4 のいずれかに記載の I g S F を含む野生型 P D - L 1、または S E Q I D N O : 1 2 5 9 ~ 1 4 5 3、1 7 4 3 ~ 1 8 1 1、1 8 1 3 ~ 2 0 2 1 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション P D - L 1 ポリペプチド、

( v ) ( i ) ~ ( i v ) の S E Q I D N O のいずれかに対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を示しかつアミノ酸改変、任意でそのアミノ酸置換、挿入、及び / または欠失を含む、アミノ酸配列、または

( v i ) ( i ) ~ ( v ) のいずれかの特異的結合断片から選択される、実施形態 5 5 ~ 6 9 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 0 9 】

7 1 . 野生型 I g S F ドメインまたはそのバリエーションもしくは親和性改変 I g S F ドメインを含む第 3 のポリペプチドをさらに含む実施形態 5 5 ~ 7 0 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質であって、該親和性改変 I g S F ドメインが、該 I g S F ファミリーメンバーの非改変または野生型 I g S F ドメインと比較して、1 つまたは複数のアミノ酸改変を含み、

該第 3 のポリペプチドが第 1 及び / または第 2 のポリペプチドと同じであるか、または該第 3 のポリペプチドが第 1 及び / または第 2 のポリペプチドとは異なる、前記免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 0 】

7 2 . 第 3 のポリペプチドの I g S F ドメインが、

( i ) S E Q I D N O : 4 7、3 4 4 もしくは 3 8 7 のいずれかに記載の I g S F を含む野生型 C D 1 5 5、または S E Q I D N O : 3 4 5 ~ 3 8 6、3 8 8 ~ 6 9 9、1 5 2 7 ~ 1 7 3 6 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 1 5 5 ポリペプチド、

( i i ) S E Q I D N O : 4 8、7 0 0 もしくは 7 9 5 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含む野生型 C D 1 1 2、または S E Q I D N O : 7 0 1 ~ 7 9 4、7 9 6 ~ 9 6 5、1 4 5 5 ~ 1 5 2 6 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 1 1 2 ポリペプチド、

( i i i ) S E Q I D N O : 2 8、1 0 3 9 もしくは 2 0 3 9 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含む野生型 C D 8 0、または S E Q I D N O : 9 6 6 ~ 9 9 8、1 0 0 0 ~ 1 0 3 8、1 0 4 0 ~ 1 0 7 2、1 0 7 4 ~ 1 1 1 2、1 1 1 4 ~ 1 1 4 6、1 1 4 7 ~ 1 1 8 6 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション C D 8 0 ポリペプチド、

( i v ) S E Q I D N O : 3 0、1 8 1 2、1 2 5 8 もしくは 1 4 5 4 のいずれかに記載の I g S F を含む野生型 P D - L 1、または S E Q I D N O : 1 2 5 9 ~ 1 4 5 3、1 7 4 3 ~ 1 8 1 1、1 8 1 3 ~ 2 0 2 1 のいずれかに記載の I g S F ドメインを含むバリエーション P D - L 1 ポリペプチド、

( v ) ( i ) ~ ( i v ) の S E Q I D N O のいずれかに対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を示しかつアミノ酸改変、任意でそのアミノ酸置換、挿入、及び / または欠失を含む、アミノ酸配列、または

10

20

30

40

50

(v i) (i) ~ (v) のいずれかの特異的結合断片を含む親和性改変 I g S F ドメインである、

実施形態 7 1 に記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 1 】

7 3 . I g S F ファミリーメンバーの I g S F ドメインまたはその親和性改変 I g S F ドメインを含む少なくとも 1 つの追加のポリペプチドをさらに含む 7 0 ~ 7 2 の免疫調節タンパク質であって、該親和性改変 I g S F ドメインが、I g S F ファミリーメンバーの非改変または野生型 I g S F ドメインの結合と比較して、1 つまたは複数のアミノ酸改変を含む、前記免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 2 】

7 4 . 免疫調節タンパク質が、バリエーション P D - L 2 ポリペプチド、第 2 のポリペプチド、及び/または第 3 のポリペプチドの少なくとも 1 つに連結された多量体化ドメインをさらに含み、任意で、該多量体化ドメインが F c ドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションである、実施形態 7 1 ~ 7 3 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 3 】

7 5 . 多量体化ドメインがヘテロ二量体の形成を促進する、実施形態 6 7 ~ 7 4 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 4 】

7 6 . 多量体化ドメインが第 1 の多量体化ドメインである実施形態 4 0 ~ 4 7 のいずれかに記載の第 1 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド、及び多量体化ドメインが第 2 の多量体化ドメインである実施形態 4 0 ~ 4 7 のいずれかに記載の第 2 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチドを含む免疫調節タンパク質であって、該第 1 及び第 2 の多量体化ドメインが相互作用して第 1 及び第 2 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチドを含む多量体を形成し、任意で、該第 1 及び第 2 のバリエーション P D - L 2 ポリペプチドが同一である、前記免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 5 】

7 7 . 多量体化ドメインが第 1 の多量体化ドメインであり、第 2 の多量体化ドメインと相互作用して免疫調節タンパク質を含む多量体を形成する、実施形態 6 7 ~ 7 5 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質を含む免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 6 】

7 8 . 免疫調節タンパク質が第 1 の免疫調節タンパク質であり、第 2 の免疫調節タンパク質が第 2 の多量体化ドメインに直接的またはリンカーを介して間接的に連結され、該多量体が第 1 及び第 2 の免疫調節タンパク質を含む、実施形態 7 7 に記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 7 】

7 9 . 第 2 の免疫調節タンパク質が、請求項 6 7 ~ 7 5 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質であり、該多量体化ドメインが第 2 の多量体化ドメインである、実施形態 7 8 に記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 8 】

8 0 . 多量体が二量体である、実施形態 7 6 ~ 7 9 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 1 9 】

8 1 . ホモ二量体であり、任意で第 1 及び第 2 の多量体化ドメインが同一である、実施形態 7 6 ~ 8 0 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【 0 5 2 0 】

8 2 . 第 2 のポリペプチドがバリエーション C D 1 5 5 ポリペプチドであり、該第 1 及び/または第 2 の免疫調節タンパク質が S E Q I D N O : 1 1 9 1 ~ 1 1 9 6 のいずれかに記載の配列、または S E Q I D N O : 1 1 9 1 ~ 1 1 9 6 のいずれかに対して少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9

10

20

30

40

50

4%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態77~81のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0521】

83. ヘテロ二量体であり、任意で、第1及び第2の多量体化ドメインは、異なっている、及び/または相互作用してヘテロ二量体形成を媒介することができる、実施形態76~80のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0522】

84. 第2のポリペプチドがバリエーションCD155ポリペプチドであり、  
 該第1または第2の免疫調節タンパク質がSEQ ID NO: 1197、1198、1199、1200、1201、1203のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1197、1198、1199、1200、1201もしくは1203のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、

該第1または第2の免疫調節タンパク質の他方がSEQ ID NO: 1188、1190、1202もしくは1204のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO: 1188、1190、1202もしくは1204のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、  
 実施形態77~80及び83のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0523】

85. 第1及び/または第2の多量体化ドメインがFcドメインであるか、または低下したエフェクター機能を有するそのバリエーションであり、任意で

該Fcドメインがヒトである免疫グロブリンタンパク質のものであり、及び/または該Fc領域はヒトであるか、任意で該Fc領域が免疫グロブリンG1(IgG1)もしくは免疫グロブリンG2(IgG2)のものであり、任意でSEQ ID NO: 211もしくはSEQ ID NO: 212に記載されるか、または

該バリエーションFcドメインが野生型Fc領域に1つまたは複数のアミノ酸置換を含み、任意で野生型Fc領域と比較して低下したエフェクター機能が低下し、任意で該野生型ヒトFcがヒトIgG1のものである、  
 実施形態76~84のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0524】

86. 第1及び第2の多量体化ドメインが同一または異なる、実施形態76~85のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0525】

87. 該バリエーションFc領域が、  
 KabatのEUインデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236del、G237A、S267KまたはN297Gを含むか、または

KabatのEUインデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換R292C/N297G/V302CまたはL234A/L235E/G237Aを含む、  
 実施形態65~75、85及び86のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0526】

88. Fc領域またはバリエーションFc領域が、KababのEUインデックスに従った残基番号付けでアミノ酸置換C220Sを含む、実施形態65~75及び85~87のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

【0527】

89. Fc領域またはバリエーションFc領域が、KababのEUインデックスに従った残基番号付けでK447delを含む、実施形態65~75及び85~88のいずれかに記載の免疫調節タンパク質。

10

20

30

40

50

- 【0528】  
90．実施形態1～54のいずれかに記載のバリエーションPD-L2、または部分に連結された実施形態55～89のいずれかに記載の免疫調節タンパク質を含む、コンジュゲート。
- 【0529】  
91．部分が細胞表面の分子に特異的に結合する標的指向性部分である、実施形態90に記載のコンジュゲート。
- 【0530】  
92．標的指向性部分が、免疫細胞表面の分子に特異的に結合し、任意で該免疫細胞が、抗原提示細胞またはリンパ球である、実施形態91に記載のコンジュゲート。 10
- 【0531】  
93．標的指向性部分が、腫瘍表面の分子に結合する腫瘍局在化部分である、実施形態91に記載のコンジュゲート。
- 【0532】  
94．該部分が、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子またはナノ粒子である、実施形態90～93のいずれかに記載のコンジュゲート。
- 【0533】  
95．該部分が、抗体または抗原結合断片である、実施形態90～94のいずれかに記載のコンジュゲート。
- 【0534】  
96．コンジュゲートが、二価、四価、六価、または八価である、実施形態90～95のいずれかに記載のコンジュゲート。 20
- 【0535】  
97．融合タンパク質である、実施形態90～96のいずれかに記載のコンジュゲート。
- 【0536】  
98．実施形態1～59のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチド、実施形態55～89のいずれかに記載の免疫調節タンパク質、または実施形態90～97のいずれかに記載の融合タンパク質であるコンジュゲートをコードする核酸分子。
- 【0537】  
99．合成核酸である、実施形態98に記載の核酸分子。 30
- 【0538】  
100．cDNAである、実施形態98または実施形態99に記載の核酸分子。
- 【0539】  
101．実施形態98～100のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。
- 【0540】  
102．発現ベクターである、実施形態101に記載のベクター。
- 【0541】  
103．哺乳動物発現ベクターまたはウイルスベクターである、実施形態101または実施形態102に記載のベクター。 40
- 【0542】  
104．実施形態101～103のいずれかに記載のベクターを含む、細胞。
- 【0543】  
105．哺乳動物細胞である、実施形態104に記載の細胞。
- 【0544】  
106．ヒト細胞である、実施形態104または実施形態105に記載の細胞。
- 【0545】  
107．バリエーションPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質の産生方法であって、実施形態98～100のいずれかに記載の核酸分子または実施形態101～103のいずれかに記載のベクターを宿主細胞に、該細胞内でタンパク質を発現する条件下で導 50

入することを含む、産生方法。

【0546】

108．細胞からバリエントPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を単離または精製することをさらに含む、実施形態107に記載の方法。

【0547】

109．バリエントPD-L2バリエントポリペプチドを発現する細胞を操作する方法であって、実施形態1～54のいずれかに記載のバリエントPD-L2ポリペプチドをコードする核酸分子を宿主細胞に、該ポリペプチドが該細胞内で発現される条件下で導入することを含む、方法。

【0548】

110．実施形態1～54のいずれかに記載のバリエントPD-L2ポリペプチド、実施形態55～89のいずれかに記載の免疫調節タンパク質、実施形態90～97のいずれかに記載の融合タンパク質であるコンジュゲート、実施形態98～100のいずれかに記載の核酸分子、または実施形態101～102のいずれかに記載のベクターを発現する、操作された細胞。

10

【0549】

111．バリエントPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、実施形態110に記載の操作された細胞。

【0550】

112．バリエントPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、膜貫通ドメインを含まない、及び/または細胞の表面で発現しない、実施形態110または実施形態111に記載の操作された細胞。

20

【0551】

113．バリエントPD-L2ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、操作された細胞から分泌される、または分泌されることができ、実施形態110～112のいずれかに記載の操作された細胞。

【0552】

114．膜貫通ドメインを含む及び/または実施形態48～54のいずれかに記載の膜貫通型免疫調節タンパク質である、バリエントPD-L2ポリペプチドを含む、実施形態110または実施形態111に記載の操作された細胞。

30

【0553】

115．バリエントPD-L2ポリペプチドが、細胞の表面で発現する、実施形態110、実施形態111、または実施形態114に記載の操作された細胞。

【0554】

116．免疫細胞である、実施形態110～115のいずれかに記載の操作された細胞。

【0555】

117．免疫細胞が、抗原提示細胞（APC）またはリンパ球である、実施形態116に記載の操作された細胞。

40

【0556】

118．リンパ球であり、該リンパ球がT細胞である、実施形態110～117のいずれかに記載の操作された細胞。

【0557】

119．APCであり、該APCが人工APCである、実施形態118に記載の操作された細胞。

【0558】

120．初代細胞である、実施形態110～119のいずれかに記載の操作された細胞。

【0559】

50

1 2 1 . 哺乳動物細胞である、実施形態 1 1 0 ~ 1 2 0 のいずれかに記載の操作された細胞。

【 0 5 6 0 】

1 2 2 . ヒト細胞である、実施形態 1 1 0 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の操作された細胞。

【 0 5 6 1 】

1 2 3 . 細胞が、キメラ抗原受容体 ( C A R ) または操作された T 細胞受容体をさらに含む、実施形態 1 1 0 ~ 1 2 2 のいずれかに記載の操作された細胞。

【 0 5 6 2 】

1 2 4 . 実施形態 1 ~ 5 4 のいずれかに記載のバリエーション P D - L 2 ポリペプチド、または実施形態 5 5 ~ 8 9 のいずれかに記載の免疫調節ポリペプチド、または請求項 9 0 ~ 9 7 のいずれかに記載の融合タンパク質であるコンジュゲートをコードする核酸分子を含む、感染性物質。

10

【 0 5 6 3 】

1 2 5 . コードされたバリエーション P D - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、膜貫通ドメインを含まない、及び / またはそれが発現される細胞の表面で発現しない、実施形態 1 2 4 に記載の感染性物質。

【 0 5 6 4 】

1 2 6 . コードされたバリエーション P D - L 2 ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、それが発現される細胞から分泌される、または分泌されることができる、実施形態 1 2 4 または実施形態 1 2 5 に記載の感染性物質。

20

【 0 5 6 5 】

1 2 7 . コードされたバリエーション P D - L 2 ポリペプチドが、膜貫通ドメインを含む、実施形態 1 2 4 に記載の感染性物質。

【 0 5 6 6 】

1 2 8 . コードされたバリエーション P D - L 2 ポリペプチドが、それが発現される細胞の表面で発現する、実施形態 1 2 4 または実施形態 1 2 7 に記載の感染性物質。

【 0 5 6 7 】

1 2 9 . 細菌またはウイルスである、実施形態 1 2 4 ~ 1 2 8 のいずれかに記載の感染性物質。

30

【 0 5 6 8 】

1 3 0 . ウイルスであり、該ウイルスが腫瘍溶解性ウイルスである、実施形態 1 2 9 に記載の感染性物質。

【 0 5 6 9 】

1 3 1 . 腫瘍溶解性ウイルスが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口腔ウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パルボウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス ( V S V )、コクサッキーウイルスまたはワクシニアウイルスである、実施形態 1 3 0 に記載の感染性物質。

【 0 5 7 0 】

1 3 2 . ウイルスが、樹状細胞 ( D C ) を特異的に標的とするウイルス、及び / または樹状細胞指向性である、実施形態 1 3 0 または実施形態 1 3 1 に記載の感染性物質。

40

【 0 5 7 1 】

1 3 3 . ウイルスが、改変されたシンドビスウイルスエンベロープ産物でシェードタイプ化されたレンチウイルスベクターである、実施形態 1 3 2 に記載の感染性物質。

【 0 5 7 2 】

1 3 4 . 標的細胞の死をもたらす、または免疫応答を増強もしくは強化することができるさらなる遺伝子産物をコードする核酸分子をさらに含む、実施形態 1 2 4 ~ 1 3 3 のいずれかに記載の感染性物質。

【 0 5 7 3 】

1 3 5 . さらなる遺伝子産物が、抗がん剤、抗転移剤、抗血管新生剤、免疫調節分子、

50

免疫チェックポイント阻害剤、抗体、サイトカイン、成長因子、抗原、細胞傷害性遺伝子産物、プロアポトーシス遺伝子産物、抗アポトーシス遺伝子産物、細胞マトリックス分解性遺伝子、組織再生またはヒト体細胞をリプログラミングして多能性にするための遺伝子から選択される、実施形態 134 に記載の感染性物質。

【0574】

136 . 実施形態 1 ~ 54 のいずれかに記載のバリエーション PD - L2 ポリペプチド、実施形態 55 ~ 89 のいずれかに記載の免疫調節タンパク質、実施形態 90 ~ 97 のいずれかに記載のコンジュゲート、または実施形態 110 ~ 123 のいずれかに記載の操作された細胞、または実施形態 124 ~ 135 のいずれかに記載の感染性物質を含む、薬学的組成物。

10

【0575】

137 . 薬学的に許容し得る賦形剤を含む、実施形態 136 に記載の薬学的組成物。

【0576】

138 . 薬学的組成物が無菌である、実施形態 136 または実施形態 137 に記載の薬学的組成物。

【0577】

139 . バイアル内に実施形態 136 ~ 138 のいずれかに記載の薬学的組成物を含む製造物品。

【0578】

140 . バイアルが密封された、実施形態 139 に記載の製造物品。

20

【0579】

141 . 実施形態 136 ~ 138 のいずれかに記載の薬学的組成物及び使用説明書を含むキット。

【0580】

142 . 実施形態 139 及び実施形態 140 による製造物品及び使用説明書を含むキット。

【0581】

143 . 実施形態 136 ~ 138 のいずれかに記載の薬学的組成物を対象に投与することを含む、対象における免疫応答を調節する方法。

【0582】

144 . 実施形態 110 ~ 123 のいずれかに記載の操作された細胞を投与することを含む、対象における免疫応答を調節する方法。

30

【0583】

145 . 操作された細胞が、対象に対して自家である実施形態 144 に記載の方法。

【0584】

146 . 操作された細胞が、対象に対して同種他家である実施形態 144 に記載の方法。

【0585】

147 . 免疫応答を調節することにより、対象の疾患または状態を治療する、実施形態 143 ~ 146 のいずれかに記載の方法。

40

【0586】

148 . 免疫応答が増加される、実施形態 143 ~ 147 のいずれかに記載の方法。

【0587】

149 . 可溶性であり任意で PD - L2 膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを欠くバリエーション PD - L2 ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、対象に投与される、実施形態 143 ~ 148 のいずれかに記載の方法。

【0588】

150 . バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質がFc融合タンパク質である、実施形態 143 ~ 149 のいずれかに記載の方法。

【0589】

50

151. 実施形態1～54のいずれかに記載のバリエーションPD-L2ポリペプチドまたは実施形態55～89のいずれかに記載の免疫調節タンパク質が対象に投与される、実施形態143及び148～150のいずれかに記載の方法。

【0590】

152. 分泌可能なバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む操作された細胞が、対象に投与される、実施形態143～149のいずれかに記載の方法。

【0591】

153. 実施形態98～101及び104～111のいずれかに記載の操作された細胞が、対象に投与される、実施形態143及び148～152のいずれかに記載の方法。

【0592】

154. 任意で感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染し、分泌可能な免疫調節タンパク質が感染細胞から分泌される条件下で、分泌可能な免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする感染性物質が対象に投与される、実施形態143、147及び148のいずれかに記載の方法。

【0593】

155. 疾患または状態が、腫瘍またはがんである、実施形態143～154のいずれかに記載の方法。

【0594】

156. 疾患または状態が、黒色腫、肺癌、膀胱癌、血液学的悪性疾患、肝臓癌、脳癌、腎臓癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、脾臓癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、胃癌、筋骨格癌、頭頸部癌、消化管癌、生殖細胞癌、または内分泌及び神経内分泌癌から選択される、実施形態143～155のいずれか1つに記載の方法。

【0595】

157. 免疫応答が減少される、実施形態143～147のいずれかに記載の方法。

【0596】

158. 炎症環境の細胞または組織に局在化するIgSFドメインまたは部分に連結されたバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む免疫調節タンパク質またはコンジュゲートが対象に投与される、実施形態143～147及び157のいずれかに記載の方法。

【0597】

159. 結合分子が、抗体もしくはその抗原結合断片を含むか、または野生型IgSFドメインもしくはそのバリエーションを含む実施形態158に記載の方法。

【0598】

160. 実施形態57～77のいずれかに記載の免疫調節タンパク質または実施形態90～97のいずれかに記載のコンジュゲートが対象に投与される、実施形態143～147及び157～159のいずれかに記載の方法。

【0599】

161. 膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドが、対象に投与される、実施形態143～147及び157のいずれかに記載の方法。

【0600】

162. 実施形態50～59のいずれかに記載の膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドを含む操作された細胞が、対象に投与される、実施形態144～147及び157～161のいずれかに記載の方法。

【0601】

163. 任意で感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染し、該膜貫通型免疫調節タンパク質が感染細胞の表面で発現する条件下で、膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションPD-L2ポリペプチドをコードする感染性物質が、対象に投与される、実施形態143、147及び157のいずれかに記載の方法。

【0602】

164. 疾患または状態が、炎症性または自己免疫性の疾患または状態である、実施形態143～147及び157～163のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0603】

165. 疾患または状態が、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植、リウマチ性疾患、炎症性消化管疾患、炎症性眼疾患、炎症性神経疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己免疫性血液疾患である、実施形態 143 ~ 147 及び 157 ~ 164 のいずれかに記載の方法。

## 【0604】

166. 疾患または状態が、炎症性腸疾患、移植、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、または乾癬から選択される、実施形態 164 または実施形態 165 に記載の方法。

## 【0605】

## IX. 実施例

以下の実施例は、単に例示を目的に含まれるものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

## 【実施例 1】

## 【0606】

IgSF ドメインの変異体 DNA 構築物の生成

実施例 1 は、酵母ディスプレイライブラリーとしての酵母の表面上での翻訳及び発現のための、ヒト PD-L2 IgSF ドメインの変異体 DNA 構築物の生成について記載する。

## 【0607】

## A. 縮重ライブラリー

以下の免疫グロブリン様 V 型 (IgV) ドメインを含有する SEQ ID NO: 115 に記載の野生型ヒト PD-L2 配列:

LFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDGTGSHVNLGAIASLQKVENDTSPHRERATLLEE

QLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIHYGVAWDYKYLTLKVKA (SEQ ID NO:115)

に基づいて構築物を生成した。

## 【0608】

縮重コドンによる完全または部分的ランダム化の特定の残基を標的とするライブラリーのために、様々なアミノ酸置換をコードする特定の混合塩基セットなどの縮重コドンを、URL: rosetta design.med.unc.edu/SwiftLib/ におけるアルゴリズムを使用して生成する。一般に、変異させる位置は PDL2::PD1 複合体 (例えば、PDB: 3BP5) に関する直接的な結晶構造情報から選択した。あるいは、相同タンパク質複合体の構造が利用できない場合、相同性モデルが生成される。該構造情報を使用して、構造ビューア (URL: spdbv.vital-it.ch で利用可能) を使用して縮重コドンによる変異誘発の接触または非接触界面残基を特定することができる。

## 【0609】

ライブラリー設計の次のステップは、変異誘発のために選択された残基のどれが保存された残基であったかを特定するためのヒト、マウス、ラット、及びサル PD-L2 配列のアラインメントであることができる。この分析をふまえると、保存された標的残基は、保存的アミノ酸変化と野生型残基のみを指定した縮重コドンによって変異し得る。保存されていない残基は、より積極的に変異し得るが、野生型残基も含まれ得る。標的タンパク質の過剰な変異誘発を避けるために、野生型残基もコードする縮重コドンを配置する。同じ理由で、最大 20 位置のみを各ライブラリーの変異誘発の標的とする。変異誘発のための残基の選択は、リガンドと相互作用する標的側鎖残基、及びリガンド/カウンター構造に向かう側鎖との結合表面の 6 以内にある非接触界面残基などの接触に焦点を当てた。

## 【0610】

標的指向されたライブラリーをコードする DNA を生成するために、長さが最大 80 ヌクレオチドであり、変異誘発の標的となる残基位置に縮重コドンを含む重複オリゴは、Integrated DNA Technologies (Coralville,

10

20

30

40

50

USA) から注文することができる。オリゴヌクレオチドを滅菌水に溶解し、等モル比で混合し、95 で5分間加熱し、アニーリングのために室温までゆっくりと冷却した。次にIgVドメイン遺伝子配列の開始及び末端にアニールするIgVドメイン特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、第1のPCR産物を生成する。次に、pBYDS03クロニングベクター(Life Technologies, USA)と、BamHI及びKpnIクロニングサイト以外及び以内で40bp重複するIgVドメイン特異的オリゴヌクレオチドを使用して、前ステップの100ngのPCR産物を増幅し、エレクトロポレーション毎に少なくとも合計12µgのDNAを産生する。両方のPCRは、OneTaq 2x PCRマスターミックス(New England Biolabs, USA)を使用したポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるものであった。第2のPCR産物は、PCR精製キット(Qiagen, Germany)を使用して精製し、滅菌脱イオン水に再懸濁する。あるいは、最大200塩基対の長さのUltramers(Integrated DNA Technologies)をメガプライマーPCRと併用し(URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146891/pdf/253371.pdf>)、複数の小さな重複プライマーを使用して容易に生成することができなかつた縮重コドンの大きなストレッチを生成する。メガプライマーPCRを使用した完全長産物の生成後、酵母への相同組換えのためのpBYDS03クロニングベクターとの40塩基対重複領域を含有するDNAプライマーを使用して、変異体IgVドメインライブラリーを再度PCR増幅する。

10

20

#### 【0611】

ライブラリー挿入を準備するために、pBYDS03ベクターをBamHI及びKpnI制限酵素(New England Biolabs, USA)で消化し、大きなベクター断片をゲル精製して、滅菌脱イオン水に溶解させる。総量50µLの脱イオン水及び滅菌水中で12µgのライブラリーDNAインサートと4µgの線状ベクターを混合することで次ステップのためのエレクトロポレーション可能DNAを生成した。標的指向されたライブラリーを生成するための別の方法は、縮重コドンを含むオリゴヌクレオチドを用いて標的IgVドメインの部位特異的突然変異誘発(Multisite kit, Agilent, USA)を行うことであった。このアプローチを使用して、変異誘発のためにDNAのいくつかの特定のストレッチのみを標的とするサブライブラリーを生成することができる。これらの場合、選択ステップに進む前にサブライブラリーを混合することができる。一般に、ライブラリーサイズは $10^7 \sim 10^8$ 個のクローンの範囲であったが、ただし、サブライブラリーは $10^4 \sim 10^5$ の範囲でしかなかった。

30

#### 【0612】

##### B. ランダムライブラリー

ランダムライブラリーもまた構築して、SEQ ID NO: 115に記載のPD-L2のIgVドメインのバリエーションを特定した。野生型IgVドメインをコードするDNAを、酵母ディスプレイベクターpBYDS03のBamHIとKpnI部位との間にクロニングした。次に、該DNAをGenemorph II Kit(Agilent, USA)で変異誘発させて、ライブラリーバリエーション当たり平均3~5個のアミノ酸変化を生成した。次いで、変異誘発させたDNAを2ステップPCRによって増幅し、標的指向されたライブラリーについて上記のとおりさらに処理した。

40

#### 【実施例2】

#### 【0613】

##### 酵母へのDNAライブラリーの導入

実施例2は、酵母へのPD-L2 DNAライブラリーの導入を記載する。

#### 【0614】

ライブラリーDNAを酵母に導入するために、酵母BJ5464株(ATCC.org; ATCC number 208288)のエレクトロポレーションコンピテント細胞を調製し、基本的に記載されるように上記ステップのエレクトロポレーション可能DNA

50

を用いてGene Pulser II (Biorad, USA)でエレクトロポレーションした(Colby, D. W. et al., 2004 Methods Enzymology 388, 348-358)。唯一の例外は、改変プラスミドpBYDS03によって担持されるLEU2選択マーカーに対応するために形質転換細胞を非誘導最小選択SCD-Leu培地中で成長させたことである。1リットルのSCD-Leu培地は、14.7グラムのクエン酸ナトリウム、4.29グラムのクエン酸一水和物、20グラムのデキストロース、6.7グラムの酵母窒素ベース、及び1.6グラムのロイシン不含酵母用合成ドロップアウト培地サプリメントからなる。0.22 μmの真空濾過装置を使用して使用前に培地を滅菌濾過した。

#### 【0615】

ライブラリーサイズは、新たに回収した細胞の段階希釈物をSCD-Leu寒天プレート上にプレーティングし、次いで、1プレート当たり少なくとも50個のコロニーを生成したプレーティング由来の単一コロニーの数からライブラリーサイズを推定することによって決定した。一般に、ライブラリーサイズは、この希釈アッセイを基準として $10E8 \sim 10E9$ の形質転換体の範囲であった。エレクトロポレーションした培養物の残りをSCD-Leu中で飽和まで増殖させ、この培養物に由来する細胞をもう一度新鮮なSCD-Leu中で1/100で継代培養して、非形質転換細胞の割合を最小限に抑えるために飽和まで増殖させ、一晚増殖させ、2つ以上のライブラリーバリエーションを含む細胞からプラスミドの分離を可能にした。ライブラリーの多様性を維持するために、計算したライブラリーサイズよりも少なくとも $10 \times$ 以上の細胞を含有する接種源を使用してこの継代培養ステップを行った。第2の飽和培養物に由来する細胞を、滅菌25% (重量/体積)グリセロールを含有する新鮮培地に $10E10$ 個/mlの密度に再懸濁して、-80で凍結及び保存した(凍結ライブラリーストック)。

#### 【実施例3】

#### 【0616】

##### 酵母の選択

実施例3は、PD-L2の親和性改変バリエーションを発見する酵母の選択を記載する。

#### 【0617】

推定したライブラリーサイズの少なくとも10倍に等しい数の細胞を、個々のライブラリーストックから解凍し、非誘導SCD-Leu培地中 $0.1 \times 10E6$ 個の細胞/mlに懸濁し、一晚増殖させた。翌日、ライブラリーサイズの10倍に等しい数の細胞を2000RPMで2分間遠心分離し、誘導SCDG-Leu培地中 $0.5 \times 10E6$ 個の細胞/mlに再懸濁した。1リットルのSCDG-Leu誘導培地は、水に溶解させて0.22 μmの膜濾過装置に通して滅菌した、 $Na_2HPO_4$  5.4グラム、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  8.56グラム、ガラクトース20グラム、デキストロース2.0グラム、酵母窒素ベース6.7グラム、及びロイシン不含酵母用合成ドロップアウト培地サプリメント1.6グラムからなる。培養物を室温で1日誘導培地中で増殖させて、酵母細胞表面でライブラリータンパク質の発現を誘導した。

#### 【0618】

細胞は、同族リガンドを負荷した磁気ビーズを使用して2~3回選別し、非結合物質を減らし、その外因性組換えカウンター構造体タンパク質に結合する能力を有する全てのバリエーションPD-L2を濃縮した。これに続いて、各回において外因性カウンター構造体タンパク質染色の濃度を低下させて1~2回の蛍光活性化細胞選別(FACS)を行って、改善された結合物質を示す酵母細胞の画分を濃縮した。磁気ビーズの濃縮及びフローサイトメトリーによる選択は、基本的にMiller, K. D. et al., Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008に記載されるように実施した。

#### 【0619】

PD-L2ライブラリーと共に、標的リガンドタンパク質は、rhPD-1.Fc(すなわち、R&D Systems, USAの組換えヒトPD-1 Fc融合タンパク質)

10

20

30

40

50

であった。磁気プロテインAビーズは、New England Biolabs, USAから得た。2色フローサイトメトリーソーティングのために、Bio-Rad S3eソーターを使用した。PD-L2提示レベルを、Alexafluor 488 (Life Technologies, USA)で標識した抗ヘマグルチニン抗体でモニタリングした。rhPD-1-Fcに対するFc融合タンパク質のリガンド結合をrフィコエリスリン(PE)コンジュゲート抗ヒトIgG特異的ヤギFab (Jackson ImmunoResearch, USA)で検出した。ダブレット酵母を前方散乱(FSC)/側方散乱(SSC)パラメータを使用して除去し、そしてソートゲートは、FL1でより限定されたタグ発現結合を保持するFL2で検出されたより高いリガンド結合に基づいた。

#### 【0620】

フローサイトメトリーソートからの酵母アウトプットを、より高い特異的結合親和性についてアッセイした。ソートアウトプット酵母を増殖及び再誘導して、これらがコードする特定のIgSF親和性改変ドメインバリエーションを発現させた。次いで、この集団を、フローサイトメトリーによって、親の野生型酵母株、またはビーズアウトプット酵母集団のような任意の他の選択されたアウトプットと比較することができる。

#### 【0621】

PD-L2について、各集団を抗HA(ヘマグルチニン)タグ発現及び抗ヒトFc-PE二次で二重染色してリガンド結合を検出することによって、rPD-1-Fcの結合について2回目のFACSアウトプット(F2)を親と比較した。

#### 【0622】

選択されたバリエーションPD-L2 IgVドメインをさらに融合タンパク質としてフォーマット化し、以下に記載されるように結合活性及び機能活性について試験した。

#### 【実施例4】

#### 【0623】

Fc融合物として及び様々な免疫調節タンパク質タイプにおける選択アウトプットの再フォーマット化

実施例4は、Fc分子に融合したPD-L2の親和性改変(バリエーション)免疫グロブリン様Vタイプ(IgV)ドメイン(バリエーションIgVドメイン-Fc融合分子)を含有する免疫調節タンパク質として実施例3で同定された選択アウトプットの再フォーマット化を記載する。

#### 【0624】

最終フローサイトメトリーPD-L2ソートからのアウトプット細胞プールをSCD-Leu培地中末端密度まで増殖させた。各ソートアウトプットの細胞数の少なくとも10倍のプラスミドDNAを、酵母プラスミドDNA単離キット(Zymo Research, USA)を使用して単離した。Fc融合物について、最適なFc融合ベクターへのクローニングに好適な制限部位を付加したPCRプライマーを使用して、プラスミドDNAプレップから変異体標的IgVドメインのコーディングDNAをバッチ増幅させた。制限消化後、PCR産物を、Fc融合ベクターにライゲーションし、続いてE.coli株のXL1 Blue(Agilent, USA)またはNEB5alpha(New England Biolabs)に、供給者の指示どおりヒートショック形質転換した。あるいは、アウトプットは、Gibson Assembly Mastermix(New England Biolabs, USA)を使用してin vitro組換えを実施するためにFc融合ベクターといずれかの端に40塩基対のオーバーラップ領域を含有するプライマーによってPCR増幅され、その後、E.coli株のNEB5alphaへのヒートショック形質転換に使用された。Fc融合ベクターの例は、pFUSE-hIgG1-Fc2(InvivoGen, USA)である。

#### 【0625】

形質転換反応の希釈物を、100µg/mlカルベニシリン(Teknova, USA)を含有するLB-寒天上にプレーティングして、選択のために単一コロニーを単離した。次いで、各形質転換からの最大96個のコロニーを、96ウェルプレート内、LBプロ

10

20

30

40

50

ス (Teknova cat # L8112) 中、37 で一晚飽和まで増殖させ、そして、全てのクローン中の変異 (複数可) を特定するために各ウェルからの小アリコート (IgVドメインインサートのDNA配列決定) に供した。サービス提供会社 (Genewiz; South Plainfield, NJ) によって提供されるプロトコルを使用して、DNA配列決定用の試料調製を実施した。DNA配列決定用の試料を取り出した後、次いで残りの培養物にグリセロールを最終グリセロール含量25%まで加え、そして、後で使用するためプレートをマスタープレート (以下参照) として -20 で保存した。あるいは、DNA配列決定用の試料を、ディスポーザブル96ウェルレプリケーター (VWR, USA) を使用して、増殖させた液体培養物から固体寒天プレートへのレプリカプレティングによって生成した。これらのプレートを一晩インキュベートして成長パッチを生成し、そして、プレートをGenewizの指示通りGenewizに送った。

10

## 【0626】

Genewizで生成されたDNA配列決定データの分析後、関心対象のクローンをマスタープレートから回収し、100 μg/mlカルベニシリン (Teknova, USA) を含有する液体LBブロス中で飽和まで個々に増殖させ、次いで、PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, USA) または MidiPlus kit (Qiagen) のような標準キットを使用して、各クローンのプラスミドDNAの調製に培養物を使用した。Genewiz配列決定データからの関心対象のクローンの同定は、一般に以下のステップを包含する。第1に、DNA配列データファイル (Genewizウェブサイトからダウンロード) した。次いで、IgVドメインコード領域の開始点で始まるように全ての配列を手動でキュレーションした。次いで、URL: [www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) で利用可能な好適なプログラムを使用して、キュレーションした配列をバッチ翻訳した。次いで、翻訳した配列を、URL: [multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) で利用可能な好適なプログラムを使用してアライメントした。あるいは、Genewizで配列決定されたものを、Ugeneソフトウェア (<http://ugene.net>) を使用してアライメントを生成するために処理した。

20

## 【0627】

次いで、関心対象のクローンを以下の基準を使用してアラインメントから特定した: 1) 同一のクローンがアラインメント中に少なくとも2回生じる、及び2) 変異がアラインメント中に少なくとも2回、好ましくは別個のクローンで生じる。これらの基準のうちの少なくとも1つを満たしたクローンは、改善された結合に最も起因するソーティングプロセスによって濃縮されたクローンとみなした。

30

## 【0628】

少なくとも1つの親和性改変ドメインを有するPD-L2のIgVドメインを含有するFc融合タンパク質である組換え免疫調節タンパク質 (例えば、バリエーションPD-L2 IgV-Fc) を生成するために、コードするDNAは、以下のようにタンパク質をコードするために生成した: バリエーション (変異体) PD-L2 IgVドメイン、続いて3つのアラニン (AAA) のリンカー、続いてEU番号付けによる変異R292C、N297G及びV302C (SEQ ID NO: 211に記載の野生型ヒトIgG1 Fcに基づいたR77C、N82G及びV87Cに対応) を含有するSEQ ID NO: 1205に記載のヒトIgG1 Fc。該構築物はシステインと共有結合を形成できるいかなる抗体軽鎖も含まないため、ヒトIgG1 Fcはまた、EU番号付けによる220位のシステイン残基のセリン残基への置換 (C220S) (SEQ ID NO: 211に記載の野生型または非改変Fcに基づいた5位 (C5S) に対応) を含有する。

40

## 【実施例5】

## 【0629】

Fc融合物の発現及び精製

実施例5は、上記実施例に記載されるようなバリエーションIgV PD-L2を含有する

50

Fc融合タンパク質のハイスループット発現及び精製を記載する。

【0630】

組換えバリエーションFc融合タンパク質をExpi293発現系(Invitrogen, USA)によって浮遊適応化(suspension-adapted)ヒト胎児腎(HEK)293細胞から産生した。先のステップからの各プラスミドDNA 4 µgをOpti-MEM(Invitrogen, USA)200 µLに加え、同時にExpiFectamine 10.8 µlを別のOpti-MEM 200 µLに別々に加えた。5分後、プラスミドDNA 200 µLをExpiFectamine 200 µLと混合し、この混合物を細胞に加える前に追加で20分間さらにインキュベートした。1000万個のExpi293細胞を、10 mLの滅菌円錐底ディープ24ウェル増殖プレート(Thomson Instrument Company, USA)の別々のウェルのExpi293培地(Invitrogen, USA)容量4 mL中に分注した。プレートを、湿度95%及び8%CO<sub>2</sub>に設定された哺乳動物細胞培養インキュベーター内で120 RPMで5日間振盪した。5日間のインキュベーション後、細胞はペレット化し、培養上清は保持した。

10

【0631】

ハイスループット96ウェルフィルタープレート(Thomson Catalog number 931919)を使用して(各ウェルには60 µLのMab Select Sure沈降ビーズ(GE Healthcare cat. no. 17543801)を負荷した)、上清からタンパク質を精製した。タンパク質は4つの連続した200 µL画分の50 mMの酢酸pH 3.3で溶出した。各画分のpHは、4 µLの2 M Tris pH 8.0でpH 5.0を上回るように調節した。Nanodrop instrument(Thermo Fisher Scientific, USA)によって測定した280 nmの吸光度を使用して画分をプール及び定量し、タンパク質5 µgを変性及び非還元条件下のNUPAGEプレキャストポリアクリルアミドゲル(Life Technologies, USA)上に負荷し、その後ゲル電気泳動することによってタンパク質純度を評価した。標準的なクマシー染色を使用してゲル中でタンパク質を可視化した。

20

【実施例6】

【0632】

親和性成熟IgSFドメイン含有分子の結合の評価

A. 細胞発現カウンター構造体に対する結合

本実施例は、同族結合パートナーに対するPD-L2ドメインバリエーション免疫調節タンパク質の特異性及び親和性を評価する上記の実施例から精製されたタンパク質のFc融合結合試験について記載する。

30

【0633】

結合試験は、Jurkat/IL-2レポーター細胞(Promega Corp. USAから購入)を使用して完全長哺乳動物表面リガンドを発現するために生成されたトランスフェクトHEK293細胞で実施し、次いでPD-1を安定して発現するように形質導入した(Jurkat/PD-1細胞)。フローサイトメトリーによる染色のために、100,000個のJurkat/PD-1細胞または陰性対照(Jurkatのみ)を96ウェル丸底プレート中にプレATINGした。細胞をスピンドウンし、染色緩衝液(PBS(リン酸緩衝生理食塩水)、1%BSA(ウシ血清アルブミン)、及び0.1%アジ化ナトリウム)中に20分間再懸濁して非特異的結合を遮断した。その後、細胞を再度遠心分離し、100 nM~46 pMの各候補PD-L2バリエーションFc融合タンパク質を含有する50 µLの染色緩衝液に再懸濁した。対照として、Fcに融合した野生型PD-L2(1つのIgV及び1つのIgCドメインで構成される)の完全な細胞外ドメイン(「PD-L2の完全長ECD」)、及び野生型PD-L2のIgVドメイン(「野生型PD-L2 IgV」)、または場合によっては、抗PD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)を試験した。一次染色を氷上で45分間実施した後、染色緩衝液150 µL中で細

40

50

胞を2回洗浄した。PEコンジュゲート抗ヒトFc (Jackson ImmunoResearch, USA) を50 $\mu$ Lの緩衝液中1:150に希釈し、細胞に加えて氷上でさらに30分間インキュベートした。二次抗体を2回洗い流し、細胞を4%ホルムアルデヒド/PBS中で固定し、そして、IntelliCytフローサイトメーター (IntelliCyt Corp, USA) で試料を分析した。

#### 【0634】

平均蛍光強度 (MFI) を計算し、FlowJo Version 10ソフトウェア (FlowJo LLC, USA) を使用して、野生型PD-L2 IgVと比較した。具体的には、50nMの各バリエーションFc融合分子のJurkat/PD-1細胞への結合の平均蛍光強度 (MFI) 値によって測定される結合活性、及びPD-1へのアミノ酸置換 (複数可) を含有しない対応する野生型 (非改変) PD-L2 IgV融合分子の結合と比較したMFI比を測定した。

10

#### 【0635】

##### B. ForteBio Octet 結合アッセイ

PD-1及びPD-L2ドメインバリエーション免疫調節タンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を、ForteBio結合アッセイを使用してさらに評価した。PD-1を抗ヒト捕捉センサー (ForteBio Octet AHC) 上に個別に負荷し、完全長野生型 (非改変) PD-L2 IgVのFc融合体、PD-L2の完全長ECD、PD-L1の完全長ECD、またはバリエーションPD-L2 Fc融合分子は、100nMの単一濃度でPD-1受容体に結合した。陽性対照として、抗PD-1モノクローナル抗体 (ニボルマブ) もまた評価した。

20

#### 【0636】

バリエーションIgV-Fc融合分子と試験される各結合タンパク質の抗ヒト捕捉センサーの負荷応答を測定した。

#### 【0637】

##### C. 結果

例示的な試験されたバリエーションPD-L2 IgV-Fc融合分子の結合試験の結果を表10に示す。表10は、上記のスクリーニングで選択されたバリエーションPD-L2のIgVにおけるアミノ酸置換を示す。当該表及び図において、IgVドメインにおける例示的なアミノ酸置換及び挿入は、SEQ ID NO: 31に記載のそれぞれの参照非改変PD-L2細胞外ドメイン (ECD) 配列におけるアミノ酸位置に対応するアミノ酸位置番号により指定される。アミノ酸位置が中央に示され、対応する非改変 (例えば、野生型) アミノ酸が番号の前に列挙され、特定されたバリエーションのアミノ酸置換 (または「ins」と指定される挿入) が番号の後に列挙される。2列目は、バリエーションIgV-Fc融合分子に含まれる各バリエーションIgVのSEQ ID NO識別子を記載する。

30

#### 【0638】

表10に示すように、選択により、Jurkat/PD-1細胞へのフローサイトメトリ結合試験またはForteBio結合分析によって測定されたPD-1に対して増加した結合を示すように親和性改変された多くのPD-L2 IgSF (例えばIgV) ドメインバリエーションが特定された。図8は、様々な濃度のPD-L2バリエーションFc融合タンパク質でのJurkat/PD-1細胞への結合のMFIを示す。図8に示すように、試験したバリエーションは、PD-L2-IgVと比較して、Jurkat/PD-1への改善された結合を示し、抗PD-1モノクローナル抗体 (ニボルマブ) と同様のレベルである。

40

#### 【0639】

(表10) PD-1に対して選択したバリエーションPD-L2分子配列及び結合データ

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合		PD-1-Fcに結合したFortebioの応答単位
		50nMでのMFI	野生型PD-L2 IgV-Fcからの倍率増加	
H15Q	268	15998	1.63	0.007
N24D	269	1414	0.14	-0.039
E44D	270	2928	0.3	-0.006
V89D	271	3361	0.34	0.005
Q82R,V89D	272	44977	4.57	1.111
E59G,Q82R	273	12667	1.29	-0.028

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合		PD-1-Fcに結合したFortebioの応答単位
		50nMでのMFI	野生型PD-L2 IgV-Fcからの倍率増加	
S39I,V89D	274	26130	2.65	0.26
S67L,V89D	275	15991	1.62	0.608
S67L,I85F	276	529	0.05	-0.005
S67L,I86T	277	6833	0.69	0.141
H15Q,K65R	278	13497	1.37	-0.001
H15Q,Q72H,V89D	279	12629	1.28	0.718
H15Q,S67L,R76G	280	47201	4.8	0.418
H15Q,R76G,I85F	281	2941	0.3	-0.038
H15Q,T47A,Q82R	282	65174	6.62	0.194
H15Q,Q82R,V89D	283	49652	5.04	1.198
H15Q,C23S,I86T	284	830	0.08	-0.026
H15Q,S39I,I86T	285	1027	0.1	0.309
H15Q,R76G,I85F	286	1894	0.19	-0.006
E44D,V89D,W91R	287	614	0.06	-0.048
I13V,S67L,V89D	288	26200	2.66	1.42
H15Q,S67L,I86T	289	15952	1.62	0.988
I13V,H15Q,S67L,I86T	290	21570	2.19	1.391
I13V,H15Q,E44D,V89D	291	23958	2.43	1.399
I13V,S39I,E44D,Q82R,V89D	292	71423	7.26	0.697
I13V,E44D,Q82R,V89D	293	45191	4.59	1.283
I13V,Q72H,R76G,I86T	294	10429	1.06	0.733
I13V,H15Q,R76G,I85F	295	4736	0.48	-0.04
H15Q,S67L,R76G,I85F	297	2869	0.29	0.025
H15Q,S39I,R76G,V89D	298	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない		
H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	298	32103	3.26	0.512
H15Q,T47A,Q72H,R76G	299	16500	1.68	0.327
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G	300	73412	7.46	0.896
H15Q,E44D,R76G,I85F	301	2885	0.29	-0.013
H15Q,S39I,S67L,V89D	302	45502	4.62	1.174

10

20

30

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合		PD-1-Fcに結合したFortebioの応答単位
		50nMでのMFI	野生型PD-L2 IgV-Fcからの倍率増加	
H15Q,N32D,S67L,V89D	303	25880	2.63	1.407
N32D,S67L,V89D	304	31753	3.23	1.155
H15Q,S67L,Q72H,R76G,V89D	305	40180	4.08	1.464
H15Q,Q72H,Q74R,R76G,I86T	306	4049	0.41	0.093
G28V,Q72H,R76G,I86T	307	5563	0.57	0.003
I13V,H15Q,S39I,E44D,S67L	308	63508	6.45	0.889
E44D,S67L,Q72H,Q82R,V89D	309	51467	5.23	1.061
H15Q,V89D	310	17672	1.8	0.31
H15Q,T47A	311	26578	2.7	0.016
I13V,H15Q,Q82R	312	76146	7.74	0.655
I13V,H15Q,V89D	313	28745	2.92	1.331
I13V,S67L,Q82R,V89D	314	58992	5.99	1.391
I13V,H15Q,Q82R,V89D	315	49523	5.03	1.419
H15Q,V31M,S67L,Q82R,V89D	316	67401	6.85	1.37
I13V,H15Q,T47A,Q82R	317	89126	9.05	0.652
I13V,H15Q,V31A,N45S,Q82R,V89D	318	68016	6.91	1.327
I13V,T20A,T47A,K65X*,Q82R,V89D	319	36743	3.73	0.092
H15Q,T47A,H69L,Q82R,V89D	320	65598	6.66	1.44
I13V,H15Q,T47A,H69L,R76G,V89D	321	54340	5.52	1.719
I12V,I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	322	61207	6.22	1.453
I13V,H15Q,R76G,D77N,Q82R,V89D	323	33079	3.36	0.065
I13V,H15Q,T47A,R76G,V89D	324	53668	5.45	1.596
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	325	63320	6.43	1.418
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	325	60980	6.2	1.448
I13V,H15Q,I36V,T47A,S67L,V89D	327	52835	5.37	1.627
H15Q,T47A,K65R,S67L,Q82R,V89D	328	79692	8.1	1.453
H15Q,L33P,T47A,S67L,P71S,V89D	329	45726	4.65	1.467
I13V,H15Q,Q72H,R76G,I86T	330	24450	2.48	1.355
H15Q,T47A,S67L,Q82R,V89D	331	67962	6.9	1.479

10

20

30

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合		PD-1-Fcに結合したFortebioの応答単位
		50nMでのMFI	野生型PD-L2 IgV-Fcからの倍率増加	
F2L,H15Q,D46E,T47A,Q72H,R76G,Q82R,V89D	332	23039	2.34	1.045
I13V,H15Q,L33F,T47A,Q82R,V89D	333	62254	6.32	1.379
H15Q,N24S,T47A,Q72H,R76G,V89D	335	32077	3.26	0.4
I13V,H15Q,E44V,T47A,Q82R,V89D	336	61005	6.2	1.329
H15Q,N18D,T47A,Q72H,V73A,R76G,I86T,V89D	337	48317	4.91	0.475
I13V,H15Q,T37A,E44D,S48C,S67L,Q82R,V89D	338	47605	4.84	1.255
H15Q,L33H,S67L,R76G,Q82R,V89D	339	62326	6.33	1.507
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	340	49016	4.98	1.477
H15Q,S39L,E44D,Q72H,V75G,R76G,Q82R,V89D	341	43713	4.44	0.646
H15Q,T47A,S67L,R76G,Q82R,V89D	342	71897	7.3	1.539
I13V,H15Q,T47A,S67L,Q72H,R76G,Q82R,V89D	343	71755	7.29	1.536
野生型 PD-L2 IgV	115	9843	1	-0.024
PD-L2の完全長ECD	31	2145	0.22	0.071
PD-L1の完全長ECD (R&D Systems)	30	23769	2.41	1.263
抗PD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)	-	87002	8.84	0.899

10

20

30

40

50

\* 記載位置での終止コドン

【実施例 7】

【0640】

混合リンパ球反応 (MLR) を用いた親和性成熟 IgSFドメイン含有分子の活性の評価

本実施例は、ヒト初代T細胞の *in vitro* アッセイにおけるFc融合変異体タンパク質の生理活性の特性決定について記載する。

【0641】

可溶性バリエーションPD-L2 IgV-Fcの生理活性を、ヒト混合リンパ球反応 (MLR) で試験した。ヒト初代樹状細胞 (DC) を、Ex-Vivo 15培地 (Lonza, Switzerland) 中、50ng/mLのrIL-4 (R&D Systems, USA) 及び80ng/mLのrGM-CSF (R&D Systems, USA) と共に7日間 *in vitro* で、PBMC (Bentech Bio, USA) から単離した単球を培養することにより生成した。DC成熟を完全に誘導するため、リポ多糖 (LPS) (InvivoGen Corp., USA) を6日目にDC培養液に100ng/mLで加え、細胞をさらに24時間インキュベートした。およそ、最終容量200µLのEx-Vivo 15培地の96ウェル丸底プレート中で、10,000個の成熟DC及び100,000個の精製同種CD4+T細胞 (Bentech Bio, USA) をいくつかの濃度のバリエーションPD-L2 IgV-Fc融合タンパク質と共培養した。無関係のヒトIgGまたは培地のみ (「添加なし」と記載) を陰性対照として使用した。陽性対照として、野生型PD-L2-Fc (完全PD-L2細胞外ドメイン)、野生型PD-L2 IgV-Fc、及びまたは陽性対照の抗PD-1モノクローナル抗体 (ニボルマブ) のいずれかを評価した。5日目、培養上清中のIFN- $\gamma$ 分泌を、ヒトIFN- $\gamma$  Duo set ELISAキット (R&D Systems, USA) を使用して分析した。BioTek Cytationマルチモードマイクロプレートリーダー (BioTek Corp., USA) で光学濃度を測定し、IFN- $\gamma$  Duo setキット (R&D Systems, USA) に含まれる滴定rIFN- $\gamma$  標準に対して定量した。

【0642】

例示的な試験したバリエーション PD-L2 IgV-Fc の生理活性試験の結果は表 11 に示され、バリエーション IgV-Fc 融合分子の試験濃度での培養上清中の IFN- $\gamma$  の算出レベル (pg/mL) を記載する。また、表 11 には、アミノ酸置換 (複数可) を含まない対応する非改変 (野生型) IgV-Fc 融合分子の IFN- $\gamma$  レベルと比較した各バリエーション IgV-Fc 融合分子の IFN- $\gamma$  レベルの倍数増加が示される。バリエーションは、SEQ ID NO: 31 に記載の非改変 (野生型) PD-L2 ECD 配列の位置に対応する位置を基準として PD-L2 の IgV におけるアミノ酸置換を基準に特定する。

【0643】

表 11 の例示的なバリエーション PD-L2 IgV-Fc 融合タンパク質を、図 9 及び図 10 に記載のように様々な増加する濃度での MLR でさらに試験した。図 9 に示すように、例示的なバリエーション PD-L2 IgV-Fc 分子は、MLR アッセイにおいて IFN- $\gamma$  産生を増加させる改善された活性を示した。図 9 及び 10 に示すように、試験した例示的なバリエーション PD-L2 IgV-Fc 融合分子は、MLR アッセイにおいてニボルマブに匹敵する活性を示す。

【0644】

(表 11) MLR において PD-1 に対して選択した PD-L2 バリエーションの生理活性データ

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	IFN $\gamma$ レベル pg/mL	野生型 PD-L2 IgV-Fc からの倍率増加
H15Q	268	1817.1	1.32
N24D	269	1976.3	1.44
E44D	270	1499.4	1.09
V89D	271	1168.1	0.85
Q82R,V89D	272	1617	1.17
E59G,Q82R	273	1511.3	1.1
S39I,V89D	274	1314.5	0.95
S67L,V89D	275	1230.1	0.89

10

20

30

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	IFN $\gamma$ レベル pg/mL	野生型 PD-L2 IgV-Fc からの 倍率増加
S67L,I85F	276	1281.9	0.93
S67L,I86T	277	1020.4	0.74
H15Q,K65R	278	1510.8	1.1
H15Q,Q72H,V89D	279	1272.2	0.92
H15Q,S67L,R76G	280	1426.2	1.04
H15Q,R76G,I85F	281	1725.7	1.25
H15Q,T47A,Q82R	282	1317.9	0.96
H15Q,Q82R,V89D	283	1081.2	0.79
H15Q,C23S,I86T	284	1847.2	1.34
H15Q,S39I,I86T	285	1415.2	1.03
H15Q,R76G,I85F	286	1437.8	1.04
E44D,V89D,W91R	287	1560.1	1.13
I13V,S67L,V89D	288	867.5	0.63
H15Q,S67L,I86T	289	1034.2	0.75
I13V,H15Q,S67L,I86T	290	1014.4	0.74
I13V,H15Q,E44D,V89D	291	1384.2	1.01
I13V,S39I,E44D,Q82R,V89D	292	935.6	0.68
I13V,E44D,Q82R,V89D	293	1009.5	0.73
I13V,Q72H,R76G,I86T	294	1953	1.42
I13V,H15Q,R76G,I85F	295	1528.5	1.11
H15Q,S67L,R76G,I85F	297	1318.7	0.96
H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	298	1599.6	1.16
H15Q,T47A,Q72H,R76G	299	1462.5	1.06
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G	300	1469.8	1.07
H15Q,E44D,R76G,I85F	301	1391.6	1.01
H15Q,S39I,S67L,V89D	302	1227	0.89
H15Q,N32D,S67L,V89D	303	1285.7	0.93
N32D,S67L,V89D	304	1194	0.87
H15Q,S67L,Q72H,R76G,V89D	305	1061.2	0.77
H15Q,Q72H,Q74R,R76G,I86T	306	933.8	0.68
G28V,Q72H,R76G,I86T	307	1781.6	1.29
I13V,H15Q,S39I,E44D,S67L	308	1256.9	0.91
E44D,S67L,Q72H,Q82R,V89D	309	1281.4	0.93
H15Q,V89D	310	1495.4	1.09
H15Q,T47A	311	1637.2	1.19
I13V,H15Q,Q82R	312	1432.9	1.04
I13V,H15Q,V89D	313	1123	0.82
I13V,S67L,Q82R,V89D	314	1372.8	1

10

20

30

40

PD-L2 変異	SEQ ID NO (IgV)	IFN $\gamma$ レベル pg/mL	野生型 PD-L2 IgV-Fc からの倍率増加
I13V,H15Q,Q82R,V89D	315	1596.6	1.16
H15Q,V31M,S67L,Q82R,V89D	316	1206.5	0.88
I13V,H15Q,T47A,Q82R	317	1703.3	1.24
I13V,H15Q,V31A,N45S,Q82R,V89D	318	1723.1	1.25
I13V,T20A,T47A,K65X,Q82R,V89D	319	1378.8	1
H15Q,T47A,H69L,Q82R,V89D	320	1732.5	1.26
I13V,H15Q,T47A,H69L,R76G,V89D	321	1075.5	0.78
I12V,I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	322	1533.2	1.11
I13V,H15Q,R76G,D77N,Q82R,V89D	323	1187.9	0.86
I13V,H15Q,T47A,R76G,V89D	324	1253.7	0.91
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	325	1445.5	1.05
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	325	1737	1.26
I13V,H15Q,I36V,T47A,S67L,V89D	327	1357.4	0.99
H15Q,T47A,K65R,S67L,Q82R,V89D	328	1335.3	0.97
H15Q,L33P,T47A,S67L,P71S,V89D	329	1289.1	0.94
I13V,H15Q,Q72H,R76G,I86T	330	1221	0.89
H15Q,T47A,S67L,Q82R,V89D	331	1197.1	0.87
F2L,H15Q,D46E,T47A,Q72H,R76G,Q82R,V89D	332	1170.7	0.85
I13V,H15Q,L33F,T47A,Q82R,V89D	333	1468.4	1.07
I13V,H15Q,T47A,E58G,S67L,Q82R,V89D	334	836.1	0.61
H15Q,N24S,T47A,Q72H,R76G,V89D	335	1091.8	0.79
I13V,H15Q,E44V,T47A,Q82R,V89D	336	1270.5	0.92
H15Q,N18D,T47A,Q72H,V73A,R76G,I86T,V89D	337	1065.8	0.77
I13V,H15Q,T37A,E44D,S48C,S67L,Q82R,V89D	338	1751.7	1.27
H15Q,L33H,S67L,R76G,Q82R,V89D	339	1502	1.09
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	340	1088.1	0.79
H15Q,S39I,E44D,Q72H,V75G,R76G,Q82R,V89D	341	940.9	0.68
H15Q,T47A,S67L,R76G,Q82R,V89D	342	1097.8	0.8
I13V,H15Q,T47A,S67L,Q72H,R76G,Q82R,V89D	343	1559.6	1.13
野生型 PD-L2 IgV	115	1376.8	1
PD-L2の完全長ECD	31	1173.2	0.85
PD-L1の完全長ECD	30	2190.9	1.59
ニボルマブ(抗PD-1)	-	418.9	0.3

## 【実施例 8】

## 【0645】

## 追加の親和性改変 I g S F ドメイン

本実施例は、免疫活性化及び阻害の両方で実証された二重の役割を有する免疫シナプス ( I S ) の他の構成成分である追加の親和性改変 C D 8 0 ( B 7 - 1 )、P D - L 1、C D 1 5 5 及び C D 1 1 2、及び C D 8 6 ( B 7 - 2 ) 免疫調節タンパク質の設計、作成、及びスクリーニングについて記載する。親和性改変 N K p 3 0 パリアントもまた生成及びスクリーニングした。これらの実施例は、I g S F ドメインの親和性改変により、免疫学的活性の増加及び減少の両方に作用できるタンパク質が生成されることを証明する。これらのドメインの様々な組み合わせは、パリアント親和性改変 P D - L 2 とペアで融合 ( すなわち、スタック状 ) し、I I 型免疫調節タンパク質を形成し、免疫調節活性を達成する。

## 【0646】

酵母ディスプレイライブラリーとしての翻訳及び発現のためのヒト C D 8 0 の E C D ドメイン、または P D - L 1、C D 1 5 5 及び C D 1 1 2 の I g V ドメインのパリアントを

10

20

30

40

50

コードする変異体DNA構築物を、実質的に実施例1に記載されるように生成した。縮重コドンによる完全または部分的ランダム化のための特定の残基を標的とする標的ライブラリー及び/またはランダムライブラリーを構築して、実質的に実施例1に記載されるように、CD80 (SEQ ID NO: 2039) のIgVのパリアント、PD-L1 (SEQ ID NO: 1454) のECDまたはIgVのパリアント、CD155 (SEQ ID NO: 387) のIgVのパリアント、及びCD112 (SEQ ID NO: 795) のIgVのパリアントを特定した。同様の方法をさらに使用して、NKp30 (SEQ ID NO: 1238) のIgC様ドメインのライブラリーを生成した。

【0647】

縮重またはランダムライブラリーDNAを実質的に実施例2に記載されるように酵母に導入して、酵母ライブラリーを生成した。該ライブラリーを使用して、実質的に実施例3に記載されるように、CD80、PD-L1、CD155、CD112、CD86 (B7-2)、及びNKp30の親和性改変パリアントを発現する酵母を選択した。実質的に実施例3に記載されるように、細胞を処理して非結合物質を減らし、外因性組換えカウンター構造体タンパク質に結合する能力を有するCD80、PD-L1、CD155またはCD112、CD86 (B7-2)、及びNKp30パリアントを濃縮した。

【0648】

CD80、CD86、及びNKp30ライブラリーによって、標的リガンドタンパク質は、R&D Systems (USA) から供給され、以下のとおりである：ヒト rCD28.Fc (すなわち、組換えCD28-Fc融合タンパク質)、rPDL1.Fc、rCTLA4.Fc、及びrB7H6.Fc。実質的に実施例3に記載されるように、2色フローサイトメトリーを実施した。フローサイトメトリーソートからの酵母アウトプットを、より高い特異的結合親和性についてアッセイした。ソートアウトプット酵母を増殖及び再誘導して、これらがコードする特定のIgSF親和性改変ドメインパリアントを発現させた。次いで、この集団を、フローサイトメトリーによって、親の野生型酵母株、またはビーズアウトプット酵母集団のような任意の他の選択されたアウトプットと比較することができる。

【0649】

B7-H6への結合のために選択したNKp30酵母パリアントの場合、F2ソートアウトプットは、16.6nMのrB7H6.Fcで染色した場合、533のMFI値を示した一方、同じ濃度のrB7H6.Fcで染色した場合、親NKp30系統のMFIは90と測定された(6倍の改善)。

【0650】

特定したNKp30パリアントの中には、SEQ ID NO: 54に記載の位置に対応するNKp30細胞外ドメインの位置に基づいて変異L30V/A60V/S64P/S86Gを含有するパリアントがあった。

【0651】

表12A~Bで提供されるCD80パリアントの場合、CD80ライブラリーは、所望のカウンター構造体CTLA4を使用した正の選択と、カウンター構造体CD28を使用した負の選択で構成された。

【0652】

表13Aで提供されるCD155パリアントの場合、TIGIT、CD96、及びCD226のそれぞれに対して個別にCD155ライブラリーを選択した。表13B~Fで提供されるCD155パリアントの場合、選択は、所望のカウンター構造体TIGIT及びCD96を使用した2つの正の選択と、それに続いてCD226を除いて選択するカウンター構造体CD226を使用した1つの負の選択を伴い、パリアントCD155の結合特異性を改善した。選択は、カウンター構造体(TIGIT/CD96)の濃縮物を除き、基本的に上記の実施例3に記載されるように実施し、リードの同定を最適化するために、正のソートの選択ストリンジェンシーを変更した。負の選択のためのCD226の濃度は100nMに保たれた。

10

20

30

40

50

## 【0653】

表14Aで提供されるCD112バリエーションの場合、TIGIT、CD112R、及びCD226のそれぞれに対して個別にCD112ライブラリーを選択した。表14B~14Cで提供される追加のCD112バリエーションの場合、選択は、所望のカウンター構造体TIGIT及びCD112Rを使用した2つの正の選択と、それに続いてCD226を除いて選択するカウンター構造体CD226を使用した1つの負の選択を伴い、バリエーションCD112の結合特異性を改善した。選択は、カウンター構造体(TIGIT/CD112R)の濃縮物を除き、基本的に上記の実施例3に記載されるように実施し、リードの同定を最適化するために、正のソートの選択ストリンジェンシーを変更した。負の選択のためのCD226の濃度は100nMに保たれた。

10

## 【0654】

表15で提供されるPD-L1バリエーションの場合、PD-1に対して酵母ディスプレイ標的指向されたライブラリーまたはランダムPD-L1ライブラリーを選択した。これに続いて、外因性カウンター構造体タンパク質染色を使用した2~3回のフローサイトメトリーソーティングを行って、改善された結合物質を示す酵母細胞の画分を濃縮した。あるいは、PD-L1について、選択は、ヒトrCD80.Fc(すなわち、R&D Systems, USAのヒト組換えCD80 Fc融合タンパク質)によって実施した。主としてPD-1について記載されるように選択を実施した。磁気ビーズの濃縮及びフローサイトメトリーによる選択は、基本的にMiller K.D., Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008に記載のとおりである。表15A~BのPD-L1バリエーションは、細胞発現カウンター構造体への結合について評価した。上記のスクリーニングで特定された追加のPD-L1バリエーションを表15Cに示す。

20

## 【0655】

実質的に実施例4に記載されるように、例示的な選択アウトプットは、それぞれがFc分子に融合したCD80の親和性改変(バリエーション)IgV、PD-L1のバリエーションIgV、CD155のバリエーションIgV、CD112のバリエーションIgV(バリエーションECD-Fc融合分子またはバリエーションIgV-Fc融合分子)を含有する免疫調節タンパク質として再フォーマット化し、Fc融合タンパク質は、実質的に実施例5に記載されるように発現及び精製した。

30

## 【0656】

次に、実質的に実施例6に記載されるように、例示的なIgSFドメインバリエーションの細胞発現カウンター構造体への結合を評価した。同族結合パートナーを発現する細胞を産生し、実質的に実施例6に記載されるように結合試験及びフローサイトメトリーを実施した。加えて、Fc融合バリエーションタンパク質の生理活性を、実質的に実施例6に記載される混合リンパ球反応(MLR)アッセイまたは抗CD3共固定化アッセイのいずれかによって特性決定した。

## 【0657】

上記のように、各表について、例示的なアミノ酸置換は、それぞれの参照非改変ECD配列に対応するアミノ酸位置番号によって指定される(表2)。アミノ酸位置が中央に示され、対応する非改変(例えば、野生型)アミノ酸が番号の前に列挙され、特定されたバリエーションのアミノ酸置換が番号の後に列挙(または番号によって指定されて挿入)される。

40

## 【0658】

また、同族カウンター構造体リガンドを発現するように操作された細胞への各バリエーションFc融合分子の結合の平均蛍光強度(MFI)値によって測定した結合活性、及び同じ細胞発現カウンター構造体リガンドへのアミノ酸置換を含有しない対応する非改変Fc融合分子の結合と比較したMFI比も示した。T細胞の活性を調節するバリエーションFc融合分子の機能的活性も、i)抗CD3と共固定化した記載のバリエーションFc融合分子によって、またはii)MLRアッセイにおいて記載のバリエーションFc融合分子によって、生成

50

した培養上清中のIFN- $\gamma$ の算出レベル(pg/mL)に基づいて示される。表は、機能的アッセイにおいて対応する非改変ECD-FcまたはIgV-Fcと比較した各バリエーションECD-FcまたはIgV-Fcによって産生されたIFN- $\gamma$ の比率も示す。

【0659】

表12A~15に示すように、選択により、少なくとも1つの、場合によっては2つ以上の同族カウンター構造体リガンドの増加した結合を示すように親和性を改変した多数のPD-L1、CD155、CD112、及びCD80 IgSFドメインバリエーションが特定された。加えて、結果は、バリエーション分子の親和性改変もまた、分子のフォーマットに応じて免疫学的活性を増加及び減少させる改善された活性を示したことを示した。

【0660】

(表12A)CTLA4、CD28またはPD-L1でトランスフェクトしたHEK293細胞へのバリエーションCD80の結合

CD80 変異	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4: CD28 の比
		66.6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	66.6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	22.2nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	
L70P	1114	試験せず						
I30F/L70P	1115	試験せず						
Q27H/T41S/A71D	1116	368176	2.3	25051	1.01	24181	N/A	14.7
I30T/L70R	1117	2234	0.0	2596	0.10	5163	N/A	0.9
T13R/C16R/L70Q/A71D	1118	197357	1.2	16082	0.65	9516	N/A	12.3
T57I	1119	393810	2.4	23569	0.95	3375	N/A	16.7
M43I/C82R	1120	3638	0.0	3078	0.12	7405	N/A	1.2
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	1121	175235	1.1	3027	0.12	6144	N/A	57.9
I30V/T57I/L70P/A71D/A91T	1122	116085	0.7	10129	0.41	5886	N/A	11.5
V22I/L70M/A71D	1123	163825	1.0	22843	0.92	33404	N/A	7.2
N55D/L70P/E77G	1124	試験せず						
T57A/I69T	1125	試験せず						
N55D/K86M	1126	3539	0.0	3119	0.13	5091	N/A	1.1
L72P/T79I	1127	50176	0.3	3397	0.14	6023	N/A	14.8
L70P/F92S	1128	4035	0.0	2948	0.12	6173	N/A	1.4
T79P	1129	2005	0.0	2665	0.11	4412	N/A	0.8
E35D/M47I/L65P/D90N	1130	4411	0.0	2526	0.10	4034	N/A	1.7
L25S/E35D/M47I/D90N	1131	61265	0.4	4845	0.20	20902	N/A	12.6
Q27X*/S44P/I67T/P74S/E81G/E95D	1132	195637	1.2	17524	0.71	17509	N/A	11.2
A71D	1133	220090	1.4	16785	0.68	29642	N/A	13.1
T13A/Q27X*/I61N/A71D	1134	195061	1.2	17519	0.71	21717	N/A	11.1
E81K/A91S	1135	98467	0.6	3309	0.13	44557	N/A	29.8
A12V/M47V/L70M	1136	81616	0.5	7400	0.30	31077	N/A	11.0
K34E/T41A/L72V	1137	88982	0.6	3755	0.15	35293	N/A	23.7
T41S/A71D/V84A	1138	103010	0.6	5573	0.22	83541	N/A	18.5
E35D/A71D	1139	106069	0.7	18206	0.73	40151	N/A	5.8
E35D/M47I	1140	353590	2.2	14350	0.58	149916	N/A	24.6
K36R/G78A	1141	11937	0.1	2611	0.11	5715	N/A	4.6
Q33E/T41A	1142	8292	0.1	2442	0.10	3958	N/A	3.4
M47V/N48H	1143	207012	1.3	14623	0.59	145529	N/A	14.2

10

20

30

40

CD80 変異	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4: CD28 の比
		66. 6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	66. 6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	22. 2nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	
M47L/V68A	1144	74238	0.5	13259	0.53	11223	N/A	5.6
S44P/A71D	1145	8839	0.1	2744	0.11	6309	N/A	3.2
Q27H/M43I/A71D/R73S	1146	136251	0.8	12391	0.50	8242	N/A	11.0
E35D/T57I/L70Q/A71D	1148	121901	0.8	21284	0.86	2419	N/A	5.7
M47I/E88D	1149	105192	0.7	7337	0.30	97695	N/A	14.3
M42I/I61V/A71D	1150	54478	0.3	6074	0.24	4226	N/A	9.0
P51A/A71D	1151	67256	0.4	4262	0.17	5532	N/A	15.8
H18Y/M47I/T57I/A71G	1152	136455	0.8	20081	0.81	13749	N/A	6.8
V20I/M47V/T57I/V84I	1153	183516	1.1	26922	1.08	3583	N/A	6.8
WT	2039	161423	1.0	24836	1.00	試験 せず	N/A	6.5

\* 記載位置での終止コドン

【 0 6 6 1 】

(表 1 2 B) CTLA4、CD28またはPD-L1でトランスフェクトしたHEK293細胞へのパリアントCD80の結合

CD80 変異	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4: CD28 の比
		66. 6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	66. 6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	22. 2nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	
V20I/M47V/A71D	1154	149937	7.23	15090	9.33	9710	5.48	9.9
A71D/L72V/E95K	1155	140306	6.77	6314	3.90	8417	4.75	22.2
V22L/E35G/A71D/L72P	1156	152588	7.36	8150	5.04	1403	0.79	18.7
E35D/A71D	1157	150330	7.25	14982	9.26	13781	7.77	10.0
E35D/I67L/A71D	1158	146087	7.04	11175	6.91	9354	5.28	13.1
T13R/M42V/M47I/A71D	1160	108900	5.25	16713	10.33	1869	1.05	6.5
E35D	1161	116494	5.62	3453	2.13	25492	14.38	33.7
E35D/M47I/L70M	1162	116531	5.62	14395	8.90	49131	27.71	8.1
E35D/A71L72V	1163	134252	6.47	11634	7.19	13125	7.40	11.5
E35D/M43L/L70M	1164	102499	4.94	3112	1.92	40632	22.92	32.9
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	1165	83139	4.01	5406	3.34	9506	5.36	15.4
E35D/D46V/L85Q	1166	85989	4.15	7510	4.64	38133	21.51	11.4
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D	1167	59793	2.88	14011	8.66	1050	0.59	4.3
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	1159	85117	4.10	10317	6.38	1452	0.82	8.3
M47V/I69F/A71D/V83I	1168	76944	3.71	15906	9.83	3399	1.92	4.8
E35D/T57A/A71D/L85Q	1169	85724	4.13	3383	2.09	1764	0.99	25.3
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	1170	70878	3.42	6487	4.01	8026	4.53	10.9
E35D/M47L	1171	82410	3.97	11508	7.11	58645	33.08	7.2
E23D/M42V/M43I/I58V/L70R	1172	37331	1.80	10910	6.74	2251	1.27	3.4
V68M/L70M/A71D/E95K	1173	56479	2.72	10541	6.51	38182	21.53	5.4

10

20

30

40

CD80 変異	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4:CD28 の比
		66. 6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	66. 6nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	22. 2nM での MFI	WTに 対する 倍率変化	
N55I/T57I/I69F	1174	2855	0.14	1901	1.17	14759	8.32	1.5
E35D/M43I/A71D	1175	63789	3.08	6369	3.94	27290	15.39	10.0
T41S/T57I/L70R	1176	59844	2.89	4902	3.03	19527	11.01	12.2
H18Y/A71D/L72P/E88V	1177	68391	3.30	8862	5.48	1085	0.61	7.7
V20I/A71D	1178	60323	2.91	10500	6.49	3551	2.00	5.7
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	1179	59025	2.85	5484	3.39	10662	6.01	10.8
A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V	1180	63738	3.07	7411	4.58	1221	0.69	8.6
V22L/E35D/M43L/A71G/D76H	1181	2970	0.14	1498	0.93	1851	1.04	2.0
E35G/K54E/A71D/L72P	1182	71899	3.47	3697	2.29	1575	0.89	19.4
L70Q/A71D	1183	45012	2.17	18615	11.50	1692	0.95	2.4
A26E/E35D/M47L/L85Q	1184	40325	1.94	2266	1.40	55548	31.33	17.8
D46E/A71D	1185	69674	3.36	16770	10.36	22777	12.85	4.2
Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W	1186	3379	0.16	2446	1.51	18863	10.64	1.4
WT CD80 IgV Fc	2039	20739	1.00	1618	1.00	1773	1.00	12.8
WT CD80 ECD Fc	-	72506	3.50	3072	1.90	4418	2.49	23.6

【 0 6 6 2 】

(表 1 3 A) 同族結合パートナーに対して選択したバリエーション CD 1 5 5 分子配列、結合データ、及び共刺激生理活性データ。

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	CD226 tfxn MFI (CD226 MFI 親比率)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 親比率)	CD96 MFI (CD96 MFI 親比率)	モック Expi293 MFI (モック MFI 親比率)	抗CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗CD3 IFN- $\gamma$ 親比率)
P18S, P64S, F91S	388	497825 (133.7)	247219 (91.1)	140065 (45.4)	3528 (1.2)	270.1 (0.7)
P18S, F91S, L104P	389	26210 (7.0)	75176 (27.7)	10867 (3.5)	2130 (0.7)	364.2 (0.9)
L44P	390	581289 (156.1)	261931 (96.5)	152252 (49.4)	3414 (1.2)	277.6 (0.7)
A56V	391	455297 (122.3)	280265 (103.2)	161162 (52.2)	2601 (0.9)	548.2 (1.4)
P18L, L79V, F91S	392	5135 (1.4)	4073 (1.5)	3279 (1.1)	2719 (0.9)	1241.5 (3.2)
P18S, F91S	393	408623 (109.8)	284190 (104.7)	147463 (47.8)	3348 (1.1)	760.6 (2.0)
P18T, F91S	394	401283 (107.8)	223985 (82.5)	157644 (51.1)	3065 (1.1)	814.7 (2.1)
P18T, S42P, F91S	395	554105 (148.8)	223887 (82.5)	135395 (43.9)	3796 (1.3)	539.7 (1.4)
G7E, P18T, Y30C, F91S	396	12903 (3.5)	12984 (4.8)	7906 (2.6)	2671 (0.9)	275.9 (0.7)

10

20

30

40

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	CD226 tfxn MFI (CD226 MFI 親比率)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 親比率)	CD96 MFI (CD96 MFI 親比率)	モック Expi293 MFI (モックMFI 親比率)	抗CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗CD3 IFN- $\gamma$ 親比率)
P18T, F91S, G111D	397	438327 (117.7)	287315 (105.8)	167583 (54.3)	4012 (1.4)	307.2 (0.8)
P18S, F91P	398	4154 (1.1)	3220 (1.2)	2678 (0.9)	2816 (1.0)	365.7 (0.9)
P18T, F91S, F108L	399	394546 (106.0)	298680 (110.0)	193122 (62.6)	2926 (1.0)	775.4 (2.0)
P18T, T45A, F91S	400	435847 (117.1)	222044 (81.8)	191026 (61.9)	2948 (1.0)	1546.8 (4.0)
P18T, F91S, R94H	401	3589 (1.0)	2942 (1.1)	2509 (0.8)	2390 (0.8)	1273.2 (3.3)
P18S, Y30C, F91S	402	382352 (102.7)	276358 (101.8)	56934 (18.5)	3540 (1.2)	426.5 (1.1)
A81V, L83P	403	4169 (1.1)	2912 (1.1)	2616 (0.8)	2993 (1.0)	339.7 (0.9)
L88P	404	65120 (17.5)	74845 (27.6)	35280 (11.4)	2140 (0.7)	969.2 (2.5)
野生型	387	3723 (1.0)	2715 (1.0)	3085 (1.0)	2913 (1.0)	389.6 (1.0)
R94H	405	18905 (5.1)	104013 (38.3)	11727 (3.8)	1663 (0.6)	372.6 (1.0)
A13E, P18S, A56V, F91S	406	357808 (96.1)	179060 (66.0)	118570 (38.4)	2844 (1.0)	349.2 (0.9)
P18T, F91S, V115A	407	38487 (10.3)	46313 (17.1)	22718 (7.4)	2070 (0.7)	1574.5 (4.0)
P18T, Q60K	408	238266 (64.0)	173730 (64.0)	154448 (50.1)	4778 (1.6)	427.2 (1.1)

10

20

## 【 0 6 6 3 】

(表 1 3 B) 追加の CD 1 5 5 パリアント及び結合データ

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		100nM での MFI	WT ECD に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT ECD に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT ECD に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT ECD に対する 倍率増加
S52M	603	1865.3	0.00	1901.0	0.01	1553.4	0.87	1609.8	0.02
T45Q, S52L, L104E, G111R	604	2287.0	0.01	2390.4	0.01	1735.1	0.97	1575.1	0.02
S42G	605	4837.5	0.01	2448.1	0.01	1815.4	1.02	1699.6	0.02
Q62F	606	2209.5	0.01	2572.1	0.01	2706.5	1.52	2760.7	0.03
S52Q	607	2288.1	0.01	2022.3	0.01	1790.1	1.00	1822.3	0.02
S42A, L104Q, G111R	608	1923.7	0.00	1901.7	0.01	1815.1	1.02	1703.8	0.02
S42A, S52Q, L104Q, G111R	609	1807.5	0.00	2157.2	0.01	1894.4	1.06	1644.0	0.02
S52W, L104E	610	1938.2	0.00	1905.6	0.01	2070.6	1.16	1629.5	0.02

30

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加						
S42C	611	1914.0	0.00	2096.1	0.01	1685.0	0.95	1592.4	0.02
S52W	612	1991.6	0.00	2037.3	0.01	1612.8	0.90	1712.9	0.02
S52M, L104Q	613	2666.6	0.01	2252.2	0.01	1706.0	0.96	1633.1	0.02
S42L, S52L, Q62F, L104Q	614	2021.4	0.00	2643.8	0.02	1730.1	0.97	2318.7	0.02
S42W	615	2434.5	0.01	2133.4	0.01	2325.7	1.30	2555.4	0.03
S42Q	616	2073.5	0.00	2225.9	0.01	1905.1	1.07	2143.1	0.02
S52L	617	2224.8	0.01	2676.3	0.02	2038.6	1.14	2043.2	0.02
S52R	618	4395.4	0.01	3964.4	0.02	2741.7	1.54	4846.9	0.05
L104E	619	3135.4	0.01	2264.2	0.01	1803.5	1.01	1556.7	0.02
G111R	620	2082.7	0.00	2791.3	0.02	2470.9	1.39	3317.1	0.03
S52E	621	2655.4	0.01	2599.8	0.02	1904.9	1.07	1799.0	0.02
Q62Y	622	2528.6	0.01	2621.4	0.02	1918.4	1.08	1827.5	0.02
T45Q, S52M, L104E	623	79498.2	0.19	143238.5	0.83	2600.6	1.46	6310.4	0.06
S42N, L104Q, G111R	624	2432.1	0.01	2311.3	0.01	1847.4	1.04	1958.3	0.02
S52M, V57L	625	1760.7	0.00	2431.6	0.01	2006.9	1.13	1858.7	0.02
S42N, S52Q, Q62F	626	2402.7	0.01	2152.0	0.01	1855.0	1.04	1737.6	0.02
S42A, S52L, L104E, G111R	627	2262.7	0.01	1889.4	0.01	1783.2	1.00	1606.2	0.02
S42W, S52Q, V57L, Q62Y	628	1961.4	0.00	2138.3	0.01	1844.9	1.03	1699.6	0.02
L104Q	629	10314.4	0.02	3791.4	0.02	2119.9	1.19	1542.6	0.02
S42L, S52Q, L104E	630	1946.9	0.00	6474.3	0.04	1749.0	0.98	1702.2	0.02
S42C, S52L	631	1762.5	0.00	2147.3	0.01	1663.4	0.93	1484.7	0.01
S42W, S52R, Q62Y, L104Q	632	1918.8	0.00	2300.1	0.01	1824.6	1.02	1756.0	0.02
T45Q, S52R, L104E	633	121636.9	0.29	142381.2	0.82	2617.9	1.47	3748.2	0.04
S52R, Q62F, L104Q, G111R	634	2969.2	0.01	3171.6	0.02	1725.4	0.97	2362.3	0.02
T45Q, S52L, V57L, L104E	635	2857.7	0.01	5943.5	0.03	1496.8	0.84	1533.3	0.02
S52M, Q62Y	636	1926.6	0.00	2000.3	0.01	1771.6	0.99	1651.1	0.02
Q62F, L104E, G111R	637	1966.4	0.00	2043.5	0.01	1701.9	0.95	1524.8	0.02
T45Q, S52Q	638	4812.8	0.01	5787.5	0.03	1765.6	0.99	2451.3	0.02
S52L, L104E	639	4317.8	0.01	2213.9	0.01	1756.9	0.99	1829.3	0.02
S42V, S52E	640	2055.0	0.00	2272.6	0.01	1808.0	1.01	2530.2	0.03
T45Q, S52R, G111R	641	4092.3	0.01	2075.2	0.01	1793.6	1.01	2336.6	0.02
S42G, S52Q, L104E, G111R	642	2010.1	0.00	2019.2	0.01	1706.4	0.96	1707.6	0.02

10

20

30

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加						
S42N, S52E, V57L, L104E	643	1784.2	0.00	1743.6	0.01	1690.1	0.95	1538.7	0.02
野生型	387	1964.7	0.00	2317.1	0.01	2169.6	1.22	1893.4	0.02
S42C, S52M, Q62F	644	1861.0	0.00	2084.2	0.01	1592.3	0.89	1481.3	0.01
S42L	645	1930.4	0.00	2187.2	0.01	1743.2	0.98	1618.4	0.02
野生型	387	2182.6	0.01	2374.5	0.01	1743.1	0.98	1680.4	0.02
S42A	646	1929.2	0.00	2188.6	0.01	1733.7	0.97	1623.6	0.02
S42G, S52L, Q62F, L104Q	647	1924.3	0.00	2157.6	0.01	1661.3	0.93	1642.1	0.02
S42N	648	1817.4	0.00	1910.9	0.01	1699.7	0.95	1691.5	0.02
CD155 IgV Fc	387	4690	0.01	4690	0.03	2941	1.65	3272	0.03
野生型 CD155 ECD-Fc	47 (ECD)	423797	1.00	172839	1.00	1783	1.00	99037	1.00
抗ヒトFc PE	-	1506.3	0.00	3774	0.02	1587	0.89	1618	0.02

【 0 6 6 4 】

(表 1 3 C) 追加の CD 1 5 5 パリアント及び結合データ

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加
P18T, S65A, S67V, F91S	649	297843	1.99	351195	3.22	128180	1.68
P18F, T39A, T45Q, T61R, S65N, S67L, E73G, R78G	650	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18T, T45Q, T61R, S65N, S67L	651	224682	1.50	270175	2.48	22820	0.30
P18F, S65A, S67V, F91S	652	534106	3.57	350410	3.21	144069	1.89
P18F, T45Q, T61R, S65N, S67L, F91S, L104P	653	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18S, L79P, L104M	654	342549	2.29	320823	2.94	107532	1.41
P18S, L104M	655	449066	3.00	295126	2.70	121266	1.59
L79P, L104M	656	3210	0.02	8323	0.08	2894	0.04
P18T, T45Q, L79P	657	542878	3.63	371498	3.40	193719	2.55
P18T, T45Q, T61R, S65H, S67H	658	312337	2.09	225439	2.07	152903	2.01
P18T, A81E	659	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18S, D23Y, E37P, S52G, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	660	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
A13R, D23Y, E37P, S42P, Q62Y, A81E	661	4161	0.03	11673	0.11	5762	0.08
A13R, D23Y, E37P, G99Y, S112N	662	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					

10

20

30

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加
A13R, D23Y, E37P, Q62M, A77V, G80S, A81P, G99Y	663	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18L, E37S, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	664	5900	0.04	14642	0.13	3345	0.04
P18S, L104T	665	321741	2.15	367470	3.37	108569	1.43
P18S, Q62H, L79Q, F91S	666	283357	1.89	324877	2.98	125541	1.65
P18S, F91S	393	222780	1.49	300049	2.75	48542	0.64
T45Q, S52K, Q62F, L104Q, G111R	667	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
T45Q, S52Q, Q62Y, L104Q, G111R	668	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
T45Q, S52Q, Q62Y, L104E, G111R	669	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
V57A, T61M, S65W, S67A, E96D, L104T	670	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18L, V57T, T61S, S65Y, S67A, L104T	671	278178	1.86	276870	2.54	121499	1.60
P18T, T45Q	672	326769	2.18	357515	3.28	92389	1.21
P18L, V57A, T61M, S65W, S67A, L104T	673	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
T61M, S65W, S67A, L104T	674	360915	2.41	417897	3.83	148954	1.96
P18S, V41A, S42G, T45G, L104N	675	3821	0.03	11449	0.10	3087	0.04
P18H, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104N	676	5066	0.03	177351	1.63	3700	0.05
P18S, S42G, T45V, F58L, S67W, L104N	677	14137	0.09	15175	0.14	15324	0.20
P18S, T45I, L104N	678	141745	0.95	298011	2.73	97246	1.28
P18S, S42G, T45G, L104N, V106A	679	29387	0.20	117965	1.08	15884	0.21
P18H, H40R, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104Y, V106L, F108H	680	12335	0.08	14657	0.13	15779	0.21
E37V, S42G, T45G, L104N	681	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18S, T45Q, L79P, L104T	682	206674	1.38	285512	2.62	87790	1.15
P18L, Q62R	683	66939	0.45	25063	0.23	10928	0.14
A13R, D23Y, E37P, S42L, S52G, Q62Y, A81E	684	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18L, H49R, L104T, D116N	685	167980	1.12	214677	1.97	62451	0.82
A13R, D23Y, E37P, Q62M, G80S, A81P, L104T	686	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
S65T, L104T	687	205942	1.38	187147	1.71	65207	0.86
A13R, D23Y, E37P, S52G, V57A, Q62M, K70E, L104T	688	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					

10

20

30

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT ECDに対する倍率増加
P18L, A47V, Q62Y, E73D, L104T	689	146142	0.98	248926	2.28	73956	0.97
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, D97G, E98S, L104T, D116N	690	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
P18L, S42P, T45Q, T61G, S65H, S67E, L104T, D116N	691	153536	1.03	402503	3.69	53044	0.70
P18S, H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, L104M, V106A	692	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E68G, E73R, D97G, E98S, L104T	693	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
T45Q, S52E, L104E	694	産生されたタンパク質はほとんど~全くない					
T45Q, S52E, Q62F, L104E	695	132850	0.89	276434	2.53	14558	0.19
野生型 CD155 ECD-Fc	47 (ECD)	149692	1.00	109137	1.00	76083	1.00
抗ヒト Fc PE	-	2287	0.02	4799	0.04	2061	0.03

10

## 【 0 6 6 5 】

(表 1 3 D) 追加の CD 1 5 5 パリアント及び結合データ

20

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		100nMでのMFI	WT IgVに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT IgVに対する倍率増加	100nMでのMFI	WT IgVに対する倍率増加
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, F91S, L104M, G111D	696	117327	1.2	1613	0.1	1629	0.1
P18S, T45S, T61K, S65W, S67A, F91S, G111R	697	124936	1.3	2114	0.1	2223	0.1
P18S, L79P, L104M, T107M	698	110512	1.1	18337	0.9	22793	1.3
P18S, S65W, S67A, M90V, V95A, L104Q, G111R	696	101726	1.0	1605	0.1	2571	0.1
野生型 CD155-ECD	47 (ECD)	98935	1.0	20029	1.0	17410	1.0

30

## 【 0 6 6 6 】

(表 1 3 E) 追加の CD 1 5 5 パリアント及び結合データ

CD155変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		11. 1nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	11. 1nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	11. 1nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化
P18S, A47G, L79P, F91S, L104M, T107A, R113W	1550	56,409	1.19	1,191	0.08	25,362	1.49
P18T, D23G, S24A, N35D, H49L, L79P, F91S, L104M, G111R	1551	128,536	2.72	987	0.06	3,497	0.20
V9L, P18S, Q60R, V75L, L79P, R89K, F91S, L104E, G111R	1552	125,329	2.65	986	0.06	959	0.06
P18S, H49R, E73D, L79P, N85D, F91S, V95A, L104M, G111R	1553	産生されたタンパク質はほとんど〜全くない					
V11A, P18S, L79P, F91S, L104M, G111R	1554	48,246	1.02	974	0.06	923	0.05
V11A, P18S, S54R, Q60P, Q62K, L79P, N85D, F91S, T107M	1555	190,392	4.02	1,019	0.07	1,129	0.07
P18T, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, G111R	1556	121,611	2.57	986	0.06	16,507	0.97
P18T, M36T, L79P, F91S, G111R	1557	150,015	3.17	1,029	0.07	2,514	0.15
D8G, P18S, M36I, V38A, H49Q, A76E, F91S, L104M, T107A, R113W	1558	79,333	1.68	1,026	0.07	2,313	0.14
P18S, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, T107S, R113W	1559	23,766	0.50	1,004	0.07	1,080	0.06
T15I, P18T, L79P, F91S, L104M, G111R	1560	55,498	1.17	1,516	0.10	1,030	0.06
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, E82D, F91S, L104M, G111D	1561	213,640	4.51	991	0.06	1,276	0.07
P18T, E37G, G53R, Q62K, L79P, F91S, E98D, L104M, T107M	1562	251,288	5.31	2,001	0.13	45,878	2.69
P18L, K70E, L79P, F91S, V95A, G111R	1563	62,608	1.32	1,117	0.07	973	0.06
V9I, Q12K, P18F, S65A, S67V, L79P, L104T, G111R, S112I	1564	81,932	1.73	803	0.05	68,295	4.00
P18F, S65A, S67V, F91S, L104M, G111R	1565	30,661	0.65	901	0.06	3,193	0.19

10

20

30

40

CD155変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		11.1nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	11.1nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	11.1nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化
V9I, V10I, P18S, F20S, T45A, L79P, F91S, L104M, F108Y, G111R, S112V	1566	151,489	3.20	973	0.06	974	0.06
V9L, P18L, L79P, M90I, F91S, T102S, L104M, G111R	1567	155,279	3.28	910	0.06	10,568	0.62
P18C, T26M, L44V, M55I, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107M	1568	137,521	2.91	973	0.06	111,085	6.51
V9I, P18T, D23G, L79P, F91S, G111R	1569	151,426	3.20	897	0.06	2,725	0.16
P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1570	125,639	2.66	917	0.06	3,939	0.23
P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1570	115,156	2.43	1,073	0.07	2,464	0.14
P18T, M36T, S65A, S67E, L79Q, A81T, F91S, G111R	1571	10,616	0.22	1,130	0.07	963	0.06
V9L, P18T, Q62R, L79P, F91S, L104M, G111R	1572	195,111	4.12	835	0.05	1,497	0.09
CD155-ECD-Fc	47 (ECD)	47,319	1.00	15,421	1.00	17,067	1.00
Fc 対照	1189	2,298	0.05	1,133	0.07	996	0.06

10

20

## 【 0 6 6 7 】

(表 1 3 F) 追加の CD 1 5 5 パリアント及び結合データ

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		25nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	25nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	25nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化	25nMでのMFI	CD155-ECDからの倍率変化
P18T, G19D, M36T, S54N, L79P, L83Q, F91S, T107M, F108Y	1691	905	0.02	748	0.02	1276	1.56	726	0.01
V9L, P18L, M55V, S69L, L79P, A81E, F91S, T107M	1692	58656	1.34	11166	0.29	920	1.13	67364	1.39
P18F, H40Q, T61K, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107V	1693	108441	2.48	853	0.02	918	1.13	8035	0.17
P18S, Q32R, Q62K, R78G, L79P, F91S, T107A, R113W	1694	5772	0.13	701	0.02	843	1.03	831	0.02

30

40

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化
Q12H, P18T, L21S, G22S, V57A, Q62R, L79P, F91S, T107M	1695	1084	0.02	687	0.02	876	1.07	818	0.02
V9I, P18S, S24P, H49Q, F58Y, Q60R, Q62K, L79P, F91S, T107M	1696	69926	1.60	1089	0.03	1026	1.26	43856	0.90
P18T, W46C, H49R, S65A, S67V, A76T, L79P, S87T, L104M	1697	918	0.02	640	0.02	803	0.98	717	0.01
P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1698	12630	0.29	707	0.02	857	1.05	1050	0.02
P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1698	7476	0.17	851	0.02	935	1.15	924	0.02
V10F, T15S, P18L, R48Q, L79P, F91S, T107M, V115M	1699	1168	0.03	792	0.02	901	1.10	998	0.02
P18S, L21M, Y30F, N35D, R84W, F91S, T107M, D116G	1700	1377	0.03	743	0.02	946	1.16	1033	0.02
P18F, E51V, S54G, Q60R, L79Q, E82G, S87T, M90I, F91S, G92R, T107M	1701	46090	1.05	15701	0.41	1012	1.24	61814	1.27
Q16H, P18F, F91S, T107M	1702	産生されたタンパク質はほとんど〜全くない							
P18T, D23G, Q60R, S67L, L79P, F91S, T107M, V115A	1703	64091	1.47	30931	0.81	874	1.07	108875	2.24
D8G, V9I, V11A, P18T, T26M, S52P, L79P, F91S, G92A, T107L, V115A	1704	52508	1.20	9483	0.25	817	1.00	97770	2.01
V9I, P18F, A47E, G50S, E68G, L79P, F91S, T107M	1705	55167	1.26	54341	1.43	752	0.92	102115	2.10
P18S, M55I, Q62K, S69P, L79P, F91S, T107M	1706	産生されたタンパク質はほとんど〜全くない							
P18T, T39S, S52P, S54R, L79P, F91S, T107M	1707	45927	1.05	744	0.02	1038	1.27	1225	0.03
P18S, D23N, L79P, F91S, T107M, S114N	1708	産生されたタンパク質はほとんど〜全くない							
P18S, P34S, E51V, L79P, F91S, G111R	1709	7917	0.18	769	0.02	853	1.04	892	0.02

10

20

30

40

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化
P18S, H59N, V75A, L79P, A81T, F91S, L104M, T107M	1710	800	0.02	676	0.02	915	1.12	759	0.02
P18S, W46R, E68D, L79P, F91S, T107M, R113G	1711	1359	0.03	717	0.02	798	0.98	737	0.02
V9L, P18F, T45A, S65A, S67V, R78K, L79V, F91S, T107M, S114T	1712	130274	2.98	153569	4.04	812	1.00	85605	1.76
P18T, M55L, T61R, L79P, F91S, V106I, T107M	1713	133399	3.05	1906	0.05	827	1.01	57927	1.19
T15I, P18S, V33M, N35F, T39S, M55L, R78S, L79P, F91S, T107M	1714	7550	0.17	1015	0.03	789	0.97	2709	0.06
P18S, Q62K, K70E, L79P, F91S, G92E, R113W	1715	11173	0.26	691	0.02	735	0.90	1951	0.04
P18F, F20I, T26M, A47V, E51K, L79P, F91S	1716	136088	3.11	54026	1.42	1401	1.72	96629	1.99
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1717	43795	1.00	98241	2.58	888	1.09	70891	1.46
P18S, D23G, C29R, N35D, E37G, M55I, Q62K, S65A, S67G, R78G, L79P, F91S, L104M, T107M, Q110R	1718	1599	0.04	1030	0.03	1115	1.37	1944	0.04
A13E, P18S, M36R, Q62K, S67T, L79P, N85D, F91S, T107M	1719	産生されたタンパク質はほとんど~全くない							
V9I, P18T, H49R, L79P, N85D, F91S, L104T, T107M	1720	46375	1.06	76851	2.02	794	0.97	80210	1.65
V9A, P18F, T61S, Q62L, L79P, F91S, G111R	1721	26109	0.60	891	0.02	825	1.01	2633	0.05
D8E, P18T, T61A, L79P, F91S, T107M	1722	産生されたタンパク質はほとんど~全くない							
P18S, V41A, H49R, S54C, L79S, N85Y, L88P, F91S, L104M, T107M	1723	1098	0.03	830	0.02	876	1.07	1678	0.03
V11E, P18H, F20Y, V25E, N35S, H49R, L79P, F91S, T107M, G111R	1724	979	0.02	846	0.02	844	1.03	928	0.02
V11A, P18F, D23A, L79P, G80D, V95A, T107M	1725	45249	1.04	913	0.02	830	1.02	33883	0.70
P18S, K70R, L79P, F91S, G111R	1726	16180	0.37	793	0.02	854	1.05	1182	0.02
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1717	175673	4.02	161958	4.26	879	1.08	50981	1.05
V9L, V11M, P18S, N35S, S54G, Q62K, L79P,	1727	2999	0.07	2315	0.06	893	1.09	925	0.02

10

20

30

40

CD155 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化	25nM での MFI	CD155-ECD からの 倍率変化
L104M, T107M, V115M									
V9L, P18Y, V25A, V38G, M55V, A77T, L79P, M90I, F91S, L104M	1728	138011	3.16	26015	0.68	919	1.13	17970	0.37
V10G, P18T, L72Q, L79P, F91S, T107M	1729	4253	0.10	1584	0.04	863	1.06	3643	0.07
P18S, H59R, A76G, R78S, L79P	1730	130622	2.99	79435	2.09	1009	1.24	44493	0.91
V9A, P18S, M36T, S65G, L79P, F91S, L104T, G111R, S112I	1731	92503	2.12	989	0.03	886	1.09	7850	0.16
P18T, S52A, V57A, Q60R, Q62K, S65C, L79P, F91T, N100Y, T107M	1732	187338	4.29	10579	0.28	908	1.11	3791	0.08
V11A, P18F, N35D, A47E, Q62K, L79P, F91S, G99D, T107M, S114N	1733	産生されたタンパク質はほとんど~全くない							
V11A, P18T, N35S, L79P, S87T, F91S	1734	218660	5.00	273825	7.20	1269	1.56	69871	1.44
V9D, V11M, Q12L, P18S, E37V, M55I, Q60R, K70Q, L79P, F91S, L104M, T107M	1735	8693	0.20	790	0.02	852	1.04	1991	0.04
T15S, P18S, Y30H, Q32L, Q62R, L79P, F91S, T107M	1736	16213	0.37	2092	0.06	1056	1.29	6994	0.14
CD155-ECD-Fc	47 (ECD)	43704	1.00	38032	1.00	816	1.00	48638	1.00
CD112-IgV	795	1289		824		17819		1172	0.02

10

20

## 【 0 6 6 8 】

(表 1 4 A) 同族結合パートナーに対して選択したバリエーション CD 1 1 2 分子配列、結合データ、及び共刺激生理活性データ。

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 親比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 親比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 親比率)	モックExpi293 MFI (モックMFI 親比率)	抗CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗CD3 IFN- $\gamma$ 親比率)
WT CD112	795	210829 (1.00)	1452 (1.00)	265392 (1.00)	1112 (1.00)	676.6 (1.00)
Y33H, A112V, G117D	796	12948 (0.06)	1552 (1.07)	1368 (0.01)	1241 (1.12)	164.8 (0.24)
V19A, Y33H, S64G, S80G, G98S, N106Y, A112V	797	48356 (0.23)	1709 (1.18)	2831 (0.01)	1098 (0.99)	
L32P, A112V	798	191432 (0.91)	1557 (1.07)	11095 (0.04)	1259 (1.13)	390.4 (0.58)
A95V, A112I	799	238418	1706	51944	1215	282.5

30

40

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 親比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 親比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 親比率)	モックExpi293 MFI (モックMFI 親比率)	抗CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗CD3 IFN- $\gamma$ 親比率)
		(1.13)	(1.17)	(0.20)	(1.09)	(0.42)
P28S, A112V	800	251116 (1.19)	1985 (1.37)	153382 (0.58)	1189 (1.07)	503.4 (0.74)
P27A, T38N, V101A, A112V	801	255803 (1.21)	2138 (1.47)	222822 (0.84)	1399 (1.26)	240.7 (0.36)
S118F	802	11356 (0.05)	5857 (4.03)	6938 (0.03)	1270 (1.14)	271.7 (0.40)
R12W, H48Y, F54S, S118F	803	10940 (0.05)	3474 (2.39)	5161 (0.02)	1069 (0.96)	
R12W, Q79R, S118F	804	2339 (0.01)	7370 (5.08)	1880 (0.01)	1338 (1.20)	447.4 (0.66)
T113S, S118Y	805	6212 (0.03)	6823 (4.70)	1554 (0.01)	1214 (1.09)	225.1 (0.33)
S118Y	806	2921 (0.01)	6535 (4.50)	2003 (0.01)	1463 (1.32)	190.4 (0.28)
N106I, S118Y	807	2750 (0.01)	7729 (5.32)	1815 (0.01)	1222 (1.10)	265.8 (0.39)
N106I, S118F	808	1841 (0.01)	9944 (6.85)	1529 (0.01)	1308 (1.18)	437.9 (0.65)
A95T, L96P, S118Y	809	2352 (0.01)	4493 (3.09)	1412 (0.01)	1329 (1.19)	292.4 (0.43)
Y33H, P67S, N106Y, A112V	810	225015 (1.07)	3259 (2.24)	204434 (0.77)	1296 (1.17)	618.8 (0.91)
N106Y, A112V	811	6036 (0.03)	1974 (1.36)	15334 (0.06)	1108 (1.00)	409.9 (0.61)
T18S, Y33H, A112V	812	252647 (1.20)	1347 (0.93)	183181 (0.69)	1412 (1.27)	601.8 (0.89)
P9S, Y33H, N47S, A112V	813	240467 (1.14)	1418 (0.98)	203608 (0.77)	1361 (1.22)	449.1 (0.66)
P42S, P67H, A112V	814	204484 (0.97)	1610 (1.11)	188647 (0.71)	1174 (1.06)	530.6 (0.78)
P27L, L32P, P42S, A112V	815	219883 (1.04)	1963 (1.35)	84319 (0.32)	1900 (1.71)	251.6 (0.37)
G98D, A112V	816	4879 (0.02)	2369 (1.63)	6100 (0.02)	1729 (1.55)	387.0 (0.57)
Y33H, S35P, N106Y, A112V	817	250724 (1.19)	1715 (1.18)	94373 (0.36)	1495 (1.34)	516.2 (0.76)
L32P, P42S, T100A, A112V	818	242675 (1.15)	1742 (1.20)	202567 (0.76)	1748 (1.57)	435.3 (0.64)
P27S, P45S, N106I, A112V	819	223557 (1.06)	1799 (1.24)	84836 (0.32)	1574 (1.42)	277.5 (0.41)
Y33H, N47K, A112V	820	251339 (1.19)	1525 (1.05)	199601 (0.75)	1325 (1.19)	483.2 (0.71)
Y33H, N106Y, A112V	821	297169 (1.41)	1782 (1.23)	258315 (0.97)	1440 (1.30)	485.4 (0.72)
K78R, D84G, A112V, F114S	822	236662 (1.12)	1638 (1.13)	24850 (0.09)	1345 (1.21)	142.5 (0.21)

10

20

30

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 親比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 親比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 親比率)	モックExpi293 MFI (モックMFI 親比率)	抗CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗CD3 IFN- $\gamma$ 親比率)
Y33H, N47K, F54L, A112V	823	14483 (0.07)	1617 (1.11)	2371 (0.01)	1353 (1.22)	352.8 (0.52)
Y33H, A112V	824	98954 (0.47)	1216 (0.84)	1726 (0.01)	1298 (1.17)	
A95V, A112V	825	168521 (0.80)	2021 (1.39)	200789 (0.76)	1459 (1.31)	412.9 (0.61)
R12W, A112V	826	135635 (0.64)	1582 (1.09)	23378 (0.09)	1412 (1.27)	165.8 (0.24)
A112V	832	213576 (1.01)	1986 (1.37)	151900 (0.57)	1409 (1.27)	211.4 (0.31)
Y33H, A112V	824	250667 (1.19)	1628 (1.12)	230578 (0.87)	1216 (1.09)	612.7 (0.91)
R12W, P27S, A112V	827	3653 (0.02)	1308 (0.90)	9105 (0.03)	1051 (0.94)	
Y33H, V51M, A112V	828	218698 (1.04)	1384 (0.95)	195450 (0.74)	1170 (1.05)	709.4 (1.05)
Y33H, A112V, S118T	829	219384 (1.04)	1566 (1.08)	192645 (0.73)	1313 (1.18)	396.3 (0.59)
Y33H, V101A, A112V, P115S	830	5605 (0.03)	1582 (1.09)	5079 (0.02)	1197 (1.08)	
H24R, T38N, D43G, A112V	831	227095 (1.08)	1537 (1.06)	229311 (0.86)	1336 (1.20)	858.6 (1.27)
A112V	832	4056 (0.02)	1356 (0.93)	10365 (0.04)	986 (0.89)	
P27A, A112V	833	193537 (0.92)	1531 (1.05)	230708 (0.87)	3084 (2.77)	355.1 (0.52)
A112V, S118T	834	233173 (1.11)	1659 (1.14)	121817 (0.46)	845 (0.76)	533.3 (0.79)
R12W, A112V, M122I	835	235935 (1.12)	1463 (1.01)	217748 (0.82)	1350 (1.21)	528.0 (0.78)
Q83K, N106Y, A112V	836	205948 (0.98)	2042 (1.41)	234958 (0.89)	1551 (1.39)	481.4 (0.71)
R12W, P27S, A112V, S118T	837	11985 (0.06)	2667 (1.84)	12756 (0.05)	1257 (1.13)	334.4 (0.49)
P28S, Y33H, A112V	838	4711 (0.02)	1412 (0.97)	3968 (0.01)	955 (0.86)	
P27S, Q90R, A112V	839	3295 (0.02)	1338 (0.92)	6755 (0.03)	1048 (0.94)	
L15V, P27A, A112V, S118T	840	209888 (1.00)	1489 (1.03)	84224 (0.32)	1251 (1.13)	512.3 (0.76)
Y33H, N106Y, T108I, A112V	841	試験せず				
Y33H, P56L, V75M, V101M, A112V	842	試験せず				

10

20

30

## 【 0 6 6 9 】

(表 1 4 B) 追加の C D 1 1 2 バリエーション及び結合データ

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加
S118F	802	1763	0.02	1645	0.08	2974	0.61	1659	0.19
N47K, Q79R, S118F	925	1738	0.02	1689	0.09	2637	0.54	1647	0.19
Q40R, P60T, A112V, S118T	926	4980	0.06	1608	0.08	2399	0.50	2724	0.32
F114Y, S118F	927	110506	1.34	7325	0.37	1502	0.31	1553	0.18
N106I, S118Y	807	1981	0.02	1700	0.09	2394	0.49	1582	0.19
S118Y	806	101296	1.23	9990	0.50	1429	0.30	1551	0.18
Y33H, K78R, S118Y	928	2276	0.03	2115	0.11	3429	0.71	2082	0.24
N106I, S118F	808	1875	0.02	1675	0.08	2365	0.49	1662	0.19
R12W, A46T, K66M, Q79R, N106I, T113A, S118F	929	3357	0.04	1808	0.09	1664	0.34	4057	0.48
Y33H, A112V, S118F	930	3376	0.04	2886	0.15	3574	0.74	3685	0.43
R12W, Y33H, N106I, S118F	931	100624	1.22	24513	1.24	1490	0.31	2060	0.24
L15V, Q90R, S118F	932	5791	0.07	4169	0.21	2752	0.57	4458	0.52
N47K, D84G, N106I, S118Y	933	3334	0.04	2819	0.14	2528	0.52	3498	0.41
L32P, S118F	934	3881	0.05	2506	0.13	2659	0.55	2518	0.29
Y33H, Q79R, A112V, S118Y	935	産生されたタンパク質は少ない～全くない							
T18A, N106I, S118T	936	84035	1.02	10208	0.52	1585	0.33	1590	0.19
L15V, Y33H, N106Y, A112V, S118F	937	産生されたタンパク質は少ない～全くない							
V37M, S118F	938	96986	1.18	2523	0.13	1985	0.41	1849	0.22
N47K, A112V, S118Y	939	1980	0.02	1859	0.09	2733	0.56	1825	0.21
A46T, A112V	940	4224	0.05	4685	0.24	3288	0.68	4273	0.50
P28S, Y33H, N106I, S118Y	941	6094	0.07	2181	0.11	1891	0.39	3021	0.35
P30S, Y33H, N47K, V75M, Q79R, N106I, S118Y	942	2247	0.03	2044	0.10	1796	0.37	2658	0.31
V19A, N47K, N106Y, K116E, S118Y	943	2504	0.03	2395	0.12	2174	0.45	2852	0.33
Q79R, T85A, A112V, S118Y	944	2192	0.03	1741	0.09	2367	0.49	1620	0.19
Y33H, A112V	824	20646	0.25	1465	0.07	1794	0.37	2589	0.30

10

20

30

40

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加
V101M, N106I, S118Y	945	55274	0.67	6625	0.33	1357	0.28	1494	0.17
Y33H, Q79R, N106I, A112V, S118T	946	6095	0.07	1760	0.09	2393	0.49	3033	0.36
Q79R, A112V	947	1571	0.02	1490	0.08	2284	0.47	1326	0.16
Y33H, A46T, Q79R, N106I, S118F	948	90813	1.10	15626	0.79	1298	0.27	3571	0.42
A112V, G121S	949	95674	1.16	19992	1.01	1252	0.26	4005	0.47
Y33H, Q79R, N106I, S118Y	950	36246	0.44	2118	0.11	1970	0.41	3250	0.38
Y33H, N106I, A112V	951	47352	0.57	4217	0.21	2641	0.55	1488	0.17
Y33H, A46T, V101M, A112V, S118T	952	14413	0.17	1596	0.08	2335	0.48	1441	0.17
L32P, L99M, N106I, S118F	953	3056	0.04	1791	0.09	2210	0.46	2000	0.23
L32P, T108A, S118F	954	104685	1.27	4531	0.23	2308	0.48	1518	0.18
A112V	832	4937	0.06	1903	0.10	1646	0.34	3011	0.35
R12W, Q79R, A112V	955	55539	0.67	6918	0.35	1386	0.29	1740	0.20
Y33H, N106Y, E110G, A112V	956	2786	0.03	2517	0.13	1787	0.37	2023	0.24
Y33H, N106I, S118Y	957	1967	0.02	1579	0.08	2601	0.54	1517	0.18
Q79R, S118F	958	82055	1.00	7582	0.38	1298	0.27	1970	0.23
Y33H, Q79R, G98D, V101M, A112V	959	21940	0.27	1632	0.08	1141	0.24	18423	2.16
N47K, T81S, V101M, A112V, S118F	960	6889	0.08	1311	0.07	1303	0.27	1145	0.13
G82S, S118Y	961	4267	0.05	1938	0.10	2140	0.44	2812	0.33
Y33H, A112V, S118Y	962	14450	0.18	1532	0.08	2353	0.49	3004	0.35
Y33H, N47K, Q79R, N106Y, A112V	963	70440	0.85	3557	0.18	1447	0.30	1679	0.20
Y33H, S118T	964	113896	1.38	17724	0.89	1252	0.26	5001	0.59
R12W, Y33H, Q79R, V101M, A112V	965	3376	0.04	2727	0.14	2047	0.42	2339	0.27
S118F	802	2685	0.03	1864	0.09	2520	0.52	1566	0.18

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	100nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加
野生型 CD112-IgV Fc	795	82414	1.00	19803	1.00	4842	1.00	8541	1.00
CD112 ECD-Fc	48 (ECD)	29157	0.35	8755	0.44	1107	0.23	1103	0.13
抗 hFc PE	-	1383	0.02	1461	0.07	1358	0.28	1468	0.17

【 0 6 7 0 】

(表 1 4 C) 追加の CD 1 1 2 パリアント及び結合データ

10

20

30

40

50

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 20nM	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加
N106I, S118Y	807	1288	0.04	1334	0.12	6920	4.16	1102	0.44
Y33H, Q83K, A112V, S118T	1503	115690	3.31	10046	0.93	1128	0.68	2053	0.82
R12W, Q79R, S118F	804	1436	0.04	1296	0.12	6546	3.93	1046	0.42
V29M, Y33H, N106I, S118F	1504	試験せず							
Y33H, A46T, A112V	1505	111256	3.18	14974	1.39	1148	0.69	3333	1.34
Y33H, Q79R, S118F	1506	1483	0.04	1326	0.12	7425	4.46	1138	0.46
Y33H, N47K, F74L, S118F	1507	1338	0.04	1159	0.11	1516	0.91	1140	0.46
R12W, V101M, N106I, S118Y	1508	1378	0.04	1249	0.12	5980	3.59	1182	0.47
A46T, V101A, N106I, S118Y	1509	1359	0.04	1199	0.11	6729	4.04	1173	0.47
Y33H, N106Y, A112V	821	113580	3.25	17771	1.65	1207	0.72	2476	0.99
N106Y, A112V, S118T	1510	試験せず							
S76P, T81I, V101M, N106Y, A112V, S118F	1511	試験せず							
N106Y, A112V	811	29015	0.83	2760	0.26	1159	0.70	1639	0.66
P9R, L21V, P22L, I34M, S69F, F74L, A87V, A112V, L125A	5112	1920	0.05	1218	0.11	1107	0.66	1074	0.43

10

20

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 20nM	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加
Y33H, V101M, A112V	1513	126266	3.61	24408	2.27	1150	0.69	4535	1.82
N106I, S118F	808	1776	0.05	1385	0.13	9058	5.44	1370	0.55
V29A, L32P, S118F	1514	1265	0.04	1148	0.11	5057	3.04	1194	0.48
A112V	832	69673	1.99	6387	0.59	1140	0.68	1214	0.49
Y33H, V101M, A112V	1513	133815	3.83	24992	2.32	1184	0.71	6338	2.54
P28S, Y33H, N106I, S118Y	941	2745	0.08	1689	0.16	6625	3.98	1978	0.79
Y33H, V101M, N106I, A112V	1515	118654	3.40	21828	2.03	1253	0.75	3871	1.55
R12W, Y33H, N47K, Q79R, S118Y	1516	171390	4.91	5077	0.47	1124	0.68	2636	1.06
A112V, S118T	834	103203	2.95	15076	1.40	1155	0.69	1426	0.57
Y33H, A46T, A112V, S118T	1517	141859	4.06	29436	2.74	1184	0.71	5760	2.31
Y33H, A112V, F114L, S118T	1518	5161	0.15	1734	0.16	1184	0.71	1249	0.50
A112V	832	78902	2.26	6224	0.58	1114	0.67	1181	0.47
Y33H, T38A, A46T, V101M, A112V	1519	111293	3.19	25702	2.39	1192	0.72	99015	39.69
Q79R, A112V	947	96674	2.77	7264	0.67	1130	0.68	1216	0.49
Y33H, N106I, S118Y	957	5720	0.16	1453	0.14	6543	3.93	1248	0.50
P28S, Y33H, S69P, N106I, A112V, S118Y	1520	22393	0.64	1378	0.13	1550	0.93	19174	7.68
Y33H, P42L, N47K, V101M, A112V	1521	214116	6.13	13878	1.29	1315	0.79	4753	1.91
Y33H, N47K, F74S, Q83K, N106I, F111L, A112V, S118T	1522	6719	0.19	1319	0.12	1305	0.78	1278	0.51
Y33H, A112V, S118T, V119A	1523	184794	5.29	10204	0.95	1269	0.76	4321	1.73
Y33H, N106I, A112V, S118F	1524	6872	0.20	1591	0.15	2308	1.39	2796	1.12
Y33H, K66M, S118F, W124L	1525	1724	0.05	1259	0.12	6782	4.07	1197	0.48
S118F	802	1325	0.04	1213	0.11	7029	4.22	1135	0.46

10

20

30

CD112 変異	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 20nM	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加	20nM での MFI	WT IgV に対する 倍率増加
N106I, A112V	811	111342	3.19	4241	0.39	1546	0.93	1178	0.47
Y33H, A112V	824	177926	5.09	13761	1.28	1152	0.69	3117	1.25
WT CD112 IgV	795	34932	1.00	10762	1.00	1665	1.00	2495	1.00
WT CD112-Fc ECD	48 (ECD)	28277	0.81	8023	0.75	1253	0.75	1064	0.43
抗 huFc PE	-	1138	0.03	1006	0.09	1010	0.61	1062	0.43

10

## 【 0 6 7 1 】

(表 1 5 A) 選択した PD-L1 バリエーション及び結合データ

PD-L1 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合	
		50nMでのMFI	野生型PD-L1 IgV-Fcからの 倍率増加
K28N, M41V, N45T, H51N, K57E	1389	12585	2.4
I20L, I36T, N45D, I47T	1390	3119	0.6
I20L, M41K, K44E	1391	9206	1.8
P6S, N45T, N78I, I83T	1392	419	0.1
N78I	1393	2249	0.4
M41K, N78I	1394	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
N17D, N45T, V50A, D72G	1400	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
I20L, F49S	1401	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
N45T, V50A	1402	23887	4.6
I20L, N45T, N78I	1403	29104	5.6
N45T, N78I	1395	24865	4.7
I20L, N45T	1396	24279	4.6
I20L, N45T, V50A	1404	34158	6.5
N45T	1397	6687	1.3
M41K	1398	5079	1.0
M41V, N45T	1405	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
M41K, N45T	1406	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
A33D, S75P, D85E	1407	685	0.1
M18I, M41K, D43G, H51R, N78I	1408	20731	4.0
V11E, I20L, I36T, N45D, H60R, S75P	1409	3313	0.6
A33D, V50A	1410	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
S16G, A33D, K71E, S75P	1411	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
E27G, N45T, M97I	1412	881	0.2
E27G, N45T, K57R	1413	5022	1.0
A33D, E53V	1414	650	0.1

20

30

40

PD-L1 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合	
		50nMでのMFI	野生型PD-L1 IgV-Fcからの倍率増加
D43G, N45D, V58A	1415	63960	12.2
E40G, D43V, N45T, V50A	1416	809	0.2
Y14S, K28E, N45T	1417	16232	3.1
A33D, N78S	1418	1725	0.3
A33D, N78I	1419	8482	1.6
A33D, N45T	1420	17220	3.3
A33D, N45T, N78I	1421	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない	
E27G, N45T, V50A	1422	25267	4.8
N45T, V50A, N78S	1423	28572	5.4
N45T, V50A	1402	18717	3.6
I20L, N45T, V110M	1424	464	0.1
I20L, I36T, N45T, V50A	1425	7658	1.5
N45T, L74P, S75P	1426	5251	1.0
N45T, S75P	1427	12200	2.3
S75P, K106R	1428	388	0.1
S75P	1429	1230	0.2
A33D, S75P	1430	306	0.1
A33D, S75P, D104G	1431	251	0.0
A33D, S75P	1430	1786	0.3
I20L, E27G, N45T, V50A	1433	29843	5.7
I20L, E27G, D43G, N45D, V58A, N78I	1434	69486	13.3
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I	1435	72738	13.9
I20L, A33D, D43G, N45D, V58A, N78I	1436	80205	15.3
I20L, D43G, N45D, N78I	1437	67018	12.8
E27G, N45T, V50A, N78I	1438	30677	5.9
N45T, V50A, N78I	1439	32165	6.1
V11A, I20L, E27G, D43G, N45D, H51Y, S99G	1440	73727	14.1
I20L, E27G, D43G, N45T, V50A	1441	36739	7.0
I20L, K28E, D43G, N45D, V58A, Q89R,	1442	80549	15.4
I20L, I36T, N45D	1443	16870	3.2
I20L, K28E, D43G, N45D, E53G, V58A, N78I	1444	139	0.0
A33D, D43G, N45D, V58A, S75P	1445	58484	11.2
K23R, D43G, N45D	1446	67559	12.9
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I, D90G, G101D	1447	259	0.0
D43G, N45D, L56Q, V58A, G101G-ins(G101GG)	1448	88277	16.8
I20L, K23E, D43G, N45D, V58A, N78I	1449	89608	17.1

PD-L1 変異	SEQ ID NO (IgV)	Jurkat/PD-1細胞への結合	
		50nMでのMFI	野生型PD-L1 IgV-Fcからの倍率増加
I20L, K23E, D43G, N45D, V50A, N78I	1450	88829	16.9
T19I, E27G, N45I, V50A, N78I, M97K	1451	25496	4.9
I20L, M41K, D43G, N45D	1452	599	0.1
K23R, N45T, N78I	1453	84980	16.2
完全長 PD-L1 Fc	-	18465	3.5
野生型 PD-L1 IgV	1454	5243	1.0
抗PD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)	-	79787	15.2
ヒト IgG	-	198	0.0

10

20

30

40

50

【 0 6 7 2 】

(表 1 5 B) PD-1 または CD80 を発現する細胞へのフロー結合

PD-L1 変異	SEQ ID NO (ECD)	PD-1		CD80	
		20nM での MFI	WT PD-L1 と比較した 倍率変化	20nM での MFI	WT PD-L1 と比較した 倍率変化
K57R, S99G	1813	2953	0.9	16253	121.3
K57R, S99G, F189L	1814	1930	0.6	12906	96.3
M18V, M97L, F193S, R195G, E200K, H202Q	1815	69	0.0	241	1.8
I36S, M41K, M97L, K144Q, R195G, E200K, H202Q, L206F	1816	3498	1.1	68715	512.8
C22R, Q65L, L124S, K144Q, R195G, E200N, H202Q, T221L	1817	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない			
M18V, I98L, L124S, P198T, L206F	1818	2187	0.7	143	1.1
S99G, N117S, I148V, K171R, R180S	1819	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない			
I36T, M97L, A103V, Q155H	1820	120	0.0	128	1.0
K28I, S99G	1821	830	0.3	693	5.2
R195S	1822	3191	1.0	138	1.0
A79T, S99G, T185A, R195G, E200K, H202Q, L206F	1823	1963	0.6	643	4.8
K57R, S99G, L124S, K144Q	1824	2081	0.7	14106	105.3
K57R, S99G, R195G	1825	2479	0.8	10955	81.8
D55V, M97L, S99G	1826	11907	3.8	71242	531.7
E27G, I36T, D55N, M97L, K111E	1827	1904	0.6	88724	662.1
E54G, M97L, S99G	1828	8414	2.7	51905	387.4
G15A, I36T, M97L, K111E, H202Q	1829	112	0.0	13530	101.0
G15A, I36T, V129D	1830	114	0.0	136	1.0
G15A, I36T, V129D, R195G	1831	125	0.0	134	1.0
G15A, V129D	1832	2075	0.7	128	1.0
I36S, M97L	1833	3459	1.1	44551	332.5

10

20

PD-L1 変異	SEQ ID NO (ECD)	PD-1		CD80	
		20nMでのMFI	WT PD-L1と比較した倍率変化	20nMでのMFI	WT PD-L1と比較した倍率変化
I36T, D55N, M97L, K111E, A204T	1834	265	0.1	62697	467.9
I36T, D55N, M97L, K111E, V129A, F173L	1835	393	0.1	72641	542.1
I36T, D55S, M97L, K111E, I148V, R180S	1836	94	0.0	30704	229.1
I36T, G52R, M97L, V112A, K144E, V175A, P198T	1837	81	0.0	149	1.1
I36T, I46V, D55G, M97L, K106E, K144E, T185A, R195G	1838	69	0.0	190	1.4
I36T, I83T, M97L, K144E, P198T	1839	62	0.0	6216	46.4
I36T, M97L, K111E	1840	産生されたタンパク質はほとんどまたは全くない			
I36T, M97L, K144E, P198T	1841	197	0.1	40989	305.9
I36T, M97L, Q155H, F193S, N201Y	1842	69	0.0	1251	9.3
I36T, M97L, V129D	1843	523	0.2	50905	379.9
L35P, I36S, M97L, K111E	1844	190	0.1	155	1.2
M18I, I36T, E53G, M97L, K144E, E199G, V207A	1845	104	0.0	47358	353.4
M18T, I36T, D55N, M97L, K111E	1846	138	0.0	71440	533.1
M18V, M97L, T176N, R195G	1847	1301	0.4	45300	338.1
M97L, S99G	1848	12906	4.1	81630	609.2
N17D, M97L, S99G	1849	10079	3.2	73249	546.6
S99G, T185A, R195G, P198T	1850	2606	0.8	22062	164.6
V129D, H202Q	1851	2001	0.6	219	1.6
V129D, P198T	1852	3245	1.0	152	1.1
V129D, T150A	1853	1941	0.6	142	1.1
V93E, V129D	1854	1221	0.4	150	1.1
Y10F, M18V, S99G, Q138R, T203A	1855	70	0.0	412	3.1
WT PD-L1 (IgV+IgC) Fc	1812	3121	1.0	134	1.0
CTLA4-Fc	-	59	N/A	199670	N/A
抗 PD1 mAb	-	31482	N/A	134	N/A
Fc 対照	1189	59	N/A	132	N/A

10

20

30

## 【 0 6 7 3 】

(表 1 5 C) 追加の親和性成熟 I g S F ドメイン含有分子

PD-L1 変異	SEQ ID NO (ECD)	PD-L1 変異	SEQ ID NO (ECD)
N45D	1945	N45D, G102D, R194W, R195G	1969
K160M, R195G	1946	N45D, G52V, Q121L, P198S	1970
N45D, K144E	1947	N45D, I148V, R195G, N201D	1971
N45D, P198S	1948	N45D, K111T, T183A, I188V	1972
N45D, P198T	1949	N45D, Q89R, F189S, P198S	1973
N45D, R195G	1950	N45D, S99G, C137R, V207A	1974
N45D, R195S	1951	N45D, T163I, K167R, R195G	1975
N45D, S131F	1952	N45D, T183A, T192S, R194G	1976
N45D, V58D	1953	N45D, V50A, I119T, K144E	1977
V129D, R195S	1954	T19A, N45D, K144E, R195G	1978
I98T, F173Y, L196S	1955	V11E, N45D, T130A, P198T	1979
N45D, E134G, L213P	1956	V26A, N45D, T163I, T185A	1980
N45D, F173I, S177C	1957	K23N, N45D, L124S, K167T, R195G	1981
N45D, I148V, R195G	1958	K23N, N45D, Q73R, T163I	1982
N45D, K111T, R195G	1959	K28E, N45D, W149R, S158G, P198T	1983
N45D, N113Y, R195S	1960	K28R, N45D, K57E, I98V, R195S	1984
N45D, N165Y, E170G	1961	K28R, N45D, V129D, T163N, R195T	1985
N45D, Q89R, I98V	1962	M41K, D43G, N45D, R64S, R195G	1986
N45D, S131F, P198S	1963	M41K, D43G, N45D, R64S, S99G	1987
N45D, S75P, P198S	1964	N45D, R68L, F173L, D197G, P198S	1988
N45D, V50A, R195T	1965	N45D, V50A, I148V, R195G, N201D	1989
E27D, N45D, T183A, I188V	1966	M41K, D43G, K44E, N45D, R195G, N201D	1990
F173Y, T183I, L196S, T203A	1967	N45D, V50A, L124S, K144E, L179P, R195G	1991
K23N, N45D, S75P, N120S	1968		

10

20

30

40

50

## 【実施例 9】

## 【0674】

異なる親和性改変ドメインを含有するスタック分子の生成

本実施例は、上記の特定されたバリエーション PD-L2 ポリペプチド及び特定されたバリエーション CD155 ポリペプチドの少なくとも2つの異なる親和性改変 IgV ドメインを含有するマルチドメインスタック構築物として生成されたさらなる免疫調節タンパク質について記載する。具体的には、例示的なバリエーション PD-L2 IgV H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D (SEQ ID NO: 328) 及び例示的なバリエーション CD155 IgV 分子 P18S/S65W/S67A/L104Q/G111R (SEQ ID NO: 1598) を互いに連結し、様々な構成で Fc に融合した。スタック構築物は、鎖全体をコードする遺伝子ブロック (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) として得られたか、または次の Gibson アセンブリの様々な構成の PDL2-CD155 をコードする遺伝子ブロックを Gibson アセンブリキット (New England Biolabs) を使用して Fc 融合ベクターに入れて得ることにより生成した。ホモ二量体スタック及びヘテロ二量体スタックは、図 5A 及び以下に要約されるように、様々な構成で生成した。

## 【0675】

バリエーション PD-L2 IgV 及びバリエーション CD155 IgV が、2xGGGS (SEQ ID NO: 264) または 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) ペプチドリンカーを介してヒト IgG1 Fc 領域の N 末端または C 末端に様々な連結した同一の Fc サブユニットを含むホモ二量体スタック構築物を生成した。本試験では、例示的な IgG1 Fc サブユニットは SEQ ID NO: 1189 に記載され、EU 番号付けによる変異 L234A、L235E、G237A、E356D、及び M358L を含

有する (SEQ ID NO: 211 に記載の野生型ヒト IgG1 Fc を基準として L19A、L20E、G22A、E141D、及び M143L に対応)。さらに、Fc 領域は、SEQ ID NO: 211 に記載の野生型または非改変 Fc (EU 番号付けによる C220S に対応) と比較して、5 位のシステイン残基のセリン残基への置換 (C5S) を含んだ。いくつかの実施例では、上記の変異を含み、SEQ ID NO: 211 に記載の野生型または非改変 Fc の位置 232 に対応する C 末端リジンをさらに欠く (EU 番号付けによる K447del に対応)、SEQ ID NO: 1189 に記載の例示的な IgG1 Fc を使用した。他の Fc 領域もまたスタック分子の生成に適する。例示的な生成されたスタックを以下に示す。

【0676】

10

PD-L2 (SEQ ID NO: 328) 及び CD155 (SEQ ID NO: 1598) 由来のバリエーション IgV ドメインの様々な構成を含むホモ二量体バリエーション IgV スタック Fc 融合分子を、実施例 5 に記載されるように実質的に発現及び精製した。

【0677】

コード核酸分子は、示される順の配列を有する様々な構成でホモ二量体スタックを生成するように設計した。

・ PD-L2 / CD155 スタック 1 (SEQ ID NO: 1191) : CD155 バリエーション (SEQ ID NO: 1598) - 2 x GGGG (SEQ ID NO: 264) - Fc (SEQ ID NO: 1189) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328)

20

・ PD-L2 / CD155 スタック 2 (SEQ ID NO: 1192) : PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 2 x GGGG (SEQ ID NO: 264) - Fc (SEQ ID NO: 1189) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - CD155 バリエーション (SEQ ID NO: 1598)

・ PD-L2 / CD155 スタック 3 (SEQ ID NO: 1193) : CD155 バリエーション (SEQ ID NO: 1598) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 2 x GGGG (SEQ ID NO: 264) - Fc (SEQ ID NO: 1189)

・ PD-L2 / CD155 スタック 4 (SEQ ID NO: 1194) : PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - CD155 バリエーション (SEQ ID NO: 1598) - 2 x GGGG (SEQ ID NO: 264) - Fc (SEQ ID NO: 1189)

30

・ PD-L2 / CD155 スタック 5 (SEQ ID NO: 1195) : Fc (SEQ ID NO: 1189) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - CD155 バリエーション (SEQ ID NO: 1598) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328)

・ PD-L2 / CD155 スタック 6 (SEQ ID NO: 1196) : Fc (SEQ ID NO: 1189) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3 x GGGG (SEQ ID NO: 263) - CD155 バリエーション (SEQ ID NO: 1598)

40

【0678】

ヘテロ二量体スタックは、2つの方法で生成した。第1の方法は、「ノブ・イントゥ・ホール」操作によるヘテロ二量体分子の発現のための、(1) 第1の「ノブ」Fc サブユニット (SEQ ID NO: 211 に記載の野生型ヒト IgG1 Fc に基づいて S139C 及び T151W に対応する、EU 番号付けによる変異 S354C 及び T366W を含む SEQ ID NO: 1187 に記載される)、ならびに (2) 第2の「ホール」Fc サブユニット (SEQ ID NO: 211 に記載の野生型ヒト IgG1 Fc に基づいて Y134C、T151S、L153A 及び Y192V に対応する、EU 番号付けによる変異 Y349C、T366S、L368A 及び Y407V を含む SEQ ID NO: 1188 に記載される)、に融合されるバリエーション PD-L2 IgV 及び / またはバリ

50

アントCD155 IgVの共発現によるものであった。加えて、ノブ及びホールFcの両方は、それぞれSEQ ID NO: 211に記載の野生型または非改変Fc（それぞれ、EU番号付けによるC220S、L234A、L235E及びG237Aに対応）と比較して、エフェクター機能を低下させる変異L19A、L20E、G22Aも含有し、5位のシステイン残基のセリン残基への置換（C5S）が含まれていた。第2の方法では、PDL2及びノブまたはCD155をノブ及びホールFcの両方に融合して、各鎖が融合IgVドメイン（複数可）を持つFcで構成されるスタックを生成した。Fc配列が配列のN末端部分にある構築物については、スタッパー配列HMSSVSAQ（SEQ ID NO: 1190）をFc配列の直前に追加した。

【0679】

PDL2（SEQ ID NO: 328）及びCD155（SEQ ID NO: 1598）由来の変異体IgVドメインの様々な構成を含むヘテロ二量体バリエーションIgVスタックFc融合分子を、実施例5に記載されるように実質的に発現及び精製した。各スタックについて、ノブ及びホールのコード核酸分子は、示される順の配列を有する様々な構成のヘテロ二量体スタックを産生するように設計した。

・PDL2/CD155スタック7 (1)ノブFc融合体（SEQ ID NO: 1197）: CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）- 2xGGGS（SEQ ID NO: 264）- ノブFc（SEQ ID NO: 1187）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- PDL2（SEQ ID NO: 328）及び(2)ホールFc（SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190に記載のN末端HMSSVSAQ）を含有する

・PDL2/CD155スタック8 (1)ノブFc融合体（SEQ ID NO: 1198）: PDL2（SEQ ID NO: 328）- 2xGGGS（SEQ ID NO: 264）- ノブFc（SEQ ID NO: 1187）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）及び(2)ホールFc（SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190に記載のN末端HMSSVSAQ）を含有する

・PDL2/CD155スタック9 (1)ノブFc融合体（SEQ ID NO: 1199）: CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）- 2xGGGS（SEQ ID NO: 264）- ノブFc（SEQ ID NO: 1187）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- PDL2（SEQ ID NO: 328）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- PDL2（SEQ ID NO: 328）; 及び(2)ホールFc（SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190に記載のN末端HMSSVSAQ）を含有する

・PDL2/CD155スタック10 (1)ノブFc融合体（SEQ ID NO: 1200）: PDL2（SEQ ID NO: 328）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- PDL2（SEQ ID NO: 328）- 2xGGGS（SEQ ID NO: 264）- ノブFc（SEQ ID NO: 1187）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）; 及び(2)ホールFc（SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190に記載のN末端HMSSVSAQ）を含有する

・PDL2/CD155スタック11 (1)ノブFc融合体（SEQ ID NO: 1201）: CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- CD155バリエーション（SEQ ID NO: 1598）- 2xGGGS（SEQ ID NO: 264）- ノブFc（SEQ ID NO: 1187）; 及び(2)ホールFc融合体（SEQ ID NO: 1202）: PDL2（SEQ ID NO: 328）- 3xGGGS（SEQ ID NO: 263）- PDL2（SEQ ID NO: 328）- 2xGGGS（SEQ ID NO: 2

10

20

30

40

50

64) - ホールFc (SEQ ID NO: 1188) を含有する  
 ・ PD-L2 / CD155 スタック 12 (1) ノブFc 融合体 (SEQ ID NO: 1203) : ノブFc (SEQ ID NO: 1187、及びSEQ ID NO: 1190 に記載のN末端HMSSVSAQ) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) ; 及び (2) ホールFc (SEQ ID NO: 1204) : ホールFc (SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190 に記載のN末端HMSSVSAQ) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) を含有する 10

・ PD-L2 / CD155 スタック 13 (1) ノブFc 融合体 (SEQ ID NO: 1199) : CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 2xGGGS (SEQ ID NO: 264) - ノブFc (SEQ ID NO: 1187) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) ; 及び (2) ホールFc (SEQ ID NO: 1204) : ホールFc (SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190 に記載のN末端HMSSVSAQ) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) を含有する 20

・ PD-L2 / CD155 スタック 14 (1) ノブFc 融合体 (SEQ ID NO: 1199) : CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 2xGGGS (SEQ ID NO: 264) - ノブFc (SEQ ID NO: 1187) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) ; 及び (2) ホールFc 融合 (SEQ ID NO: 1202) : PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 2xGGGS (SEQ ID NO: 264) - ホールFc (SEQ ID NO: 1188) を含有する 30

・ PD-L2 / CD155 スタック 15 (1) ノブFc 融合体 (SEQ ID NO: 1200) : PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 2xGGGS (SEQ ID NO: 264) - ノブFc (SEQ ID NO: 1187) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) ; 及び (2) ホールFc 融合体 (SEQ ID NO: 1202) : PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 2xGGGS (SEQ ID NO: 264) - ホールFc (SEQ ID NO: 1188) を含有する 40

・ PD-L2 / CD155 スタック 16 (1) ノブFc 融合体 (SEQ ID NO: 1200) : PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 2xGGGS (SEQ ID NO: 264) - ノブFc (SEQ ID NO: 1187) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) - 3xGGGS (SEQ ID NO: 263) - CD155 パリアント (SEQ ID NO: 1598) ; 及び (2) ホールFc (SEQ ID NO: 1204) : ホールFc (SEQ ID NO: 1188、及びSEQ ID NO: 1190 に 50

記載のN末端HMSVSAQ) - 3xGGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) - 3xGGGGS (SEQ ID NO: 263) - PD-L2 (SEQ ID NO: 328) を含有する

【実施例10】

【0680】

分泌型免疫調節タンパク質の生成

PD-L2分泌型免疫調節タンパク質(SIP)を生成するため、例示的なSIPをコードするDNAを、Integrated DNA Technologies (Coralville, USA)から遺伝子ブロックとして得、次いで、Gibsonアセンブリ(New England Biolabs Gibsonアセンブリキット)によりMNDプロモーターの下流の制限部位間でpRRLベクターの改変バージョンへとクローニングし(Dullet et al., (1998) J Virol, 72(11): 8463-8471)、GFPを除去した。例示的なSIP構築物を、シグナルペプチドを含むSEQ ID NO: 1254~1257に記載のタンパク質をコードするように生成した。例示的な実施例では、構築物をタグ部分をさらに含むように生成した。遺伝子ブロックは次の順序の構成であった: 第1の制限部位の前にpRRLと重複する39塩基対 - 第1の制限部位 - GCCGCCACC (Kozak); SEQ ID NO: 115に記載のPD-L2 IgV野生型アミノ酸配列をコードする完全なORF、またはSEQ ID NO: 316 (H15Q, V31M, S67L, Q82R, V89D)、SEQ ID NO: 328 (H15Q, T47A, K65R, S67L, Q82R, V89D) もしくはSEQ ID NO: 342 (H15Q, T47A, S67L, R76G, Q82R, V89D)に記載のパリアントPD-L2 IgV、全ての場合において、SEQ ID NO: 1251に記載のPD-L2シグナルペプチドMIFLLMLSLLEQLHQIAAも含む; SEQ ID NO: 1252に記載のAvitagタグをコードするDNA (GLNDIFEAQKIEWHE); SEQ ID NO: 1253に記載のHisタグをコードするDNA (HHHHHH); TAA終止コドン; 第2の制限部位 - 第2の制限部位を超えてpRRLと重複する41塩基対。

10

20

【0681】

レンチウイルスベクターを調製するため、100mm皿当たり $3 \times 10^6$ のHEK293細胞をプレATINGした。翌日、4.5 $\mu$ gのP-Mix (3 $\mu$ gのPAX2及び1.5 $\mu$ gのpMD2G)を5mLのポリプロピレンチューブ中のSIP構築物をコードする6 $\mu$ gのDNAに加えた。希釈バッファー(10mM HEPES / 150mM NaCl pH7.05 / 1L TCグレードH20)をチューブに加えて、総量500 $\mu$ Lにした。希釈DNA(PEI:全DNA 4:1)に42 $\mu$ LのPEI(1 $\mu$ g/ $\mu$ L)を加え、ボルテックスで混合した。該混合物を室温で10分間インキュベートし、接着細胞を乱すことなく皿から培地を静かに吸引することにより細胞を調製し、次いで6mLのOpti-MEM(1X)と交換した。次いで、DNA/PEI混合物を皿に加え、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。24時間後、培地を皿から吸引し、10mLの新鮮なDMEM培地と交換し、その後、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。ウイルス上清を、0.45 $\mu$ mフィルターPESに接続したシリンジを使用して48時間後に収集し、培養物から細胞及び細胞片を除去した(Thermo Scientific Nalgene Syringe Filter)。実質的に記載のように、抗CD19 CAR(抗CD19 scFv、CD8由来ヒンジ及び膜貫通ドメイン、及びCD3シグナル伝達ドメインを含む)をコードする別個のレンチウイルスベクターストックも調製した。使用した例示的な抗CD19 CARは、SEQ ID NO: 1211に記載のscFv、SEQ ID NO: 266に記載のCD8由来ヒンジ及び膜貫通ドメイン、ならびにSEQ ID NO: 267に記載のCD3を含むSEQ ID NO: 2024 (SEQ ID NO: 2025に記載の配列によりコードされる)に記載される。

30

40

【0682】

汎T細胞に、PD-L2 SIPをコードするウイルスベクターで形質導入した。T細胞

50

胞を解凍し、1 : 1の比率で抗CD3 / 抗CD28ビーズ (Dyna1) で活性化した。T細胞 (  $1 \times 10^6$  細胞 ) を、記載のPD-L2 SIPをコードする等量 (各0.5 mL) のレンチウイルスベクター上清及び抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクター上清を含む合計1 mLのレンチウイルスベクター上清と混合した。対照として、細胞は抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクターのみにより形質導入されたか、またはモックベクター対照により形質導入された。形質導入を10  $\mu$ g / mLのポリブレン及び50 IU / mLのIL-2の存在下で行った。細胞を30 で60分間、2500 rpmでスピンドウンした。24時間後、3 mLのXvivo15プラス培地及びIL2を各ウェルに加えた。2日ごとに新鮮な培地及びサイトカインを細胞に与えた。

【0683】

HEK-293細胞にも形質導入を行い、 $2 \times 10^5$  個の細胞に1 mLの記載のPD-L2 SIPをコードするレンチウイルス上清を加えて再懸濁した。細胞に、3 mLのDMEM培地を加え、2日ごとに新鮮な培地を細胞に与えた。

【0684】

分泌されたSIPの量を評価するため、細胞ベースアッセイを実施して、分泌可能なバリエーションPD-L2のPD-1への結合を評価した。おおよそ、上記の形質導入細胞から得られたPD-L2 SIPを含む50  $\mu$ Lの培養上清の存在下で、ウェルあたり約100,000個のPD-1 + Jurkat細胞をプレATINGし、4 で30分間インキュベートした。標準曲線を作成するため、それぞれのバリエーションPD-L2タンパク質50  $\mu$ Lを、PD-1 + Jurkat細胞に10  $\mu$ g / mL、3  $\mu$ g / mL、1  $\mu$ g / mL、0.3  $\mu$ g / mL、0.1  $\mu$ g / mL、及び0  $\mu$ g / mLで添加し、また4 で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、50  $\mu$ Lの抗his-APCを加え (1 : 50)、これを4 で30分間インキュベートした。表面結合PD-L2タンパク質をフローサイトメトリーにより検出し、上清試料中のSIPの濃度は標準曲線との比較により決定した。図11A及び11Bに示すように、SIPタンパク質が形質導入されたT細胞及び形質導入されたHEK293細胞の上清で検出され、形質導入されたモックまたはSIPなしで形質導入された細胞の上清試料からは検出されなかった。

【実施例11】

【0685】

PD-L2 SIPで形質導入された汎T細胞の増殖及び生理活性の評価  
汎T細胞に、PD-L2 SIPをコードするウイルスベクターで実施例10に記載のように実質的に形質導入した。T細胞を解凍し、1 : 1の比率で抗CD3 / 抗CD28ビーズ (Dyna1) で活性化した。T細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) を、記載のPD-L2 SIPをコードする等量 (各0.5 mL) のレンチウイルスベクター上清及び抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクター上清を含む合計1 mLのレンチウイルスベクター上清と混合した。対照として、細胞は抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクターのみにより形質導入されたか、またはモックベクター対照により形質導入された。形質導入を10  $\mu$ g / mLのポリブレン及び50 IU / mLのIL-2の存在下で行った。細胞を30 で60分間、2500 rpmでスピンドウンした。24時間後、3 mLのXvivo15プラス培地及びIL2を各ウェルに加えた。2日ごとに新鮮な培地及びサイトカインを細胞に与えた。

【0686】

活性化後14日目に、細胞を、PD-L1の発現をもたらすためにレンチウイルスベクターにより形質導入されたNa1m6細胞で再刺激した。形質導入されたT細胞をCell Trace Far Redで標識し、色素の希釈を示した細胞の割合を決定することにより増殖を測定した。例示的な試験されたバリエーションPD-L2 SIPで形質導入されたT細胞の増殖試験の結果を図12Aに示す。

【0687】

上清に放出されたIFN- のレベルは、再刺激後5日目にELISAによって測定した。例示的な試験されたバリエーションPD-L2 SIPで形質導入されたT細胞の生理活

10

20

30

40

50

性研究の結果を図12Bに示す。PD-L2バリエーションSIPで形質導入されたT細胞は、SEQ ID NO: 31に記載の非改変(野生型)PD-L2ECD配列の位置に対応する位置を基準としてPD-L2のIgVにおけるアミノ酸置換を基準に特定する。図12A及び12Bに示すように、増殖、及び免疫学的活性を高める改善された活性が観察された。

【実施例12】

【0688】

親和性成熟IgSFドメイン含有スタック分子の細胞発現カウンター構造体及び生理活性への結合の評価

本実施例は、同族結合パートナーについて、実施例9で生成された例示的なPD-L2/CD155スタック免疫調節タンパク質の特異性及び親和性を示すためのFc融合結合試験について記載する。実施例9で生成された例示的なPD-L2/CD155スタック免疫調節タンパク質もまた、ヒト初代T細胞*in vitro*アッセイにおけるFc融合バリエーションタンパク質の生理活性特性について評価した。

10

【0689】

A. 細胞発現カウンター構造体に対する結合

結合試験を、ヒトPD-1(Jurkat/PD-1細胞)、ヒトTIGIT(Jurkat/TIGIT細胞)、またはその両方PD-1及びTIGIT(Jurkat/PD-1/TIGIT細胞)を安定して発現するように形質導入されたJurkat/IL-2レポーター細胞(Promega Corp. USAから購入)を使用して実施した。フローサイトメトリーによる染色のために、100,000個のJurkat/PD-1、Jurkat/TIGIT、Jurkat/PD-1/TIGIT細胞または陰性対照(Jurkatのみ)を、96ウェル丸底プレートにプレATINGした。細胞をスピンドウンし、染色緩衝液(PBS(リン酸緩衝生理食塩水)、1%BSA(ウシ血清アルブミン)、及び0.1%アジ化ナトリウム)中に20分間再懸濁して非特異的結合を遮断した。その後、細胞を再度遠心分離し、100nM~46pMの各候補Fc融合タンパク質を含む50µLの染色緩衝液に再懸濁した。一次染色を氷上で90分間実施した後、染色緩衝液200µL中で細胞を2回洗浄した。PEコンジュゲート抗ヒトFc(Jackson ImmunoResearch, USA)を50µLの染色緩衝液中1:150に希釈し、細胞に加えて氷上でさらに30分間インキュベートした。二次抗体を2回洗い流し、細胞を4%ホルムアルデヒド/PBS中で固定し、そして、Intellicytフローサイトメーター(Intellicyt Corp, USA)で試料を分析した。

20

30

【0690】

平均蛍光強度(MFI)をFlowJo Version 10ソフトウェア(FlowJo LLC, USA)で計算した。表16は、6.25nMの各スタックFc融合分子のJurkat/PD-1、Jurkat/TIGIT、及びJurkat/PD-1/TIGIT細胞への結合の平均蛍光強度(MFI)値によって測定される結合活性を示している。表16に示すように、いくつかのスタックタンパク質がPD-1及びTIGITの両方と高い親和性で結合している。

【0691】

40

(表16)細胞発現カウンター構造体へのPD-L2/CD155スタックの結合

カテゴリー	説明	SEQ ID NO	Jurkatトランスフェクタント への結合		
			6. 25nMでのMFI		
			PD1	TIGIT	TIGIT+ PD1
ホモ二量体	(CD155 IgV) – (G4S)2 – Fc – (G4S)3 – (PD-L2 IgV)	1191	242	19948	5336
	(PD-L2 IgV) – (G4S)2 – Fc – (G4S)3 – (CD155 IgV)	1192	16344	9095	16458
	(CD155 IgV) – (G4S)3 – (PD-L2 IgV) – (G4S)2 – Fc	1193	91	22342	8135
	(PD-L2 IgV) – (G4S)3 – (CD155 IgV) – (G4S)2 – Fc	1194	9218	14516	19256
	Fc – (G4S)3 – (CD155 IgV) – (G4S)3 – (PD-L2 IgV)	1195	108	5486	2905
	Fc – (G4S)3 – (PD-L2 IgV) – (G4S)3 – (CD155 IgV)	1196	66	9974	5202

カテゴリー	説明	SEQ ID NO	Jurkatトランスフェクタントへの結合			
			6. 25nMでのMFI			
			PD1	TIGIT	TIGIT+PD1	
ヘテロ二量体	(CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及び ホール Fc	1197+1188	107	2544	1512	10
	(PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及び ホール Fc	1198+1188	1658	360	6762	
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及び ホール Fc	1199+1188	289	8677	4371	
	(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及び ホール Fc	1200+1188	1594	2554	5509	
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc 及び (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ホール Fc	1201+1202	1758	9642	9343	20
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及び (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ホール Fc	1199+1202	4821	7596	8081	
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及び ホール Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV)	1199+1204	515	8299	4228	
	(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及び (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ホール Fc	1200+1202	10970	3339	9014	
(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及び ホール Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV)	1200+1204	3785	1475	5989	30	
対照	PDL2-IgV	328	22448	73	20280	40
	CD155-IgV	1598	133	22342	4893	
	Fc 対照 (ホモ二量体)	1189	44	86	66	
	Fc 対照 (ヘテロ二量体)	1187+1188	42	48	48	
	野生型CD155完全ECD Fc	20 (ECD)	64	4547	249	
	野生型PD-L2完全ECD Fc	4 (ECD)	392	46	314	
	無関係なIg対照	hIgG	41	48	41	

## 【 0 6 9 2 】

B. 混合リンパ球反応 (MLR) を用いた親和性成熟 Ig S F ドメイン含有分子の生理活性の評価

可溶性 PD - L 2 / CD 1 5 5 スタックタンパク質の生理活性を、ヒト混合リンパ球反応 (MLR) で試験した。ヒト初代樹状細胞 (DC) を、Ex - V i v o 1 5 培地 (L o n z a , S w i t z e r l a n d) 中、5 0 n g / m L の r I L - 4 (R & D S y s

t e m s , U S A ) 及 び 8 0 n g / m L の r G M - C S F ( R & D S y s t e m s , U S A ) と 共 に 7 日 間 i n v i t r o で 、 P B M C ( B e n T e c h B i o , U S A ) から 単 離 し た 単 球 を 培 養 す る こ と に よ り 生 成 し た 。 D C 成 熟 を 誘 導 す る た め 、 リ ポ 多 糖 ( L P S ) ( I n v i v o G e n C o r p . , U S A ) を 6 日 目 に D C 培 養 液 に 加 え 、 細 胞 を さ ら に 2 4 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 最 終 容 量 2 0 0  $\mu$  l の E x - V i v o 1 5 培 地 の 9 6 ウ ェ ル 丸 底 プ レ ー ト 中 で 、 お お よ そ 1 0 , 0 0 0 個 の 成 熟 D C 及 び 1 0 0 , 0 0 0 個 の 精 製 同 種 C D 3 + T 細 胞 ( B e n T e c h B i o , U S A ) を い く つ か の 濃 度 の P D - L 2 / C D 1 5 5 ス タ ッ ク ま た は 対 照 タ ン パ ク 質 と 共 培 養 し た 。 無 関 係 な ヒ ト I g G 及 び ホ モ 二 量 体 及 び ヘ テ ロ 二 量 体 の 空 の F c タ ン パ ク 質 を 陰 性 対 照 と し て 使 用 し た 。 陽 性 対 照 と し て 、 P D - L 2 - F c ( 完 全 な P D - L 2 細 胞 外 ド メ イ ン ) 、 野 生 型 C D 1 5 5 - F c ( 完 全 な C D 1 5 5 細 胞 外 ド メ イ ン ) を 評 価 し た 。 バ リ ア ン ト P D - L 2 I g V - F c 融 合 タ ン パ ク 質 を 2 0 n M で 試 験 し た 。 5 日 目 、 培 養 上 清 中 の I F N -  $\gamma$  分 泌 を 、 ヒ ト I F N -  $\gamma$  D u o s e t E L I S A キ ッ ト ( R & D S y s t e m s , U S A ) を 使 用 し て 分 析 し た 。 B i o T e k C y t a t i o n マ ル チ モ ー ド マ イ ク ロ プ レ ー ト リ ー ダ ー ( B i o T e k C o r p . , U S A ) で 光 学 濃 度 を 測 定 し 、 I F N -  $\gamma$  D u o s e t キ ッ ト ( R & D S y s t e m s , U S A ) に 含 ま れ る 滴 定 r I F N -  $\gamma$  標 準 に 対 し て 定 量 し た 。

10

**【0693】**

例示的な試験した P D - L 2 / C D 1 5 5 ス タ ッ ク タ ン パ ク 質 の 生 理 活 性 試 験 の 結 果 は 表 1 7 に ま と め ら れ 、 培 養 上 清 中 の I F N -  $\gamma$  の 算 出 レ ベ ル ( p g / m L ) を 記 載 す る 。 各 ス タ ッ ク タ ン パ ク 質 の 配 列 識 別 子 ( S E Q I D N O ) は 、 3 列 目 に 記 載 さ れ て い る 。 表 1 7 に 示 す よ う に 、 例 示 的 な P D - L 2 / C D 1 5 5 ス タ ッ ク タ ン パ ク 質 の 存 在 下 で イ ン キ ュ ベ ー ト し た 培 養 上 清 は 、 M L R ア ッ セ イ に お い て 変 化 し た I F N  $\gamma$  産 生 レ ベ ル を 示 し た 。

20

**【0694】**

( 表 1 7 ) P D - L 2 / C D 1 5 5 ス タ ッ ク の 生 理 活 性 デ ー タ

			混合リンパ球反応: 96時間でのIFNg	
カテゴリー	説明	SEQ ID NO	IFNg [pg/mL]	IgG対照と 比較した 倍率増加
ホモ二量体	(CD155 IgV) - (G4S)2 - Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV)	1191	3097.0	1.3
	(PD-L2 IgV) - (G4S)2 - Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV)	1192	3700.3	1.6
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - Fc	1193	3061.6	1.3
	(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - Fc	1194	2270.0	1.0
	Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV)	1195	2003.5	0.9
	Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV)	1196	2951.0	1.3
ヘテロ二量体	(CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及びホール Fc	1197+1188	2040.4	0.9
	(PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及びホール Fc	1198+1188	3768.6	1.6
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及びホール Fc	1199+1188	3549.7	1.5
	(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及びホール Fc	1200+1188	2568.6	1.1
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc 及び (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ホール Fc	1201+1202	2572.1	1.1
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及び (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ホール Fc	1199+1202	3216.7	1.4
	(CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) 及びホール Fc - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV)	1199+1204	2673.4	1.2
	(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及び (PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ホール Fc	1200+1202	2361.6	1.0
(PD-L2 IgV) - (G4S)3 - (PD-L2 IgV) - (G4S)2 - ノブ Fc - (G4S)3 - (CD155 IgV) - (G4S)3 - (CD155 IgV) 及びホール Fc	1200+1204	3311.8	1.4	

10

20

30

40

			混合リンパ球反応: 96時間でのIFN $\gamma$	
カテゴリー	説明	SEQ ID NO	IFN $\gamma$ [pg/mL]	IgG対照と比較した倍率増加
	-(G4S) <sub>3</sub> -(PD-L2 IgV)-(G4S) <sub>3</sub> -(PD-L2 IgV)			
対照	PDL2-IgV	328	2367.2	1.0
	CD155-IgV	1598	2590.7	1.1
	Fc 対照 (ホモ二量体)	1189	2617.9	1.1
	Fc 対照 (ヘテロ二量体)	1187+1188	2861.5	1.2
	野生型CD155完全ECD Fc	20 (ECD)	2481.0	1.1
	野生型PD-L2完全ECD Fc	4 (ECD)	3298.5	1.4
	無関係なIg対照	hIgG	2297.6	1.0

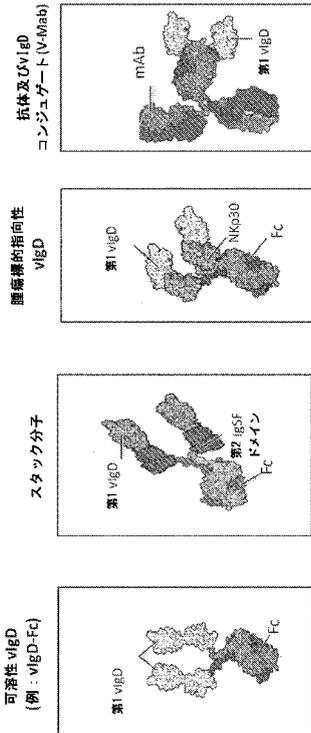
10

【 0 6 9 5 】

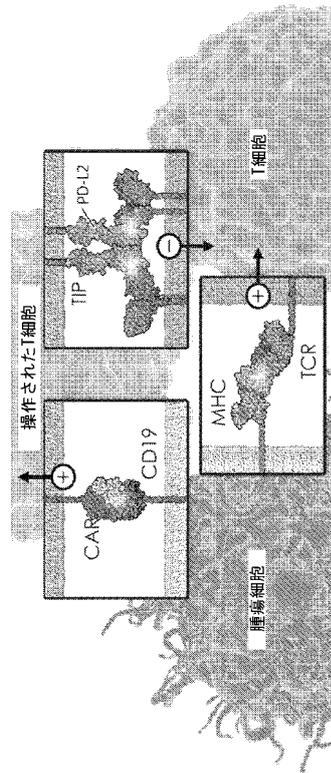
本発明は、例えば本発明の様々な態様を例示するために提供される、特定の開示された実施形態に範囲が限定されることを意図していない。記載の組成物及び方法に対する様々な修正が、本明細書の説明及び教示から明らかになるであろう。そのような変形は、本開示の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく実践されてよく、これが本開示の範囲内にあると意図される。

20

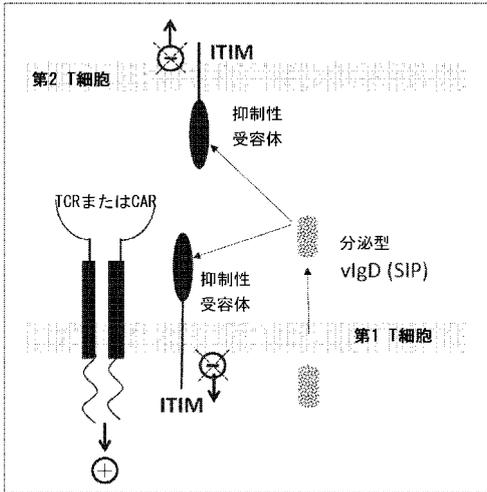
【 図 1 A 】



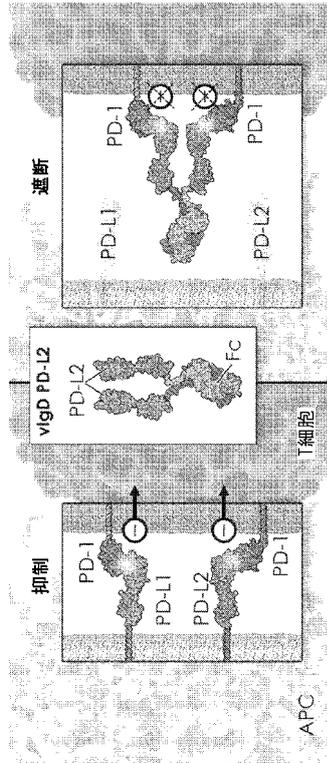
【 図 1 B 】



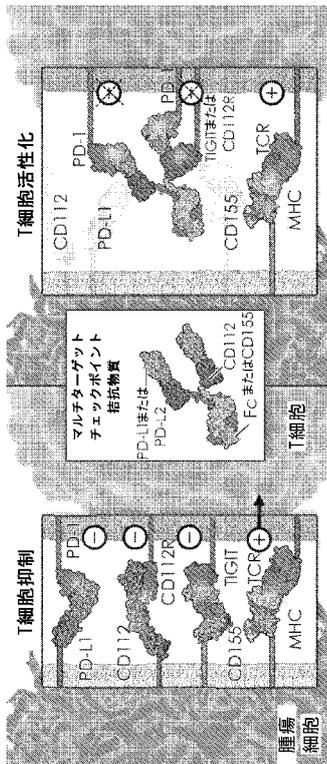
【図1C】



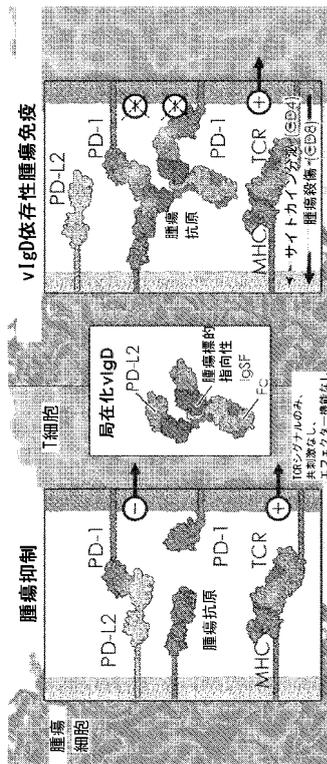
【図2】

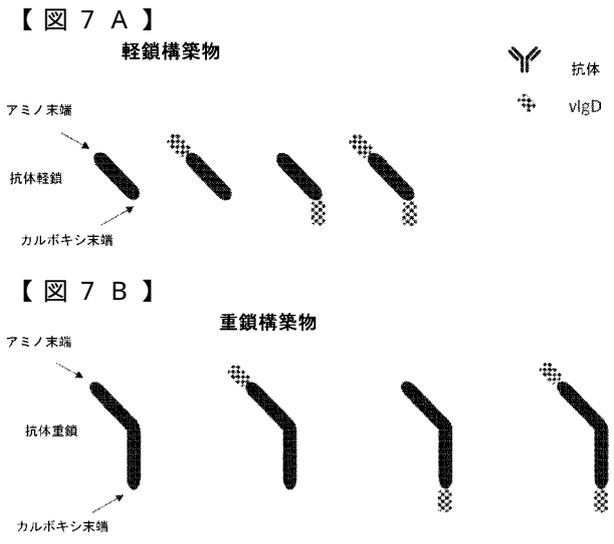
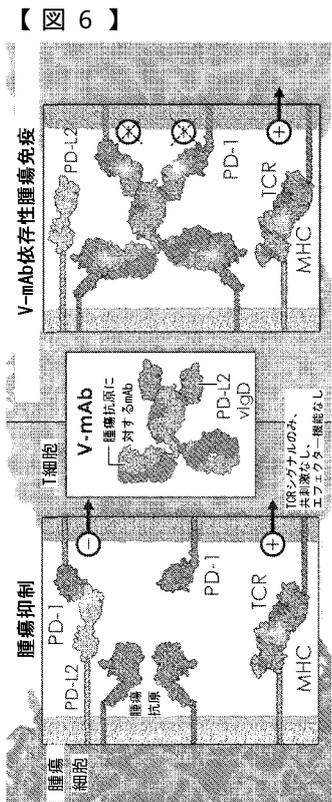
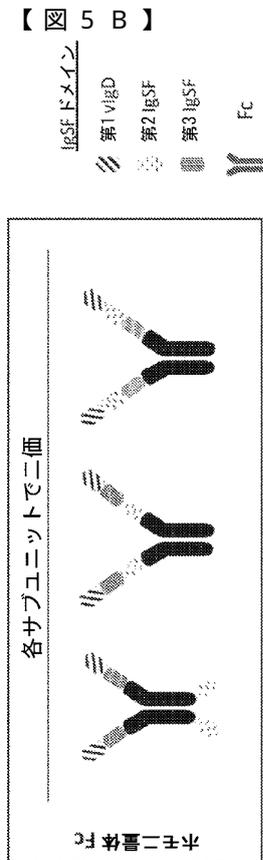
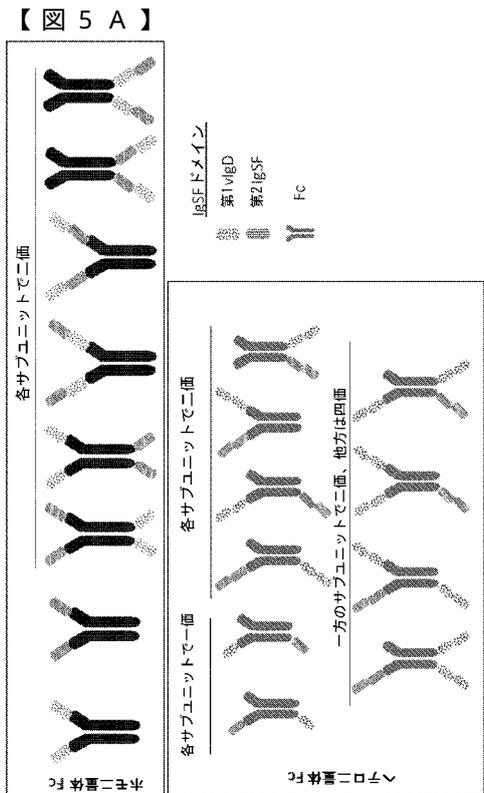


【図3】

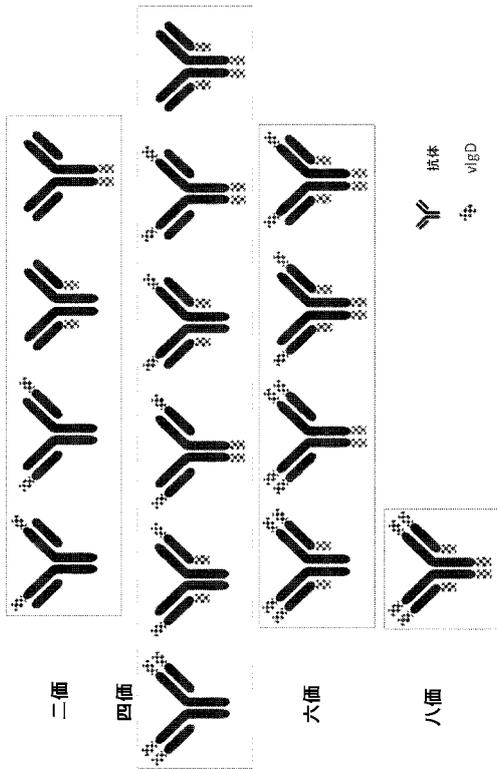


【図4】

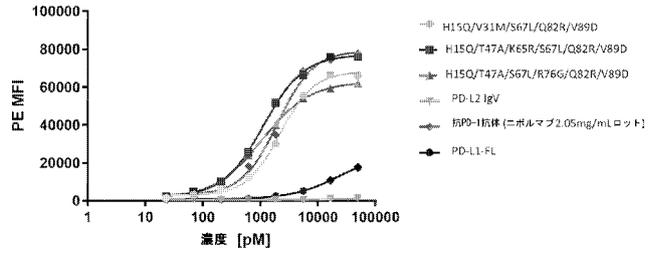




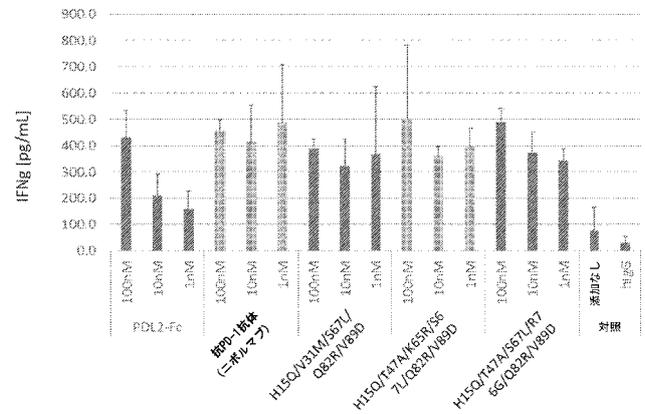
【 図 7 C 】



【 図 8 】

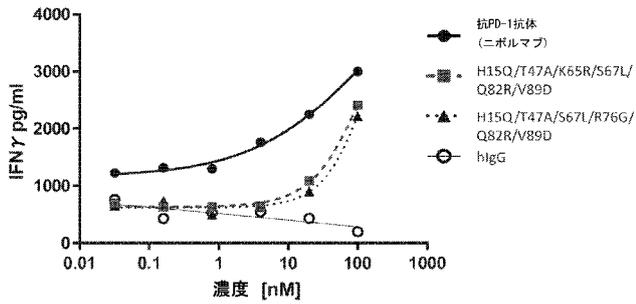


【 図 9 】



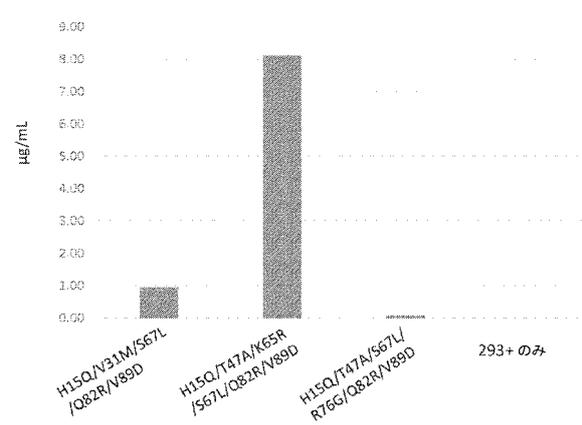
【 図 10 】

PD-L2バリエーションによるPD-1遮断はMLRアッセイにおけるIFNg産生を増加させる



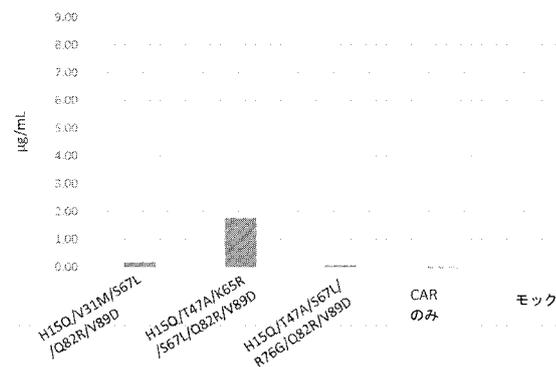
【 図 11 B 】

形質導入HEK-293細胞の上清において検出されたPD-L2 SIP



【 図 11 A 】

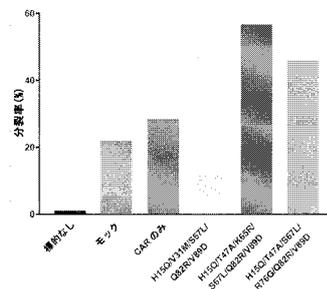
形質導入T細胞の上清において検出されたPD-L2 SIP



【 図 12 】

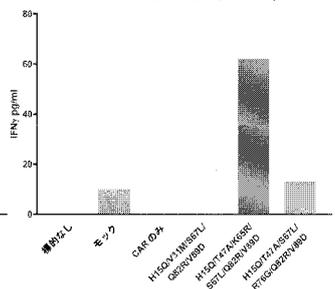
A

5日目の形質導入T細胞の培養



B

5日目の上清中で検出されたIFNg



【配列表】

2020511144000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/022267
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/705 A61K38/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/715 ADD. A61K38/17 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, EMBL, Sequence Search, COMPENDEX, FSTA		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8 445 447 B2 (CHEN LIEPING [US]; UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 21 May 2013 (2013-05-21)	1-30, 32, 35-39, 43-46, 50-65, 68, 69, 71-93
Y	the whole document claims; examples; sequences 64-68  ----- -/--	31-35, 40-42, 47-49, 66, 67, 70, 94
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 May 2018		03/08/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Madruga, Jaime

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/022267
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2010/027827 A2 (AMPLIMMUNE INC [US]; LANGERMANN SOLOMON [US]) 11 March 2010 (2010-03-11)</p> <p>the whole document pages 13,37-38; claims; examples -----</p>	<p>1,24,36, 50,56, 57,59, 60,62, 63,68, 71,74-77</p>
X	<p>MASATSUGU KOJIMA ET AL: "Fusion Protein of Mutant B7-DC and Fc Enhances the Antitumor Immune Effect of GM-CSF-secreting Whole-cell Vaccine :", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 37, no. 3, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 147-154, XP055386105, US ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0000000000000025 the whole document -----</p>	<p>1,24,36, 50,56, 57,59, 60,62, 63,68, 71,74-77</p>
A	<p>ASAMI NISHIMORI ET AL: "Identification and characterization of bovine programmed death-ligand 2 : Cloning of bovine PD-L2", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 58, no. 7, 1 July 2014 (2014-07-01), pages 388-397, XP055386102, JP ISSN: 0385-5600, DOI: 10.1111/1348-0421.12160 the whole document -----</p>	<p>1-94</p>
A	<p>Jeffrey Infante ET AL: "Overview Clinical and Pharmacodynamic (PD) Results of a Phase 1 Trial with AMP-224 (B7-DC Fc) that Binds to the PD-1 Receptor", 1 January 2013 (2013-01-01), XP055222440, Retrieved from the Internet: URL:http://carolinabiooncology.org/wp-content/uploads/2013/11/ASCO-2013-Poster-AMP-224.pdf [retrieved on 2015-10-20] the whole document -----</p>	<p>1-94</p>
A	<p>SRINIVASAN M ET AL: "IMMUNOMODULATORY PEPTIDES FROM IgSF PROTEINS", CURRENT PROTEIN AND PEPTIDE SCIENCE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 6, no. 2, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1-12, XP002993206, ISSN: 1389-2037, DOI: 10.2174/1389203053545426 the whole document -----</p>	<p>1-94</p>
	----- -/--	

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/022267
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>OMID VAFA ET AL: "An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations", METHODS, vol. 65, no. 1, 17 July 2013 (2013-07-17), - 1 January 2014 (2014-01-01), pages 114-126, XP055191082, ISSN: 1046-2023, DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.06.035 the whole document</p> <p>-----</p>	47-49
Y	<p>MAYA K LEABMAN ET AL: "Effects of altered Fc[gamma]R binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys", MABS, vol. 5, no. 6, 11 September 2013 (2013-09-11), - 1 November 2013 (2013-11-01), pages 896-903, XP055280952, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.26436 the whole document</p> <p>-----</p>	47-49
Y	<p>DANNY N. KHALIL ET AL: "The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy", NATURE REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY, vol. 13, no. 5, 15 March 2016 (2016-03-15), pages 273-290, XP055290129, NY, US ISSN: 1759-4774, DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.25 the whole document</p> <p>-----</p>	66,67, 70,94
Y	<p>WO 2016/168771 A2 (ALPINE IMMUNE SCIENCES INC [US]) 20 October 2016 (2016-10-20) the whole document paragraphs [[0411]], [[0065]], [[0295]] - [[0298]]; claims 67, 88-92 paragraph [[0073]]</p> <p>-----</p>	31-35, 40-42
X,P	<p>WO 2018/022945 A1 (ALPINE IMMUNE SCIENCES INC [US]) 1 February 2018 (2018-02-01) the whole document claims, tables, e.g. table 4, claims 12, 13, 66, claims 129, 142, examples, claims 70-74; paragraph [[0189]]</p> <p>-----</p>	1-94
X,P	<p>WO 2018/022946 A1 (ALPINE IMMUNE SCIENCES INC [US]) 1 February 2018 (2018-02-01) the whole document</p> <p>-----</p>	1-94

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2018/022267**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-94 (partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2018/ 022267

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-94(partially)

A variant PD-L2 (B7-DC/CD273) polypeptide comprising an IgV domain or a specific binding fragment thereof, an IgC domain or a specific binding fragment thereof, or both, wherein the variant PD-L2 polypeptide comprises one or more amino acid modifications at one or more positions in an unmodified PD-L2 or specific binding fragment thereof wherein one position corresponds to position 15 with reference to numbering of positions set forth in SEQ ID NO: 31.

---

2-36. claims: 1-94(partially)

As invention 1, but wherein the at least one amino acid modification is at position 89, 82, 67, 2, 12, 13, 18, 23, 24, 28, 31, 32, 33, 36, 37, 39, 44, 45, 46, 47, 48, 58, 59, 65, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 85, 86, or 91, respectively, wherein each position represents one invention.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/022267

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 8445447	B2	21-05-2013	AU 2008293885 A1	05-03-2009
			CA 2693707 A1	05-03-2009
			CN 101784564 A	21-07-2010
			EP 2170946 A2	07-04-2010
			EP 2514762 A2	24-10-2012
			JP 2010533649 A	28-10-2010
			US 2009042292 A1	12-02-2009
			US 2012164168 A1	28-06-2012
			WO 2009029342 A2	05-03-2009
WO 2010027827	A2	11-03-2010	AU 2009288289 A1	11-03-2010
			BR P10917891 A2	24-11-2015
			CA 2735006 A1	11-03-2010
			CN 102203125 A	28-09-2011
			CN 104740610 A	01-07-2015
			EA 201170375 A1	30-03-2012
			EP 2324055 A2	25-05-2011
			EP 2328919 A2	08-06-2011
			EP 2328920 A2	08-06-2011
			EP 2662383 A1	13-11-2013
			IL 211299 A	30-01-2014
			JP 2012500652 A	12-01-2012
			JP 2012500855 A	12-01-2012
			JP 2012510429 A	10-05-2012
			JP 2015129172 A	16-07-2015
			KR 20110074850 A	04-07-2011
			US 2011159023 A1	30-06-2011
			US 2011195068 A1	11-08-2011
			US 2011223188 A1	15-09-2011
			US 2014227262 A1	14-08-2014
			WO 2010027827 A2	11-03-2010
WO 2010027828 A2	11-03-2010			
WO 2010098788 A2	02-09-2010			
ZA 201101119 B	26-10-2011			
WO 2016168771	A2	20-10-2016	CA 2982246 A1	20-10-2016
			CN 107969128 A	27-04-2018
			EP 3283508 A2	21-02-2018
			JP 2018512856 A	24-05-2018
			KR 20180012260 A	05-02-2018
WO 2016168771 A2	20-10-2016			
WO 2018022945	A1	01-02-2018	NONE	
WO 2018022946	A1	01-02-2018	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z 4 C 0 8 7
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	35/768 (2015.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	35/74 (2015.01)	A 6 1 K	48/00	
		A 6 1 K	35/768	
		A 6 1 K	35/12	
		A 6 1 K	35/76	
		A 6 1 K	35/74	

(31)優先権主張番号 62/537,928

(32)優先日 平成29年7月27日(2017.7.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

- 弁理士 佐藤 利光  
 (74)代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (74)代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦  
 (74)代理人 100205707  
 弁理士 小寺 秀紀  
 (74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人  
 (74)代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘  
 (74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥  
 (72)発明者 スワンソン ライアン  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2  
 0 1 スイート 2 3 0  
 (72)発明者 コルナッカー マイケル  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2  
 0 1 スイート 2 3 0  
 (72)発明者 マウラー マーク エフ.  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2  
 0 1 スイート 2 3 0  
 (72)発明者 アルドーレル ダン  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2  
 0 1 スイート 2 3 0  
 (72)発明者 デモンテ ダニエル ウィリアム  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2  
 0 1 スイート 2 3 0  
 (72)発明者 カウベル ヨセフ エル.  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2  
 0 1 スイート 2 3 0

F ターム(参考) 4B064 AG20 BJ12 CA01 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA95X AB01 AC14 BA02 CA24  
CA44

4C076 AA94 BB11 CC01 CC04 CC07 CC10 CC15 CC16 CC18 CC41  
EE59 FF70

4C084 AA13 NA05 NA14 ZA021 ZA022 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA591  
ZA592 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB081  
ZB082 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152

4C085 AA14 AA35 BB01 BB42 EE01 EE05

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC30 BC83 CA04 NA05 NA14 ZA02  
ZA33 ZA36 ZA59 ZA66 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74