

(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2019-522466

(P2019-522466A)

(43) 公表日 令和1年8月15日(2019.8.15)

(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 Z N A	4 B 0 6 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く		

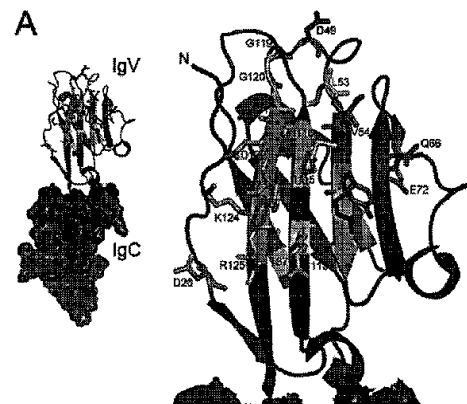
(21) 出願番号	特願2018-560657 (P2018-560657)	(71) 出願人	515314797 アルバート アインシュタイン カレッジ オブ メディシン, インコーポレイティ ド アメリカ合衆国 1 0 4 6 1 ニューヨー ク、ブロンクス、モリス パーク アベニ ュー 1 3 0 0
(86) (22) 出願日	平成29年5月17日 (2017.5.17)	(74) 代理人	100114557 弁理士 河野 英仁
(85) 翻訳文提出日	平成31年1月8日 (2019.1.8)	(74) 代理人	100078868 弁理士 河野 登夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/033042	(72) 発明者	ギャレット・トムソン, サラ, シー. アメリカ合衆国 1 0 0 3 4 ニューヨー ク州, ニューヨーク, シーマン アベニ ュー 1 1 6, アプト. 2 A 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02017/201131		
(87) 国際公開日	平成29年11月23日 (2017.11.23)		
(31) 優先権主張番号	62/338, 128		
(32) 優先日	平成28年5月18日 (2016.5.18)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 変異PD-L1ポリペプチド、T細胞調節多量体ポリペプチド、及びそれらの使用方法

(57) 【要約】

本開示は、変異PD-L1免疫調節ポリペプチド及び変異免疫調節ペプチドを含む融合ポリペプチドを提供する。本開示は、T細胞調節多量体ポリペプチド及びこれを含む組成物を提供し、T細胞調節多量体ポリペプチドは、本開示の変異免疫調節ポリペプチドを含む。本開示は、T細胞調節多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸及びこの核酸を含む宿主細胞を提供する。本開示は、T細胞の活性を調節する方法を提供し、この方法は、T細胞を本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドと接触させることを含む。

FIG. 8



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドであって、

前記変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドは、図 2 A に示される P D - L 1 アミノ酸配列、または配列番号 1 に示される P D - L 1 アミノ酸配列と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸置換を有し、

a) 図 3 A または図 3 B に示されるアミノ酸配列を有する P D 1 ポリペプチドに対する、図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性と比較して、前記 P D 1 ポリペプチドに対する結合親和性の低下を示し、及び / もしくは

b) 図 3 C または図 3 D に示されるアミノ酸配列を有する B 7 - 1 ポリペプチドに対する、図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性と比較して、前記 B 7 - 1 ポリペプチドに対する結合親和性の低下を示す、変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドは、図 2 A に示されるアミノ酸の番号付けに基づくアミノ酸 D 2 6、アミノ酸 T 3 7、アミノ酸 V 5 4、アミノ酸 Q 6 6、もしくはアミノ酸 E 7 2 の置換を含むか、または前記ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸の番号付けに基づくアミノ酸 D 2 6、アミノ酸 T 3 7、アミノ酸 I 5 4、アミノ酸 Q 6 6、もしくはアミノ酸 E 7 2 の置換を含む、請求項 1 に記載の変異免疫調節ポリペプチド。

【請求項 3】

前記変異免疫調節ポリペプチドは前記 P D 1 ポリペプチドに対して示す結合親和性が、図 2 A もしくは図 2 B または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドが示す結合親和性の 1 0 % 未満 ~ 7 5 % 未満である、請求項 1 または請求項 2 に記載の変異免疫調節ポリペプチド。

【請求項 4】

前記変異免疫調節ポリペプチドは前記 B 7 - 1 ポリペプチドに対して示す結合親和性が、図 2 A もしくは図 2 B または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドが示す結合親和性の 1 0 % 未満 ~ 7 5 % 未満である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチド。

【請求項 5】

前記変異免疫調節ポリペプチドは前記 P D 1 ポリペプチドに対して示す結合親和性が、図 2 A もしくは図 2 B または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドが示す結合親和性の 7 5 % ~ 9 5 % 超である、請求項 1、請求項 2、または請求項 4 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチド。

【請求項 6】

前記変異免疫調節ポリペプチドは前記 B 7 - 1 ポリペプチドに対して示す結合親和性が、図 2 A もしくは図 2 B または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドが示す結合親和性の 7 5 % ~ 9 5 % 超である、請求項 1 ~ 3 または請求項 5 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチド。

【請求項 7】

a)

i) エピトープ、

i i) 第 1 の主要組織適合抗原複合体 (M H C) ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

b)

i) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び

10

20

30

40

50

i i) 任意選択の免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチドまたは非 I g 骨格を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、を含む多量体ポリペプチドであって、

前記多量体ポリペプチドは、1 つまたは複数の免疫調節ドメインを含み、前記 1 つまたは複数の免疫調節ドメインの少なくとも 1 つが、

A) 前記第 1 のポリペプチドの C 末端、

B) 前記第 2 のポリペプチドの N 末端、

C) 前記第 2 のポリペプチドの C 末端、または

D) 前記第 1 のポリペプチドの C 末端及び前記第 2 のポリペプチドの N 末端

に位置し、

前記免疫調節ドメインは、図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドは、図 2 A に示される P D - L 1 アミノ酸配列、または配列番号 1 に示される P D - L 1 アミノ酸配列と比較して、1 つまたは複数のアミノ酸置換を有し、

前記変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドは、

a) 図 3 A または図 3 B に示されるアミノ酸配列を有する P D 1 ポリペプチドに対する、図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性と比較して、前記 P D 1 ポリペプチドに対する結合親和性の低下を示し、及び / または

b) 図 3 C または図 3 D に示されるアミノ酸配列を有する B 7 - 1 ポリペプチドに対する、図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列の結合親和性と比較して、前記 B 7 - 1 ポリペプチドに対する結合親和性の低下を示す、多量体ポリペプチド。

【請求項 8】

前記多量体ポリペプチドは、図 3 A または図 3 B に示されるアミノ酸配列を有する P D 1 ポリペプチドに対する、図 2 A もしくは図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列を含む免疫調節ドメインを含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される P D - L 1 アミノ酸配列を含む免疫調節ドメインを含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、前記 P D 1 ポリペプチドに対する結合親和性の低下を示す、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 9】

前記多量体ポリペプチドは、

a)

i) 前記エピトープ、

i i) 前記第 1 の M H C ポリペプチド、及び

i i i) 前記免疫調節ドメイン

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

b)

i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i) 前記 I g F c ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、

を含む、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 10】

前記多量体ポリペプチドは、

a)

i) 前記エピトープ、及び

i i) 前記第 1 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

10

20

30

40

50

b)

i) 前記免疫調節ドメイン、

i i i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i) 前記 I g F c ポリペプチド、

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、
を含む、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 1 1】

前記多量体ポリペプチドは、

a)

i) 前記エピトープ、及び

i i) 前記第 1 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

b)

i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド、

i i) 前記 I g F c ポリペプチド、及び

i i i) 前記免疫調節ドメイン

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、
を含む、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 1 2】

前記多量体ポリペプチドは、

a)

i) 前記エピトープ、及び

i i) 前記第 1 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

b)

i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i) 前記免疫調節ドメイン

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、
を含む、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記多量体ポリペプチドは、

a)

i) 前記エピトープ、及び

i i) 前記第 1 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

b)

i) 前記免疫調節ドメイン、及び

i i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、
を含む、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記多量体ポリペプチドは、

a)

i) 前記エピトープ、

i i) 前記第 1 の M H C ポリペプチド、及び

i i i) 前記免疫調節ドメイン

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、

b)

i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、

10

20

30

40

50

を含む、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 15】

前記非 I g 骨格は、X T E N ポリペプチド、トランスフェリンポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド、シルク様ポリペプチド、またはシルク - エラスチン様ポリペプチドである、請求項 7 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 16】

前記第 1 の M H C ポリペプチドは、2 - ミクログロブリンポリペプチドであり、前記第 2 の M H C ポリペプチドは、M H C クラス I 重鎖ポリペプチドである、請求項 7 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 17】

前記 2 - ミクログロブリンポリペプチドは、図 6 に示されるアミノ酸配列のうちの 1 つに対して少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 18】

前記 M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、H L A - A、H L A - B、または H L A - C の重鎖である、請求項 16 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 19】

前記 M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 5 A ~ 5 C のうちの 1 つに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 20】

前記第 1 の M H C ポリペプチドは、M H C クラス I I アルファ鎖ポリペプチドであり、前記第 2 の M H C ポリペプチドは、M H C クラス I I ベータ鎖ポリペプチドである、請求項 7 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 21】

前記エピトープは、T 細胞エピトープである、請求項 7 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 21】

F c ポリペプチドを含み、前記 I g F c ポリペプチドは、I g G 1 F c ポリペプチド、I g G 2 F c ポリペプチド、I g G 3 F c ポリペプチド、I g G 4 F c ポリペプチド、I g A F c ポリペプチド、または I g M F c ポリペプチドである、請求項 7 ~ 11 及び請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 22】

前記 I g F c ポリペプチドは、図 4 A ~ 4 C に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 23】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドとが、非共有結合で結合される、請求項 7 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 24】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドとが、共有結合で連結される、請求項 7 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 25】

前記共有結合は、ジスルフィド結合を介するものである、請求項 24 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 26】

前記第 1 の M H C ポリペプチド、または前記エピトープと前記第 1 の M H C ポリペプチドとの間のリンカーは、アミノ酸置換を含むことで第 1 の C y s 残基を与え、前記第 2 の M H C ポリペプチドは、アミノ酸置換を含むことで第 2 の C y s 残基を与え、前記ジスルフィド結合が、前記第 1 の C y s 残基と前記第 2 の C y s 残基との間に形成される、請求

10

20

30

40

50

項 2 5 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 2 7】

前記エピトープと、前記第 1 の M H C ポリペプチドとの間に挿入された第 1 のリンカーを含む、請求項 7 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 2 8】

前記変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドは、図 2 B に示される P D - L 1 アミノ酸配列のアミノ酸の番号付けに基づく D 2 6、T 3 7、I 5 4、Y 5 6、Q 6 6、E 7 2、I 1 1 5、G 1 1 9、または G 1 2 0 から選択されるアミノ酸の置換を含む、請求項 7 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 2 9】

2 つ以上の変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドを含む、請求項 7 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 3 0】

前記 2 つ以上の免疫調節ポリペプチドは、直列に存在する、請求項 2 9 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 3 1】

前記免疫調節ポリペプチドは、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫調節ポリペプチドである、請求項 7 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 3 2】

前記多量体ポリペプチドは、第 3 のポリペプチドを含み、前記第 3 のポリペプチドは、前記第 1 のポリペプチドまたは前記第 2 のポリペプチドの前記免疫調節ポリペプチドに対して少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫調節ポリペプチドを含む、請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 3 3】

前記第 3 のポリペプチドが、前記第 1 のポリペプチドに共有結合で連結される、請求項 3 2 に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 3 4】

前記第 2 のポリペプチドは、

- i) 前記第 2 の M H C ポリペプチド、
- i i) 前記 I g F c ポリペプチド、及び
- i i i) 親和性タグ

を N 末端から C 末端の順序で含む、請求項 7 ~ 1 3 及び請求項 1 5 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド。

【請求項 3 5】

組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸であって、

- i) 前記組換えポリペプチドは、
 - a) エピトープ、
 - b) 第 1 の主要組織適合抗原複合体 (M H C) ポリペプチド、
 - c) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチドである免疫調節ポリペプチド、
 - d) タンパク分解により切断可能なリンカーもしくはリボソームスキッピングシグナル

、
e) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び
f) 免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチド
を N 末端から C 末端の順序で含むか、または

- i i) 前記組換えポリペプチドは、
 - a) エピトープ、
 - b) 第 1 の M H C ポリペプチド、
 - c) タンパク分解により切断可能なリンカーもしくはリボソームスキッピングシグナル

、

10

20

30

40

50

d) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチドである免疫調節ポリペプチド、

e) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び

f) I g F c ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む、核酸。

【請求項 3 6】

前記第 1 の M H C ポリペプチドは、2 - ミクログロブリンポリペプチドであり、前記第 2 の M H C ポリペプチドは、M H C クラス I 重鎖ポリペプチドである、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 3 7】

前記 2 - ミクログロブリンポリペプチドは、図 6 に示されるアミノ酸配列のうちの 1 つに対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 3 6 に記載の核酸。

【請求項 3 8】

前記 M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、H L A - A、H L A - B、または H L A - C の重鎖である、請求項 3 6 に記載の核酸。

【請求項 3 9】

前記 M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 5 A ~ 5 C のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 3 8 に記載の核酸。

【請求項 4 0】

前記第 1 の M H C ポリペプチドは、M H C クラス I I アルファ鎖ポリペプチドであり、前記第 2 の M H C ポリペプチドは、M H C クラス I I ベータ鎖ポリペプチドである、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 4 1】

前記エピトープは、T 細胞エピトープである、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 4 2】

前記 I g F c ポリペプチドは、I g G 1 F c ポリペプチド、I g G 2 F c ポリペプチド、I g G 3 F c ポリペプチド、I g G 4 F c ポリペプチド、I g A F c ポリペプチド、または I g M F c ポリペプチドである、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 4 3】

前記 I g F c ポリペプチドは、図 4 A ~ 4 C に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 4 2 に記載の核酸。

【請求項 4 4】

前記変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 A に示されるアミノ酸の番号付けに基づくアミノ酸 D 2 6、アミノ酸 T 3 7、アミノ酸 V 5 4、アミノ酸 Q 6 6、もしくはアミノ酸 E 7 2 の置換を含むか、または前記ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸の番号付けに基づくアミノ酸 D 2 6、アミノ酸 T 3 7、アミノ酸 I 5 4、アミノ酸 Q 6 6、もしくはアミノ酸 E 7 2 の置換を含む、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 4 5】

多量体ポリペプチドは、2 つ以上の変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドを含む、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 4 6】

前記タンパク分解により切断可能なリンカーまたはリボソームスキッピングシグナルは、

a) L E V L F Q G P (配列番号 3 4)、

b) E N L Y T Q S (配列番号 3 5)、

c) フェーリン切断部位、

d) L V P R (配列番号 3 7)、

e) G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 8)、

10

20

30

40

50

- f) G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号 39)、
 g) G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 40)、及び
 h) G S G V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 41)
 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 35 に記載の核酸。

【請求項 47】

前記組換えポリペプチドは、

- a) 第 1 のリーダーペプチド、
 b) 前記エピトープ、
 c) 前記第 1 の M H C ポリペプチド、
 d) 前記免疫調節ポリペプチド、

10

e) 前記タンパク分解により切断可能なリンカーまたはリボソームスキッピングシグナル、

- f) 第 2 のリーダーペプチド、
 g) 前記第 2 の M H C ポリペプチド、及び
 h) 前記免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチド
 を N 末端から C 末端の順序で含む、請求項 35 に記載の核酸。

【請求項 48】

前記第 1 のリーダーペプチド及び前記第 2 のリーダーペプチドは、 2 - M リーダーペプチドである、請求項 47 に記載の核酸。

【請求項 49】

20

前記ヌクレオチド配列が、転写制御要素に機能可能なように連結される、請求項 35 に記載の核酸。

【請求項 50】

前記転写制御要素は、真核細胞において機能するプロモーターである、請求項 49 に記載の核酸。

【請求項 51】

前記第 1 の M H C ポリペプチド、または前記エピトープと前記第 1 の M H C ポリペプチドとの間のリンカーは、アミノ酸置換を含むことで第 1 の C y s 残基を与え、前記第 2 の M H C ポリペプチドは、アミノ酸置換を含むことで第 2 の C y s 残基を与え、前記第 1 の C y s 残基及び前記第 2 の C y s 残基は、前記第 1 の M H C ポリペプチドと前記第 2 の M H C ポリペプチドとの間にジスルフィド結合を生成する、請求項 35 に記載の核酸。

30

【請求項 52】

請求項 35 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 53】

前記ベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、請求項 52 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 54】

請求項 52 に記載の組換え発現ベクターで遺伝子改変された、宿主細胞。

【請求項 55】

前記宿主細胞は、インビトロのものである、請求項 54 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 56】

前記宿主細胞が、前記細胞が内在性の M H C 2 - ミクログロブリンポリペプチドを産生しないように遺伝子改変される、請求項 54 に記載の宿主細胞。

【請求項 57】

前記宿主細胞は、T リンパ球である、請求項 54 に記載の宿主細胞。

【請求項 58】

- a)
 i) エピトープ、
 i i) 第 1 の M H C ポリペプチド、及び
 i i i) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチドである免疫調

50

節ドメイン

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸と、

b)

i) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i) I g F c ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸と、

を含む、組成物。

【請求項 59】

10

a)

i) エピトープ、及び

i i) 第 1 の M H C ポリペプチド

を N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸と、

b)

i) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異免疫調節ポリペプチドである免疫調節ドメイン

i i) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i i) I g F c ポリペプチド

20

を N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸と、

を含む、組成物。

【請求項 60】

前記第 1 の核酸及び / または前記第 2 の核酸は、組換え発現ベクターに存在する、請求項 58 または請求項 59 に記載の組成物。

【請求項 61】

請求項 58 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の組成物で遺伝子改変された、宿主細胞。

【請求項 62】

30

請求項 7 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチドの産生方法であって、

a) 請求項 54 ~ 57 及び請求項 61 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞が前記多量体ポリペプチドを合成する条件下での培地における前記宿主細胞のインビトロの培養と、

b) 前記宿主細胞及び / または前記培地からの前記多量体ポリペプチドの単離と、を含む、方法。

【請求項 63】

前記第 2 のポリペプチドは、親和性タグを含み、前記単離は、前記細胞によって産生される前記多量体ポリペプチドと、前記親和性タグに対する結合パートナーと、の接触を含み、前記結合パートナーが固定化されていることによって前記多量体ポリペプチドが固定化される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

40

前記固定化された多量体ポリペプチドの溶出を含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 65】

エピトープ特異的 T 細胞の活性の選択的調節方法であって、

前記エピトープ特異的 T 細胞と、請求項 7 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチドと、の接触を含み、

前記接触は、前記エピトープ特異的 T 細胞の活性を選択的に調節する、方法。

【請求項 66】

前記免疫調節ポリペプチドは、抑制ポリペプチドであり、前記多量体ポリペプチドは、前記エピトープ特異的 T 細胞を抑制する、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

50

前記接触は、インビトロのものである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記接触は、インビボのものである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記接触は、エキソビボのものである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 0】

個体におけるエピトープ特異的 T 細胞の活性の選択的調節方法であって、

個体におけるエピトープ特異的 T 細胞の活性の選択的調節に有効な請求項 7 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチドの、有効量での前記個体への投与を含む、方法。

【請求項 7 1】

前記免疫調節ポリペプチドは、抑制ポリペプチドであり、前記多量体ポリペプチドは、前記エピトープ特異的 T 細胞の活性を抑制する、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記エピトープは、自己エピトープであり、前記投与によって、前記自己エピトープに特異的な T 細胞の活性が選択的に抑制される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記エピトープは、同種移植片に存在するエピトープであり、前記投与によって、前記同種移植片に特異的な T 細胞の活性が選択的に抑制される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

個体における自己免疫障害の治療方法であって、

前記個体における自己エピトープに特異的な T 細胞の活性の選択的抑制に有効な請求項 7 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチドの、有効量での前記個体への投与を含み、それによって前記自己免疫障害が治療される、方法。

【請求項 7 5】

前記自己免疫疾患は、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、または自己免疫性関節炎である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

個体における同種移植片拒絶の抑制方法であって、

前記個体に存在する同種移植片に存在するエピトープに特異的な T 細胞の活性の選択的抑制に有効な請求項 7 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチドの、有効量での前記個体への投与を含み、それによって同種移植片拒絶が抑制される、方法。

【請求項 7 7】

前記同種移植片は、腎臓、肺、皮膚、肝臓、骨、軟骨、または心臓である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記投与は、皮下投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記投与は、静脈内投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記投与は、筋肉内投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記投与は、全身投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記投与は、治療部位から遠い位置への投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記投与は、局所投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記投与は、治療部位または治療部位付近への投与である、請求項 7 0 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 5】

- a) 請求項 7 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の多量体ポリペプチド、及び
- b) 医薬的に許容可能な賦形剤を含む、組成物。

【請求項 8 6】

- a) 請求項 3 5 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の核酸、または請求項 5 2 もしくは請求項 5 3 に記載の組換え発現ベクター、及び
- b) 医薬的に許容可能な賦形剤を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【背景技術】

【0001】

適応免疫応答は、T細胞の表面に存在するT細胞受容体(TCR)と、主要組織適合抗原複合体(MHC: ヒトにおいてはヒト白血球抗原(HLA)複合体とも称される)によって抗原提示細胞(APC)の表面に非共有結合で存在する小さなペプチド抗原との結合を伴う。この結合は、免疫系の標的化機構に相当するものであり、T細胞の調節(活性化または抑制)及びエフェクター機能に必要な分子相互作用である。

【0002】

エピトープ特異的な細胞標的化に続き、APCに見られる共刺激タンパク質と、T細胞の対応する共刺激タンパク質と、の結合を介して標的化T細胞が活性化される。T細胞の特異性及び活性化または抑制を誘導するためには、エピトープ/TCR結合と、APCの共刺激タンパク質とT細胞の共刺激タンパク質との結合との両方のシグナルが必要である。TCRは所与のエピトープに特異的であるが、共刺激タンパク質はエピトープ特異的ではなく、代わりに、すべてのT細胞または大きなT細胞サブセットに一般に発現する。

20

【発明の概要】

【0003】

本開示は、変異PD-L1免疫調節ポリペプチド、及び変異免疫調節ペプチドを含む融合ポリペプチドを提供する。本開示は、T細胞調節多量体ポリペプチド、及びT細胞調節多量体ポリペプチドを含む組成物を提供し、T細胞調節多量体ポリペプチドは、本開示の変異免疫調節ポリペプチドを含む。本開示は、T細胞調節多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び核酸を含む宿主細胞を提供する。本開示は、T細胞の活性の調節方法を提供し、方法は、T細胞と、本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドとの接触を含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドのさまざまな実施形態を模式的に示す。こうした実施形態では、別々のポリペプチドに存在するMHC(例えば、HLA)ポリペプチドの間にジスルフィド結合が形成される。

【図2-1】野生型マウスPD-L1ポリペプチドのアミノ酸配列(A)、及び、野生型ヒトPD-L1ポリペプチドのアミノ酸配列(B)を示す。

40

【図2-2】マウス及びヒトのPD-L1アミノ酸配列の配列アライメント(C)を示す。

【図2-3】変異PD-L1ポリペプチドの例(D~G)を示す。

【図2-4】変異PD-L1ポリペプチドの例(H~K)を示す。

【図2-5】変異PD-L1ポリペプチドの例(L~M)を示す。

【図3-1】マウスPD-1のアミノ酸配列(A)、及び、ヒトPD-1のアミノ酸配列(B)を示す。

【図3-2】マウスB7-1のアミノ酸配列(C)、及び、ヒトB7-1のアミノ酸配列(D)を示す。

【図4-1】免疫グロブリンFcポリペプチドのアミノ酸配列(A)を示す。

50

【図4-2】免疫グロブリンFcポリペプチドのアミノ酸配列(B)を示す。

【図4-3】免疫グロブリンFcポリペプチドのアミノ酸配列(C)を示す。

【図5-1】ヒト白血球抗原(HLA)クラスI重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列(A及びB)を示す。シグナル配列には下線が引かれている。

【図5-2】ヒト白血球抗原(HLA)クラスI重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列(C)を示す。シグナル配列には下線が引かれている。

【図6】Homo sapiens (NP_004039.1:配列番号3)、Pan troglodytes (NP_001009066.1:配列番号4)、Macaca mulatta (NP_001040602.1:配列番号5)、Bos taurus (NP_776318.1:配列番号6)、及びMus musculus (NP_033865.2:配列番号7)に由来するベータ-2ミクログロブリン(2M)前駆体(すなわち、リーダー配列を含む)の複数のアミノ酸配列のアライメントを示す。アミノ酸1~20は、シグナルペプチドである。

【図7】FACSによるハイスループットなマイクロビーズ結合アッセイを使用したPD-L1変異体のスクリーニング(A及びB)、ならびに、PD-L1変異体についてのFACSによるマイクロビーズ結合のデータ(C)を示す。

【図8】PD-1またはB7-1に対する結合を改変したPD-L1変異体の特徴付けを示す。

【図9】PD-L1に対する結合についてPD-1がB7-1と競合することを示す。

【図10】表1を示す。

【図11】表2を示す。

【図12】病原性のエピトープ特異的CD8⁺T細胞に対するPD-L1/synTacのインビボの作用を示す。

【発明を実施するための形態】

【0005】

定義

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、本明細書で互換的に使用され、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかであり、長さが任意の重合形態のヌクレオチドを指す。したがって、この用語は、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、または多鎖のDNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNAとRNAとのハイブリッド、あるいはプリン塩基及びピリミジン塩基を含むポリマー、あるいは他の天然のヌクレオチド塩基、化学的もしくは生化学的に改変されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーを含む。

【0006】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、化学的または生化学的に改変または誘導体化されたアミノ酸であるコードアミノ酸及び非コードアミノ酸を含み得、長さが任意の重合形態のアミノ酸と、改変されたペプチド骨格を有するポリペプチドとを指す。

【0007】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対してある一定パーセントの「配列同一性」を有し、このことは、アライメントがとられ、2つの配列が比較されると、その割合の塩基またはアミノ酸が同一であり、同一の相対位置に存在することを意味する。配列同一性は、多くの異なる方法において決定することができる。配列同一性を決定するために、さまざまな簡便な方法及びコンピュータープログラム(例えば、BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFTなど)を使用して配列のアライメントをとることができ、こうした方法及びコンピュータープログラムは、ncbi.nlm.nih.gov/BLAST、ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/、ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/、mafft.cbrc.jp/alignment/software/を含む、いくつかのサイトでワールドワイドウェブを通じて利用可能である。例えば、Alts

10

20

30

40

50

chul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-10を参照のこと。

【0008】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、同様の側鎖を有するアミノ酸残基の、タンパク質における互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の一群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンからなり、脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の一群は、セリン及びスレオニンからなり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の一群は、アスパラギン及びグルタミンからなり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の一群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンからなり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の一群は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンからなり、酸性側鎖を有するアミノ酸の一群は、グルタミン酸及びアスパラギン酸からなり、含硫側鎖を有するアミノ酸の一群は、システイン及びメチオニンからなる。保存的なアミノ酸置換群の例は、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-グリシン、及びアスパラギン-グルタミンである。

【0009】

(例えば、T細胞に存在するポリペプチド(例えば、T細胞受容体)に対する本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドの結合に関して)本明細書で使用される「結合」は、介在する非共有結合的な相互作用を指す。結合相互作用は、解離定数(K_D)が 10^{-3} M未満であることによって一般に特徴付けられる。好ましい K_D 値は、 10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、 10^{-12} M未満、 10^{-13} M未満、 10^{-14} M未満、または 10^{-15} M未満である。「親和性」は、結合強度を指し、結合親和性の上昇は、 K_D の低下と相関する。

【0010】

本明細書で使用される「免疫学的シナプス」または「免疫シナプス」という用語は、一般に、適応免疫応答において相互作用する2つの免疫細胞の間の天然の界面を指し、こうした界面には、例えば、抗原提示細胞(APC)または標的細胞と、エフェクター細胞(例えば、リンパ球、エフェクターT細胞、ナチュラルキラー細胞、及び同様のものなど)との間の界面が含まれる。APCとT細胞との間の免疫学的シナプスは、一般に、T細胞抗原受容体と主要組織適合抗原複合体分子との相互作用によって開始される。このことについては、例えば、Bromley et al., Annu Rev Immunol. 2001; 19: 375-96に記載されており、当該文献の開示内容は、その全体が参照によって本明細書に援用される。

【0011】

「T細胞」は、ヘルパーT細胞($CD4^+$ 細胞)、細胞傷害性T細胞($CD8^+$ 細胞)、制御性T細胞(Treg)、及びNK-T細胞を含む、CD3を発現するすべての型の免疫細胞を含む。

【0012】

本明細書で使用される「共刺激ポリペプチド」という用語は、T細胞に存在する同種の共刺激ポリペプチドに特異的に結合することによって、一次シグナル(例えば、TCR/CD3複合体と、ペプチドが負荷された主要組織適合抗原複合体(MHC)ポリペプチドと、の結合によって生じる)に加えて、T細胞応答(限定はされないが、増殖、活性化、分化、及び同様のものを含む)を媒介するシグナルを生じさせる、抗原提示細胞(APC)(例えば、樹状細胞、B細胞、及び同様のもの)に存在するポリペプチドを含む。

【0013】

本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドの「調節ドメイン」は、共刺激ポリペプチドを含む。

【0014】

本明細書で使用される「異種」は、それぞれ天然の核酸またはタンパク質に見られないヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

【0015】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「組換え」は、特定の核酸（DNAまたはRNA）が、天然系に見られる内在性核酸とは区別可能な構造的なコード配列または非コード配列を有するコンストラクトが生じるクローニング段階、制限段階、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）段階及び／またはライゲーション段階のさまざまな組み合わせの産物であることを意味する。ポリペプチドをコードするDNA配列は、cDNA断片から構築するか、または細胞もしくは細胞を含まない転写及び翻訳系に含められる組換え転写単位からの発現が可能な合成核酸を生成するための一連の合成オリゴヌクレオチドから構築することができる。

【0016】

「組換え発現ベクター」または「DNAコンストラクト」という用語は、ベクター及び1つの挿入断片を含むDNA分子を指すために本明細書で互換的に使用される。組換え発現ベクターは、通常、挿入断片（複数可）の発現及び／または増幅、あるいは他の組換えヌクレオチド配列の構築を目的として生成される。挿入断片（複数可）は、プロモーター配列に機能可能なように連結されてもされなくてもよく、DNA制御配列に機能可能なように連結されてもされなくてもよい。

【0017】

例えば、組換え発現ベクターなどの外来性DNAが細胞の内部に導入されているとき、そのようなDNAによって細胞は「遺伝子改変」または「形質転換」または「遺伝子導入」されている。外来性DNAが存在すると、持続性または一過性の遺伝子変化が生じる。形質転換DNAは、細胞のゲノムへの組み込み（共有結合での連結）が生じることも生じないこともあり得る。原核生物、酵母、及び哺乳類細胞では、例えば、形質転換DNAは、プラスミドなどのエピソード要素で維持され得る。真核細胞に関しては、安定的に形質転換された細胞は、形質転換DNAが染色体に組み込まれており、その結果、染色体の複製を介して形質転換DNAが娘細胞によって受け継がれる細胞である。

【0018】

本明細書で使用される「宿主細胞」は、インビボもしくはインビトロの真核細胞、または単細胞実体として培養される多細胞生物由来の細胞（例えば、細胞株）を指し、当該真核細胞は、核酸（例えば、本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター）のレシピエントとして使用することができるか、または使用されたことがあるものであり、その核酸によって遺伝子改変された元の細胞の子孫を含む。単細胞の子孫は、天然、偶発的、または計画的な変異が生じるため、形態またはゲノムDNA相補鎖もしくは全DNA相補鎖が、元の親と必ずしも完全に同一ではあり得ないと理解される。「組換え宿主細胞」（「遺伝子改変宿主細胞」とも称される）は、例えば、発現ベクターなどの異種核酸が導入された宿主細胞である。例えば、遺伝子改変された真核生物宿主細胞が遺伝子改変されている所以は、例えば、真核生物宿主細胞にとって異質な外来性核酸、または真核生物宿主細胞に通常は見られない組換え核酸などの異種核酸が適切な真核生物宿主細胞に導入されているということにある。

【0019】

「treatment（治療）」、「treating（治療）」という用語、及び同様のものは、一般に、所望の薬理的及び／または生理的作用の発現を意味するために本明細書で使用される。作用は、疾患もしくはその症状を完全もしくは部分的に予防するという点で予防的であり得、及び／または疾患及び／または疾患に起因し得る有害作用を部分的もしくは完全に治すという点で治療的であり得る。本明細書で使用される「Treatment（治療）」は、動物における疾患または症状の任意の治療を包含すると共に、（a）疾患もしくは症状に罹りやすくあり得るが、それを有するとはまだ診断されていない対象における疾患もしくは症状の発症予防、（b）疾患もしくは症状の抑制、すなわち、その発症の抑止、または（c）疾患の軽減、すなわち、疾患の退縮誘起を含む。治療薬剤は、疾患または損傷の発生の前、間、または後に投与してよい。進行中の疾患の治療は、特に対象となるものであり、こうした治療では、治療は、患者の望ましくない臨床症状を安定化または低減するものである。そのような治療は、患部組織における機能が完全に失われる前に実施されることが望ましい。対象の治療は、望ましくは、疾患の兆候段階の間、

10

20

30

40

50

及び場合によっては、疾患の兆候段階の後に投与されることになる。

【 0 0 2 0 】

「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用され、診断、治療、または療法が望まれる任意の哺乳類対象を指す。哺乳類には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、ラット、マウス）、ウサギ類（例えば、ウサギ）、有蹄動物（例えば、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギ、及び同様のもの）などが含まれる。

【 0 0 2 1 】

本発明の追加説明の前に、本発明は、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、実施形態は当然異なり得ると理解されることになる。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態の説明のみを目的としており、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることになるため、本明細書で使用される専門用語による限定は意図されないと理解されることになる。

10

【 0 0 2 2 】

値の範囲が与えられる場合、文脈上明確に示されない限り、その範囲の上限値と下限値との間に存在する、下限値の10分の1の単位までの各介在値と、その記載範囲の任意の他の記載値または介在値とが本発明に包含されると理解される。こうしたより小さな範囲の上限値及び下限値は、そのより小さな範囲に独立して含まれ得るものであり、こうした上限値及び下限値もまた、本発明に包含され、記載範囲において具体的に除外される任意の限界値の対象になる。記載範囲が限界値の一方または両方を含む場合、そうした含まれる限界値のどちらか一方または両方を除外した範囲もまた、本発明に含まれる。

20

【 0 0 2 3 】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される専門用語及び科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同一の意味を有する。本発明の実施または試験においては、本明細書に記載のものと同様または同等の任意の方法及び材料を使用することもできるが、ここでは、好ましい方法及び材料が記載される。本明細書で言及される刊行物はすべて、刊行物が関連付けて引用される方法及び/または材料を開示及び説明するために、参照によって本明細書に援用される。

【 0 0 2 4 】

文脈上明確に示されない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される「a」、「an」、及び「the」という単数形は、複数の参照対象を含むことに留意されなくてはならない。したがって、例えば、「PD-L1変異体」に対する参照は、複数のそのような変異体を含み、「HLAポリペプチド」に対する参照は、1つまたは複数のHLAポリペプチド、及び当業者に知られるその同等形態に対する参照を含むなどである。特許請求の範囲は、任意選択の要素はいずれも除外して起草され得ることにさらに留意されたい。したがって、この記載は、請求要素の記載と関連する「単に」、「のみ」、及び同様のものなどの排他的用語の使用、または「負の」限定の使用のための先行的根拠として働くことが意図される。

30

【 0 0 2 5 】

本発明のある特定の特徴は、明確化するために別々の実施形態と関連して記載されるが、単一の実施形態において組み合わせ提供してもよいと理解される。逆に、本発明のさまざまな特徴は、簡略化するために単一の実施形態と関連して記載されるが、別々に提供するか、または任意の適切な部分的組み合わせにおいて提供してもよい。本発明に関する実施形態の組み合わせはすべて、本発明によって明確に包含され、それぞれ及びあらゆる組み合わせが個別かつ明示的に開示される場合と同様に本明細書に開示される。さらに、さまざまな実施形態及びそれらの要素の部分的組み合わせもすべて、本発明によって明確に包含され、それぞれ及びあらゆるそのような部分的組み合わせが個別かつ明示的に本明細書に開示される場合と同様に本明細書に開示される。

40

【 0 0 2 6 】

本明細書で議論される刊行物は、単に、本出願の出願日より前にその開示内容が提供さ

50

れているにすぎない。先行発明であるという理由によって本発明がそのような刊行物に先行する権利を有さないことを承認するものとして本明細書の記載が解釈されることには全くなならない。さらに、提供される刊行物の日付は実際の刊行日とは異なり得るものであり、実際の刊行日は個別に確認する必要がある。得る。

【0027】

詳細な説明

本開示は、変異免疫調節ポリペプチド、及び変異免疫調節ペプチドを含む融合ポリペプチドを提供する。本開示は、T細胞調節多量体ポリペプチド、及びT細胞調節多量体ポリペプチドを含む組成物を提供し、T細胞調節多量体ポリペプチドは、本開示の変異免疫調節ポリペプチドを含む。本開示は、T細胞調節多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び核酸を含む宿主細胞を提供する。本開示は、T細胞の活性の調節方法を提供し、方法は、T細胞と、本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドとの接触を含む。

10

【0028】

本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドは、「synTacポリペプチド」とも称される。本開示のsynTacポリペプチドは、変異調節ドメインを含み、変異調節ドメインは、免疫調節ポリペプチド（例えば、T細胞に存在する免疫調節ポリペプチド）に対する野生型PD-L1調節ドメインの親和性と比較して、免疫調節ポリペプチド（例えば、PD-1またはB7-1）に対する結合親和性の低下を示す。本開示のsynTacポリペプチドは、標的T細胞の活性を調節（例えば、抑制）することができる。本開示のsynTacポリペプチドは、標的細胞の特異性を増進させる。

20

【0029】

変異免疫調節ポリペプチド

本開示は、変異PD-L1調節ポリペプチドを提供する。ヒトPD-L1の野生型アミノ酸配列は、図2Aに示される。

【0030】

野生型PD-L1は、PD-1及びB7-1に結合する。マウスPD-1のアミノ酸配列は、図3Aに示され、ヒトPD-1のアミノ酸配列は、図3Bに示される。マウスB7-1のアミノ酸配列は、図3Cに示され、ヒトB7-1のアミノ酸配列は、図3Dに示される。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でPD-1に結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、B7-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でB7-1に結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1に対する野生型PD-L1の結合親和性と実質的に同一の親和性でPD-1に結合し、B7-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でB7-1に結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でPD-1に結合し、B7-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でB7-1に結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1に対する野生型PD-L1の結合親和性と実質的に同一の親和性でB7-1に結合する。

30

40

【0031】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する図2Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD-1に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチドに対する図2Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性でPD-1に結合する。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する

50

図 2 A に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で PD - 1 に結合する。

【 0 0 3 2 】

場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、PD - 1（例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチド）に対する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD - 1 に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチドに対する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性で PD - 1 に結合する。例えば、場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、PD - 1（例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチド）に対する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で PD - 1 に結合する。

【 0 0 3 3 】

場合によっては、野生型マウス PD - L 1 外部ドメインは、下記のアミノ酸配列を含む。

```
FT  ITAPKDL YVV  EYGSNVTMEC  RFPVERELDL  LALV
VYWEKE  DEQVIQFVAG  EEDLKPKQHSN  FRGRASLPKD
QL LKGNAALQ  ITDVKLQDAG  VYCCIIISYGG  ADYKRIT
LKV  NAPYRKINQR  ISVDPATSEH  ELICQAEGYP  EAE
VIWTNSD  HQPVS GKR SV  TTSRTEGMLL  NVTSSLRVNA
TANDVFYCTF  WRSQPGQNHT  AELIIPELPA  THPPQNR
R（配列番号 1）。
```

【 0 0 3 4 】

場合によっては、野生型ヒト PD - L 1 外部ドメインは、下記のアミノ酸配列を含む。

```
FT  VTVPKDL YVV  EYGSNMTIEC  KFPVEKQLDL  AALI
VYWEME  DKNIIQFVHG  EEDLKVKQHSS  YRQRARLLKD
QLSLGNAALQ  ITDVKLQDAG  VYRCMISYGG  ADYKRIT
VKV  NAPYNKINQR  ILVVD PVTSE  HELTCQAEGY  PKA
EVIWTSS  DHQVLSGKTT  TTNSKREEKL  FNV TSTLRIN
TTTNEIFYCT  FRRLDPEENH  TAE LVIPGNI  LNV SIK
I（配列番号 2）。
```

【 0 0 3 5 】

場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、PD - 1（例えば、図 3 A に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチド）に対する配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD - 1 に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 3 A に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチドに対する配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性で PD - 1 に結合する。例えば、場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチ

ドは、PD-1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でPD-1に結合する。

【0036】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD-1に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチドに対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性でPD-1に結合する。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でPD-1に結合する。

【0037】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、上記のように、PD-1に対する結合親和性の低下を示し、野生型B7-1ポリペプチドに対する野生型PD-L1ポリペプチドの結合親和性の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%を保持する。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD-1に対する結合親和性の低下を示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）の結合親和性の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%を保持する。

【0038】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD-1ポリペプチドに対する結合親和性の約40%～約60%の低下を示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）の結合親和性の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%を保持する。

【0039】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD-1ポリペプチ

ドに対する結合親和性の約40%～約60%の低下を示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Cに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）の結合親和性の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%を保持する。

【0040】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、1nM～1mMのPD-1に対する結合親和性を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、100nM～100μMのPD-1に対する結合親和性を有する。別の例として、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、約100nM～150nM、約150nM～約200nM、約200nM～約250nM、約250nM～約300nM、約300nM～約350nM、約350nM～約400nM、約400nM～約500nM、約500nM～約600nM、約600nM～約700nM、約700nM～約800nM、約800nM～約900nM、約900nM～約1μM、約1μM～約5μM、約5μM～約10μM、約10μM～約15μM、約15μM～約20μM、約20μM～約25μM、約25μM～約50μM、約50μM～約75μM、または約75μM～約100μMのPD1（例えば、図3に示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。

【0041】

本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して単一のアミノ酸置換を有し得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して2～10のアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して2つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して3つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して4つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して5つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して6つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して7つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して8つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）と比較して9つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1

10

20

30

40

50

もしくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチド)と比較して 10 個のアミノ酸置換を有する。

【0042】

本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、200 ~ 240 のアミノ酸長を有し得る。例えば、場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、200 ~ 220 のアミノ酸長、または 220 ~ 240 のアミノ酸長を有する。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、200 ~ 219 のアミノ酸長を有する。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、219 のアミノ酸長を有する。

【0043】

D 26 の置換

場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 26 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、または Glu である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ala、Gly、Val、Leu、または Ile である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ala、Gly、Val、Leu、Ile、または Arg である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ala である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Gly である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Val である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Leu である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ile である。場合によっては、本開示の変異 PD - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Arg である。場合によっては、変異 PD - L 1 ポリペプチドは、PD - 1 (例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチド)に対する図 2 B (または配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD - 1 ポリペプチドに対する結合親和性の約 40 % ~ 約 60 % の低下を示し、野生型 B7 - 1 ポリペプチド (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B7 - 1 ポリペプチド) に対する野生型 PD - L 1 ポリペプチド (例えば、図 2 B または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む PD - L 1 ポリペプチド) の結合親和性の少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % を保持する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、D26のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、D8のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、アスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Ala、Gly、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Ala、Gly、Val、Leu、Ile、またはArgである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにValである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにIleである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにArgである。

10

20

【 0 0 4 5 】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、D8のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、アスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにAla、Gly、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにAla、Gly、Val、Leu、Ile、またはArgである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにValである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Ileである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにArgである。

30

40

【 0 0 4 6 】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Dに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Eに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Fに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチ

50

ドは、図 2 G に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 7 】

T 3 7 の置換

場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、スレオニン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 3 7 は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、または G l u である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、
10 少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、A r g、L y s、または H i s である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、A r g、L y s、または H i s である。場合によっては、
20 本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、G l y、A l a、V a l、L e u、または I l e である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、L y s である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、
30 少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、H i s である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、G l y である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1
40 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、A l a である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、V a l である。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、
50 少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 3 7 は、I l e である。場合によっては、変異 P D - L 1 ポリペプチドは、P D - 1 (例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む P D - 1 ポリペプチド)に対して図 2 B (または配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドが示す結合親和性の約 1 5 % ~ 約 3 5 % の結合親和性を P D - 1 ポリペプチドに対して示し、野生型 B 7 - 1 ポリペプチド (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチド)に対する野生型 P D - L 1 ポリペプチド (例えば、図 3 B または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチド)の

結合親和性と比較して、B 7 - 1 に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B 7 - 1 に対する結合親和性の約 70 % ~ 約 90 % の低下を示す）。

【0048】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、T 37 のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、T 19 のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにGly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにGly、Ala、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにArgである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにHisである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにValである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにIleである。

【0049】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、T 19 のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸19は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにGly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにGly、Ala、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにArgである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにHisである。場合に

10

20

30

40

50

よっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにValである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸19は、Thrの代わりにIleである。

【0050】

I54の置換

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ala、Gly、Leu、Glu、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、GluまたはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Alaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Glyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Leuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Aspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluである。場合によっては、変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対して図2B（または配列番号2）に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドが示す結合親和性の約70%～約100%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図3Bまたは配列番号2に

10

20

30

40

50

示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド)の結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す(例えば、B7-1に対する結合親和性の約40%~約90%の低下を示す)。

【0051】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、バリン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ala、Gly、Leu、Glu、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、GluまたはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Alaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Glyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Leuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Aspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluである。場合によっては、変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1(例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド)に対して図2A(または配列番号1)に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドが示す結合親和性の約70%~約100%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド(例えば、図3Cに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド)に対する野生型PD-L1ポリペプチド(例えば、図2Aまたは配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド)の結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す(例えば、B7-1に対する結合親和性の約40%~約90%の低下を示す)。

【0052】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、I54のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、I36のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにAla、Gly、Leu、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにAspである。

10

【0053】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、V54のアミノ酸置換を有する図2Aに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、V36のアミノ酸置換を有する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、バリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにAla、Gly、Leu、Glu、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにGluまたはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Valの代わりにGluである。

20

30

40

【0054】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、Ile-36のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、イソロイシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、

50

Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにAla、Gly、Leu、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにAspである。

10

20

30

40

50

【0055】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、V36のアミノ酸置換を有する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、バリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにAla、Gly、Leu、Glu、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにGluまたはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Valの代わりにGluである。

【0056】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Hに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Iに示されるアミノ酸配列を含む。

【0057】

Q66の置換

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、グルタミン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸66は、Gly、Ala、Val、Leu、

I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、L y s、A r g、H i s、A s p、またはG l uである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l uまたはA s pである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l uである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、A s pである。場合によっては、変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対して図2B（または配列番号2）に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドが示す結合親和性の約80%～約100%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図3Bまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）の結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B7-1に対する結合親和性の約40%～約90%の低下を示す）。

10

20

【0058】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、Q66のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、Q48のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、グルタミン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸66は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、L y s、A r g、H i s、A s p、またはG l uであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l nの代わりにA l a、G l y、L e u、G l u、またはA s pである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l nの代わりにA l aである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l nの代わりにL e uである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l nの代わりにG l yである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l nの代わりにA s pである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、G l nの代わりにG l uである。

30

40

【0059】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、Q48のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、グルタミン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸48は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、L y s、A r g、H i s、A s p、またはG l uであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、G l nの代わりにA l a、G l y、L e u、G l u、またはA s pである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示さ

50

れるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、Glnの代わりにGluまたはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、Glnの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、Glnの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、Glnの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、Glnの代わりにAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸48は、Glnの代わりにGluである。

10

【0060】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Jに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Kに示されるアミノ酸配列を含む。

【0061】

E72の置換

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、グルタミン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸72は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはAspである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Arg、Lys、またはHisである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Asp、Arg、Lys、またはHisである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Argである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Lysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Hisである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Aspである。場合によっては、変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対して図2B（または配列番号2）に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドが示す結合親和性の約30%～約60%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図3Bまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）の結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B7-1に対する結合親和性の約40%～約90%の低下を示す）。

20

30

40

【0062】

50

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、E72のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、E54のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、グルタミン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸72は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはAspであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Gluの代わりにAsp、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Gluの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Gluの代わりにArgである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Gluの代わりにLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Gluの代わりにHisである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸72は、Gluの代わりにAspである。

10

20

【0063】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、E54のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、グルタミン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはAspであり得る。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluの代わりにAsp、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluの代わりにArgである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluの代わりにLysである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluの代わりにHisである。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluの代わりにAspである。

30

【0064】

場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Lに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドは、図2Mに示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0065】

融合ポリペプチド

本開示は、PD-L1融合ポリペプチドを提供する。本開示の融合ポリペプチドは、a) 本開示の変異PD-L1ポリペプチド、及びb) 異種融合パートナーを含む。場合によっては、異種融合パートナーは、変異PD-L1ポリペプチドのN末端に融合している。場合によっては、異種融合パートナーは、変異PD-L1ポリペプチドのC末端に融合している。場合によっては、本開示のPD-L1融合ポリペプチドは、変異PD-L1ポリペプチドのN末端に融合している第1の異種融合パートナー及び変異PD-L1ポリペ

50

チドのC末端に融合している第2の異種融合パートナーを含む。

【0066】

本開示のPD-L1融合ポリペプチドの全長は、245アミノ酸～2000アミノ酸の範囲にわたり得る。例えば、本開示のPD-L1融合ポリペプチドは、245アミノ酸～250アミノ酸、250アミノ酸～275アミノ酸、275アミノ酸～300アミノ酸、300アミノ酸～350アミノ酸、350アミノ酸～、350アミノ酸～400アミノ酸、400アミノ酸～、400アミノ酸～450アミノ酸、450アミノ酸～500アミノ酸、500アミノ酸～600アミノ酸、600アミノ酸～700アミノ酸、700アミノ酸～800アミノ酸、800アミノ酸～900アミノ酸、900アミノ酸～1000アミノ酸、1000アミノ酸～1250アミノ酸、1250アミノ酸～1500アミノ酸、1500アミノ酸～1750アミノ酸、または1750アミノ酸～2000アミノ酸の範囲にわたり得る。

10

【0067】

適切な融合パートナーとしては、限定されないが、膜貫通型ドメイン、免疫グロブリンFc領域（例えば、IgGのFc領域）、抗体の抗原結合領域、サイトカイン、免疫調節ドメイン、細胞内シグナリングドメインなどが挙げられる。

【0068】

T細胞調節多量体ポリペプチド

本開示は、多量体（例えば、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体）ポリペプチドを提供する。多量体ポリペプチドはT細胞調節ポリペプチドであり、本明細書では、「T細胞調節多量体ポリペプチド」または「synTac」（「T細胞活性化のための免疫学的シナプス」）とも称される。図1A～1Dは、本開示のさまざまなT細胞調節多量体ポリペプチドの概略図を示す。本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドは、「synTacポリペプチド」または「多量体ポリペプチド」とも称される。本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドがPD-L1免疫調節ポリペプチド（例えば、本開示の変異PD-L1免疫調節ポリペプチド）を含む場合、そのようなT細胞調節多量体ポリペプチドは、本明細書で「PD-L1/synTac」とも称される。

20

【0069】

場合によっては、本開示のsynTacポリペプチドは、本開示の変異PD-L1免疫調節ポリペプチドを含む。場合によっては、本開示のsynTacポリペプチドは、図10または図11に示されるうちの1つのアミノ酸置換を含む変異PD-L1免疫調節ポリペプチドを含む。したがって、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のD26の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のD8の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のT37の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のT19の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のD49の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のD31の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のL53の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のL35の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のI54（マウスPD-L1ではV54）の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のI36の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のY56の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のY38の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のY56の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配列のY38の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列のQ66の置換、または配列番号2に示されるアミノ酸配

30

40

50

列の Q 4 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Q 6 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の Q 4 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の E 7 2 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の E 5 4 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の M 1 1 5 (マウス P D - L 1 の I 1 1 5) の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の M 9 7 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の I 1 1 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の I 9 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の G 1 1 9 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の G 1 0 1 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の G 1 2 0 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の G 1 0 2 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の G 1 2 0 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の G 1 0 2 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の A 1 2 1 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の A 1 0 3 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の D 1 2 2 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の D 1 0 4 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Y 1 2 3 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の Y 1 0 5 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の K 1 2 4 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の K 1 0 6 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の R 1 2 5 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の K 1 0 7 の置換を含む。

10

20

30

【 0 0 7 0 】

上記のように、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、P D 1 に対する野生型 P D - L 1 の結合親和性と比較して、P D 1 に対する結合親和性の低下を示す。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドもまた、野生型 P D - L 1 (例えば、図 2 A もしくは図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチド、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチド) を含む対照多量体ポリペプチドと比較して、P D 1 に対する結合親和性の低下を示す。

【 0 0 7 1 】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、B 7 - 1 に対する野生型 P D - L 1 の結合親和性と比較して低い親和性で B 7 - 1 に結合する。場合によっては、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドもまた、野生型 P D - L 1 (例えば、図 2 A もしくは図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチド、または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチド) を含む対照多量体ポリペプチドと比較して、B 7 - 1 に対する結合親和性の低下を示す。

40

【 0 0 7 2 】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、P D - 1 に対する野生型 P D - L 1 の結合親和性と実質的に同一の親和性で P D - 1 に結合し、B 7 - 1 に対する野生型 P D - L 1 の結合と比較して低い親和性で B 7 - 1 に

50

結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドもまた、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと実質的に同一の親和性をPD-1に対して示し、また同様に、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと比較して、B7-1に対して低い結合親和性でB7-1に結合する。

【0073】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でPD-1に結合し、B7-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でB7-1に結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドもまた、野生型PD-L1（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示し、また同様に、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと比較して、B7-1に対して低い結合親和性でB7-1に結合する。

【0074】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、PD-1に対する野生型PD-L1の結合と比較して低い親和性でPD-1に結合し、B7-1に対する野生型PD-L1の結合親和性と実質的に同一の親和性でB7-1に結合する。場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドもまた、野生型PD-L1（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示し、また同様に、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと実質的に同一の親和性をB7-1に対して示す。

【0075】

場合によっては、本開示のsynTacポリペプチドは、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照synTacポリペプチドのPD-1に対する結合親和性と比較して、PD-1に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示のsynTacポリペプチドは、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチドに対する図2Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照synTacポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性でPD-1に結合する。例えば、場合によっては、本開示のsynTacポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対する図2Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照synTacポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90

10

20

30

40

50

%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でPD1に結合する。別の例として、場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチドに対する図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性でPD1に結合する。例えば、場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、PD1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でPD1に結合する。

10

【0076】

場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドのPD1に対する結合親和性と比較して、PD1に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチドに対する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性でPD1に結合する。例えば、場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、PD1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でPD1に結合する。

20

【0077】

場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドのPD1に対する結合親和性と比較して、PD1に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチドに対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性でPD1に結合する。例えば、場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、PD1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でPD1に結合する。

30

40

【0078】

場合によっては、本開示のsyntacポリペプチドは、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照syntacポリペプチドのB7-1に対する結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示のsyntacポリ

50

ペプチドは、図 3 C に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチドに対する図 2 A に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。例えば、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、B 7 - 1 (例えば、図 3 C に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチド)に対する図 2 A に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。別の例として、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む P D 1 ポリペプチドに対する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。例えば、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、B 7 - 1 (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチド)に対する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。

【 0 0 7 9 】

場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの B 7 - 1 に対する結合親和性と比較して、B 7 - 1 に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、図 3 C に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチドに対する配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。例えば、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、B 7 - 1 (例えば、図 3 C に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチド)に対する配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。

【 0 0 8 0 】

場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの B 7 - 1 に対する結合親和性と比較して、B 7 - 1 に対する結合親和性の低下を示す。例えば、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチドに対する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して低い結合親和性で B 7 - 1 に結合する。例えば、場合によっては、本開示の s y n T a c ポリペプチドは、B 7 - 1 (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチド)に対する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照 s y n T a c ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少

なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性でB7-1に結合する。

【0081】

上記のように、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと実質的に同一の親和性をB7-1（例えば、図3Cまたは図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対して示す。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドの親和性の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の親和性をB7-1（例えば、図3Cまたは図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対して示す。

10

【0082】

上記のように、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドと実質的に同一の親和性をPD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対して示す。例えば、場合によっては、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む本開示の多量体ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド、または配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドの親和性の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の親和性をPD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対して示す。

20

30

【0083】

場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、1nM～約1mMの、PD1に対する結合親和性を有する。場合によっては、本開示のsynTacポリペプチドは、100nM～約100μMの、PD1に対する結合親和性を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約100nM～500nMの、PD1に対する結合親和性を有する。例えば、場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約100nM～約150nM、約150nM～約200nM、約200nM～約250nM、約250nM～約300nM、約300nM～約350nM、約350nM～約400nM、約400nM～約450nM、または約450nM～約500nMの、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約500nM～1μMの、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。例えば、場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約500nM～約600nM、約600nM～約700nM、約700nM～約800nM、約800nM～約900nM、または約900nM～約1μMの、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペ

40

50

プチドは、約 $1\ \mu\text{M}$ ~ $10\ \mu\text{M}$ の、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。例えば、場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約 $1\ \mu\text{M}$ ~ $2\ \mu\text{M}$ 、約 $2\ \mu\text{M}$ ~ 約 $3\ \mu\text{M}$ 、約 $3\ \mu\text{M}$ ~ 約 $4\ \mu\text{M}$ 、約 $4\ \mu\text{M}$ ~ 約 $5\ \mu\text{M}$ 、約 $5\ \mu\text{M}$ ~ 約 $6\ \mu\text{M}$ 、約 $6\ \mu\text{M}$ ~ 約 $7\ \mu\text{M}$ 、約 $7\ \mu\text{M}$ ~ 約 $8\ \mu\text{M}$ 、約 $8\ \mu\text{M}$ ~ 約 $9\ \mu\text{M}$ 、または約 $9\ \mu\text{M}$ ~ 約 $10\ \mu\text{M}$ の、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約 $10\ \mu\text{M}$ ~ $100\ \mu\text{M}$ の、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。例えば、場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドは、約 $10\ \mu\text{M}$ ~ 約 $20\ \mu\text{M}$ 、約 $20\ \mu\text{M}$ ~ 約 $30\ \mu\text{M}$ 、約 $30\ \mu\text{M}$ ~ 約 $40\ \mu\text{M}$ 、約 $40\ \mu\text{M}$ ~ 約 $50\ \mu\text{M}$ 、約 $50\ \mu\text{M}$ ~ 約 $60\ \mu\text{M}$ 、約 $60\ \mu\text{M}$ ~ 約 $70\ \mu\text{M}$ 、約 $70\ \mu\text{M}$ ~ 約 $80\ \mu\text{M}$ 、約 $80\ \mu\text{M}$ ~ 約 $90\ \mu\text{M}$ 、または約 $90\ \mu\text{M}$ ~ 約 $100\ \mu\text{M}$ の、PD1（例えば、図3Aまたは図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド）に対する結合親和性を有する。

【0084】

本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、単一のアミノ酸置換を有することができる。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、2 ~ 10個のアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、2つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、3つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、4つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、5つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、6つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、7つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、8つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aもしくは図2Bまたは配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、PD-L1ポリペプチド）に対して、9つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、本開示のSynTacポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドは、野生型 P D - L 1 ポリペプチド（例えば、図 2 A もしくは図 2 B または配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む、P D - L 1 ポリペプチド）に対して、10 個のアミノ酸置換を有する。

【0085】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドを含み、ここでは、第 1 のポリペプチドは、アミノ末端（N 末端）からカルボキシル末端（C 末端）の順に、a）エピトープ（例えば、T 細胞エピトープ）、b）第 1 の主要組織適合抗原複合体（MHC）ポリペプチド、及び c）免疫調節ポリペプチド（例えば、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチド）を含み、第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、a）第 2 の MHC ポリペプチド、及び b）免疫グロブリン（Ig）Fc ポリペプチドを含む。他の場合では、本開示の多量体ポリペプチドは、第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドを含み、ここでは、第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、a）エピトープ（例えば、T 細胞エピトープ）、及び b）第 1 の MHC ポリペプチドを含み、第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、a）免疫調節ポリペプチド（例えば、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチド）、b）第 2 の MHC ポリペプチド、及び c）Ig Fc ポリペプチドを含む。ある場合には、第 1 及び第 2 の MHC ポリペプチドはクラス I MHC ポリペプチドであり、例えば、場合によっては、第 1 の MHC ポリペプチドは MHC クラス I 2 - ミクログロブリン（B2M または 2M）ポリペプチドであり、第 2 の MHC ポリペプチドは MHC クラス I 重鎖（H 鎖）であり、または第 1 の MHC ポリペプチドは MHC クラス I H 鎖であり、第 2 の MHC ポリペプチドは MHC クラス I 2M ポリペプチドである。他の場合では、第 1 及び第 2 の MHC ポリペプチドは、クラス II MHC ポリペプチドであり、例えば、場合によっては、第 1 の MHC ポリペプチドは MHC クラス II - 鎖ポリペプチドであり、第 2 の MHC ポリペプチドは MHC クラス II - 鎖ポリペプチドである。他の場合では、第 1 のポリペプチドは MHC クラス II - 鎖ポリペプチドであり、第 2 の MHC ポリペプチドは MHC クラス II - 鎖ポリペプチドである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、本開示の変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドを 2 つ以上含む。本開示の多量体ポリペプチドが 2 つ以上の免疫調節ポリペプチドを含む場合は、場合によっては、2 つ以上の免疫調節ポリペプチドは同じポリペプチド鎖に存在し、直列状態でもよい。本開示の多量体ポリペプチドが 2 つ以上の免疫調節ポリペプチドを含む場合は、場合によっては、2 つ以上の変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドは、互いに同一のアミノ酸配列を含む。本開示の多量体ポリペプチドが 2 つ以上の変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドを含む場合は、場合によっては、2 つ以上の変異 P D - L 1 免疫調節ポリペプチドは別々のポリペプチドに存在する。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドはヘテロ二量体である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは三量体ポリペプチドである。

【0086】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）N 末端から C 末端の順に、i）エピトープ及び ii）第 1 の MHC ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチド、ならびに b）N 末端から C 末端の順に、i）第 2 の MHC ポリペプチド、ii）Ig Fc ポリペプチド、及び iii）免疫調節ドメイン（例えば、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチド）を含む第 2 のポリペプチドを含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）N 末端から C 末端の順に、i）エピトープ及び ii）第 1 の MHC ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチド、ならびに b）N 末端から C 末端の順に、i）第 2 の MHC ポリペプチド、及び ii）免疫調節ドメイン（例えば、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチド）を含む第 2 のポリペプチドを含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）N 末端から C 末端の順に、i）エピトープ、ii）第 1 の MHC ポリペプチド、及び iii）

）免疫調節ドメイン（例えば、本開示の変異PD-L1ポリペプチド）を含む第1のポリペプチド、ならびにb）N末端からC末端の順に、i）第2のMHCポリペプチドを含む第2のポリペプチドを含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドが非Ig骨格を含む場合は、非Ig骨格は、XTENペプチド、トランスフェリンポリペプチド、Fc受容体ポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド、シルク様ポリペプチドまたはシルク-エラスチン様ポリペプチドである。

【0087】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは一価である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは多価である。場合によっては、本開示の多価の多量体ポリペプチドは、第1または第2のポリペプチドのうちの1つに免疫グロブリンFcポリペプチドを含む。例えば、本開示の多量体ポリペプチド中に存在するFcポリペプチドに応じて、多量体ポリペプチドはホモ二量体でもよく、ここでは、多量体ポリペプチドの2つの分子はホモ二量体中に存在し、例えば、2つの分子中に存在するFcポリペプチドを介して、多量体ポリペプチドの2つの分子は互いにジスルフィド結合していてもよい。別の例として、本開示の多量体ポリペプチドは、多量体ポリペプチドの3つ、4つまたは5つの分子を含むことができ、ここでは、多量体ポリペプチドの分子は、例えば、分子中に存在するFcポリペプチドを介して、互いにジスルフィド結合していてもよい。

【0088】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）i）エピトープ、ii）2Mポリペプチド、及びiii）本開示の変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b）i）クラスI MHC重鎖、及びii）FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）i）エピトープ、及びii）2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b）i）本開示の変異PD-L1ポリペプチド、ii）クラスI MHC重鎖、及びiii）FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドとを含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）i）エピトープ、ii）2Mポリペプチド、iii）本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、iv）本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、及びv）本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b）i）クラスI MHC重鎖、及びii）FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドは、同一のアミノ酸配列を有する。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドは、アミノ酸配列が互いに異なる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a）i）エピトープ、及びii）2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b）i）本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、ii）本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、及びiii）本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、iv）クラスI MHC重鎖、及びv）FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドとを含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドは、同一のアミノ酸配列を有する。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドは、アミノ酸配列が互いに異なる。

【0089】

リンカー

本開示の多量体ポリペプチドは、例えば、エピトープとMHCポリペプチドとの間、MHCポリペプチドと免疫調節ポリペプチドとの間、MHCポリペプチドとIg Fcポリペプチドとの間、第1の変異PD-L1ポリペプチドと第2の変異PD-L1ポリペプチドとの間、または第2の変異PD-L1ポリペプチドと第3の変異PD-L1ポリペプチドとの間、

ドとの間に挿入されたリンカーペプチドを含むことができる。

【0090】

適切なリンカー（「スペーサー」とも称される）は、容易に選択することができ、いくつかの適切な長さ、例えば、4アミノ酸～10アミノ酸、5アミノ酸～9アミノ酸、6アミノ酸～8アミノ酸、または7アミノ酸～8アミノ酸を含めた、1アミノ酸～25アミノ酸、3アミノ酸～20アミノ酸、2アミノ酸～15アミノ酸、3アミノ酸～12アミノ酸のうちのいずれかでもよい。適切なリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25アミノ酸の長さでもよい。

【0091】

例示的リンカーとしては、グリシンポリマー（G）_n、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）_n、（GS GGS）_n（配列番号8）及び（GGGS）_n（配列番号9）を含め、nは少なくとも1の整数である）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー及び当技術分野で既知の他の可動性リンカーが挙げられる。グリシンポリマー及びグリシン-セリンポリマーを使用することができ、GlyとSerとは両方とも比較的構造不定であるので、成分間の中立のテザーとして働くことができる。グリシンポリマーを使用することができ、グリシンは、アラニンと比べてでさえ、それよりも有意に多くのファイ-ブサイ空間にアクセスし、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限されない（Rev. Computational Chem. 11173-142（1992）を参照されたい）。例示的リンカーは、限定されないが、GGSG（配列番号10）、GGSGG（配列番号11）、GSGSG（配列番号12）、GSGGG（配列番号13）、GGGSG（配列番号14）、GSSSG（配列番号15）などを含めたアミノ酸配列を含むことができる。例示的リンカーは、例えば、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である、Gly（Ser）₄を含むことができる。場合によっては、リンカーは、nが4である、アミノ酸配列（GSSSS）_nを含む。場合によっては、リンカーは、nが5である、アミノ酸配列（GSSSS）_nを含む。例示的リンカーは、例えば、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である、（（Gly）₄）Ser）_n（配列番号45）を含むことができる。例えば、場合によっては、リンカーは、nが4である、アミノ酸配列（GGGGG）_nを含む。場合によっては、リンカーは、nが5である、アミノ酸配列（GGGGG）_nを含む。

【0092】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチド中に存在するリンカーポリペプチドは、本開示の多量体ポリペプチドの第2のポリペプチド中に存在するシステイン残基とジスルフィド結合を形成することができるシステイン残基を含む。場合によっては、例えば、適切なリンカーは、下記のようなアミノ酸配列（配列番号16）を含む。

【0093】

【化1】

GCGASGGGSGGGGS

【0094】

エピトープ

本開示の多量体ポリペプチド中に存在するエピトープは、約4アミノ酸～約25アミノ酸の長さを有することができ、例えば、エピトープは、4アミノ酸（aa）～10aa、10aa～15aa、15aa～20aa、または20aa～25aaの長さを有することができる。例えば、本開示の多量体ポリペプチド中に存在するエピトープは、4アミノ酸（aa）、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa、または25aaの長さを有することができる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチド中に存在するエピトープは、5アミノ

酸～10アミノ酸、例えば、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、または10aaの長さを有する。

【0095】

本開示の多量体ポリペプチド中に存在するエピトープは、T細胞に特異的に結合し、すなわち、エピトープはエピトープ特異的T細胞に特異的に結合する。エピトープ特異的T細胞は、参照アミノ酸配列を有するエピトープに結合するが、参照アミノ酸配列と異なるエピトープに実質的に結合しない。例えば、エピトープ特異的T細胞は、参照アミノ酸配列を有するエピトープに結合し、もし結合したとしても、 10^{-6} M未満、 10^{-5} M未満または 10^{-4} M未満の親和性で、参照アミノ酸配列と異なるエピトープに結合する。エピトープ特異的T細胞は、少なくとも 10^{-7} M、少なくとも 10^{-8} M、少なくとも 10^{-9} Mまたは少なくとも 10^{-10} Mの親和性で、特異的なエピトープに結合することができる。

10

【0096】

適切なエピトープとしては、限定されないが、自己免疫関連抗原に存在するエピトープが挙げられる。自己免疫抗原としては、限定されないが、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質心筋ミオシン(myelin-associated oligodendrocytic basic protein cardiac myosin)、細胞表層タンパク質(OSP)、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、神経フィラメント、インターフェロンオメガ、トランスグルタミナーゼ、芳香族酸カルボキシラーゼ、17-ヒドロキシラーゼ、21-ヒドロキシラーゼ、カルジオリピン、ビルビン酸脱水素酵素、2糖タンパク質I、ホスファチジルセリン、apoH、アネキシンA5、LKM-1、可溶性肝抗原、炭酸脱水酵素、gpIIb-IIIaまたはIb-IX、XVII型コラーゲン、組織トランスグルタミナーゼ、グリアジン、GD1a、GQ1b、BP-1、BP-2、表皮トランスグルタミナーゼ、ヒスチジン-tRNA、シグナル識別ペプチド、Mi-2、Jo1、グルタミン酸脱炭酸酵素、HSP60、HSP70、HSP90、IGRP、インスリン、カルボキシペプチダーゼH、インスリノーマ抗原-2、IA-2ベータ、ICA69、ZnT8、クロモグラニンA、IAPP、sc170、トポイソメラーゼ、ヒストン、基底膜コラーゲンIV型、エノラーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、サイログロブリン、補体第3成分、電位開口型カルシウムチャネル、Q型カルシウムチャネル、シナプトガグミン(synaptogagmin)、ムスカリン性アセチルコリン受容体M1、SMA、LKM-1、LKM-2、LKM-3、可溶性肝抗原、SLA、LP、主要末梢ミエリンタンパク質P0(major peripheral myelin protein P0)、ミエロペルオキシダーゼ、GQ1b、U1-RNP、Kir4.1、ニコチン性アセチルコリン受容体、MusKタンパク質、ヒポクレチン、オレキシン、ケラチン、AQP4、Yo、Hu、グルタミン酸受容体、デスモグレイン3、p62、sp100、Ro、LA、糖タンパク質IIb-IIIaまたはIb-IX、ADAMTS13、カルジオリピン、2糖タンパク質I、HPA-1a、HPA-5b、IFN-ガンマ、IL-1、TNF-アルファ、及びGMCSFが挙げられる。自己免疫抗原としては、1型糖尿病、多発性硬化症、または全身性エリテマトーデスと関連する自己抗原も挙げられる。膵ベータ細胞抗原である膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質(IGRP)ペプチド(IGRP206-214として知られる)を、例えば、1型糖尿病との関連において自己免疫エピトープとして使用することができる。IGRP206-214のアミノ酸配列は、VY L K T N V F L (配列番号43)である(例えば、Krisnamurthy et al. (2008) J. Immunol. 180: 4458、及びHan et al. (2005) J. Clin. Invest. 115: 1879を参照のこと)。他の適切なIGRPペプチドは、例えば、Jarchum et al. (2008) Clin. Immunol. 127: 359において開示されている。1型糖尿病との関連において適切な自己抗原エピトープとしては、プレプロインスリンのペプチドエピトープ(例えば、ALWGPDPA A A (配列番号44))が挙げられる(

20

30

40

50

例えば、Skowera et al. (2008) J. Clin. Invest. 118: 3390を参照のこと)。

【0097】

自己免疫抗原及び関連する自己免疫障害としては、例えば、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、及びミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)(いずれの場合も多発性硬化症(MS)と関連する)、CD44、プレプロインスリン、プロインスリン、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65)、チロシンホスファターゼ様インスリノーマ抗原2(IA2)、亜鉛輸送体(ZnT8)、及び熱ショックタンパク質60(HSP60)(いずれの場合もI型糖尿病と関連する)、自己免疫性ブドウ膜炎と関連する光受容体間レチノイド結合タンパク質(IRBP)、アセチルコリン受容体AChR、及びインスリン様増殖因子-1受容体(IGF-1R)(いずれの場合も重症筋無力症と関連する)、リウマチ熱と関連するベータ-溶血性連鎖球菌由来のMタンパク質(偽性自己抗原)、関節炎と関連するマクロファージ遊走阻止因子、Ro/LaRNP複合体、アルファ-フォドリン及びベータ-フォドリン、膵島細胞自己抗原、ポリ(ADP)リボースポリメラーゼ(PARP)、NuMA、NOR-90、Ro60自己抗原、及びp27抗原(いずれの場合もシェーグレン症候群と関連する)、Ro60自己抗原、低密度リボタンパク質、U-1核内低分子リボ核タンパク質複合体のSm抗原(B/B'、D1、D2、D3、E、F、G)、及びRNPリボ核タンパク質(いずれの場合もエリテマトーデスと関連する)、oxLDL、ベータ(2)GPI、HSP60/65、及びoxLDL/ベータ(2)GPI(いずれの場合も粥状動脈硬化と関連する)、特発性拡張型心筋症(DCM)と関連する心臓のベータ(1)-アドレナリン受容体、筋炎と関連するヒスチジル-tRNA合成酵素(HisRS)、強皮症と関連するトポイソメラーゼI、IL-17、または熱ショックタンパク質が挙げられる。

【0098】

MHCポリペプチド

上記のように、本開示の多量体ポリペプチドはMHCポリペプチドを含む。本開示において、用語「主要組織適合抗原複合体(MHC)ポリペプチド」は、ヒトMHC(ヒト白血球抗原(HLA)とも称される)ポリペプチド、げっ歯類(例えば、マウス、ラットなど)のMHCポリペプチド及び他の哺乳類種(例えば、ウサギ類(例えば、ウサギ)、非ヒト霊長類、イヌ(例えば、イヌ)、ネコ(例えば、ネコ)、有蹄動物(例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ラクダなど)のMHCポリペプチドなどを含めた、様々な種のMHCポリペプチドを含むことを意図する。用語「MHCポリペプチド」は、クラスI MHCポリペプチド(例えば、-2ミクログロブリン及びMHCクラスI重鎖)ならびにMHCクラスIIポリペプチド(例えば、MHCクラスIIポリペプチド及びMHCクラスIIポリペプチド)を含むことを意図する。

【0099】

上記のように、本開示の多量体ポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1及び第2のMHCポリペプチドはクラスI MHCポリペプチドであり、例えば、場合によっては、第1のMHCポリペプチドはMHCクラスI-2ミクログロブリン(-2M)ポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドはMHCクラスI重鎖(H鎖)である。他の場合では、第1及び第2のMHCポリペプチドは、クラスII MHCポリペプチドであり、例えば、場合によっては、第1のMHCポリペプチドはMHCクラスII-鎖ポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドはMHCクラスII-鎖ポリペプチドである。他の場合では、第1のポリペプチドはMHCクラスII-鎖ポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドはMHCクラスII-鎖ポリペプチドである。

【0100】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドのMHCポリペプチドは、ヒトMHCポリペプチドであり、ヒトMHCポリペプチドは、「ヒト白血球抗原」(「HLA」)ポリペプチドとも称される。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドのMHCポリペ

チドはクラス I H L A ポリペプチド、例えば、2 - ミクログロブリンポリペプチドまたはクラス I H L A 重鎖ポリペプチドである。クラス I H L A 重鎖ポリペプチドとしては、H L A - A 重鎖ポリペプチド、H L A - B 重鎖ポリペプチド、H L A - C 重鎖ポリペプチド、H L A - E 重鎖ポリペプチド、H L A - F 重鎖ポリペプチド及び H L A - G 重鎖ポリペプチドが挙げられる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの M H C ポリペプチドは、クラス I I H L A ポリペプチド、例えば、クラス I I H L A 鎖またはクラス I I H L A 鎖である。M H C クラス I I ポリペプチドとしては、M H C クラス I I D P 及び ポリペプチド、D M 及び ポリペプチド、D O A 及び ポリペプチド、D O B 及び ポリペプチド、D Q 及び ポリペプチドならびに D R 及び ポリペプチドが挙げられる。

10

【0101】

一例を挙げると、本開示の多量体ポリペプチドの M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 5 A に示されるヒト H L A - A 重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸 25 ~ 365 に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0102】

一例を挙げると、本開示の多量体ポリペプチドの M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、以下のヒト H L A - A 重鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列のアミノ酸 25 ~ 365 に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる（配列番号 17）。

20

【0103】

【化 2】

GSMSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMPEPRAPWIEQEGPEY
WDGETRKVKKAHSQTHRVDLGLTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQ
YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
LENGKETLQR TDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYP AEITLTWQRDGEDQTQDTE
LVETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR Y TCHVQHEGLPKPLTLRWEP

30

【0104】

別の例として、本開示の多量体ポリペプチドの M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 5 B に示されるヒト H L A - B 重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸 25 ~ 362 に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0105】

別の例として、本開示の多量体ポリペプチドの M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 5 C に示されるヒト H L A - C 重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸 25 ~ 362 に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0106】

別の例として、本開示の多量体ポリペプチドの M H C クラス I 重鎖ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる（配列番号 18）。

【0107】

【化 3】

GPHSLRYFVTAVSRPGLGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSADNPRFEPRAPWMEQ
 EGPEYWEEQTQRAKSDEQWFRVSLRTAQRYYNQSKGGSHTFQRMFGCDVGSWRLLR
 GYQQFAYDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITRRKWEQAGDAEYYRAYLEGECEVWL
 RRYLELGNETLLRTDSPKAHVITYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQ
 DMELVETRPAGDGTQKWA AVVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRW

【0108】

本開示の多量体ポリペプチドの 2 - ミクログロブリン (2 M) ポリペプチドは、ヒト 2 M ポリペプチド、非ヒト霊長類 2 M ポリペプチド、マウス 2 M ポリペプチドなどでもよい。ある場合には、 2 M ポリペプチドは、図 6 に示される 2 M アミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある場合には、 2 M ポリペプチドは、図 6 に示される 2 M アミノ酸配列のアミノ酸 21 ~ 119 に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0109】

20

場合によっては、MHC ポリペプチドは、参照 MHC ポリペプチド (参照 MHC ポリペプチドは野生型 MHC ポリペプチドでもよい) に対して、単一のアミノ酸置換を含み、ここでは、単一のアミノ酸置換は、あるアミノ酸をシステイン (Cys) 残基と置換する。そのようなシステイン残基は、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチドの MHC ポリペプチド中に存在する場合には、本開示の多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチド鎖中に存在するシステイン残基とジスルフィド結合を形成することができる。

【0110】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチド中の第 1 の MHC ポリペプチド及び / または本開示の多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチド中の第 2 の MHC ポリペプチドは、あるアミノ酸をシステインと置換するためのアミノ酸置換を含み、ここでは、第 1 の MHC ポリペプチド中の置換システインは、第 2 の MHC ポリペプチド中のシステインとジスルフィド結合を形成し、第 1 の MHC ポリペプチド中のシステインは、第 2 の MHC ポリペプチド中の置換システインとジスルフィド結合を形成し、または第 1 の MHC ポリペプチド中の置換システインは、第 2 の MHC ポリペプチド中の置換システインとジスルフィド結合を形成する。

30

【0111】

例えば、場合によっては、HLA 2 - ミクログロブリン及び HLA クラス I 重鎖中の残基の以下の対のうちの 1 つがシステインで置換される (ここでは、残基番号は成熟ポリペプチドのものである)。1) 2 M 残基 12、HLA クラス I 重鎖残基 236、2) 2 M 残基 12、HLA クラス I 重鎖残基 237、3) 2 M 残基 8、HLA クラス I 重鎖残基 234、4) 2 M 残基 10、HLA クラス I 重鎖残基 235、5) 2 M 残基 24、HLA クラス I 重鎖残基 236、6) 2 M 残基 28、HLA クラス I 重鎖残基 232、7) 2 M 残基 98、HLA クラス I 重鎖残基 192、8) 2 M 残基 99、HLA クラス I 重鎖残基 234、9) 2 M 残基 3、HLA クラス I 重鎖残基 120、10) 2 M 残基 31、HLA クラス I 重鎖残基 96、11) 2 M 残基 53、HLA クラス I 重鎖残基 35、12) 2 M 残基 60、HLA クラス I 重鎖残基 96、13) 2 M 残基 60、HLA クラス I 重鎖残基 122、14) 2 M 残基 63、HLA クラス I 重鎖残基 27、15) 2 M 残基 Arg 3、HLA クラス I 重鎖残基 Gly 120、16) 2 M 残基 His 31、HLA クラス I 重鎖残基 Glu 96、17) 2 M 残基 Asp 53、HLA クラス I 重鎖残基 Arg 35、18) 2 M 残基 Trp 60、HLA クラス I 重鎖残基 G

40

50

1 n 9 6、1 9) 2 M 残基 T r p 6 0、H L A クラス I 重鎖 残基 A s p 1 2 2、2 0)
 2 M 残基 T y r 6 3、H L A クラス I 重鎖 残基 T y r 2 7、2 1) 2 M 残基 L y s 6
 、H L A クラス I 重鎖 残基 G l u 2 3 2、2 2) 2 M 残基 G l n 8、H L A クラス I 重
 鎖 残基 A r g 2 3 4、2 3) 2 M 残基 T y r 1 0、H L A クラス I 重鎖 残基 P r o 2 3
 5、2 4) 2 M 残基 S e r 1 1、H L A クラス I 重鎖 残基 G l n 2 4 2、2 5) 2 M
 残基 A s n 2 4、H L A クラス I 重鎖 残基 A l a 2 3 6、2 6) 2 M 残基 S e r 2 8、
 H L A クラス I 重鎖 残基 G l u 2 3 2、2 7) 2 M 残基 A s p 9 8、H L A クラス I 重
 鎖 残基 H i s 1 9 2、及び 2 8) 2 M 残基 M e t 9 9、H L A クラス I 重鎖 残基 A r g
 2 3 4。M H C / H L A クラス I 重鎖のアミノ酸の番号付けは、シグナルペプチドを有さ
 ない成熟 M H C / H L A クラス I 重鎖に関してである。例えば、シグナルペプチドを含む 10
 、図 5 A に示されるアミノ酸配列では、G l y 1 2 0 は G l y 1 4 4 である、G l n 9 6
 は G l n 1 2 0 である、などである。場合によっては、2 M ポリペプチドは R 1 2 C 置
 換を含み、H L A クラス I 重鎖は A 2 3 6 C 置換を含み、そのような場合では、2 M ポ
 リペプチドの C y s - 1 2 と H L A クラス I 重鎖の C y s - 2 3 6 との間にジスルフィド
 結合が生じる。例えば、場合によっては、成熟 H L A - A アミノ酸配列の残基 2 3 6 (す
 なわち、図 5 A に示されるアミノ酸配列の残基 2 6 0) が C y s で置換される。場合によ
 っては、成熟 H L A - B アミノ酸配列の残基 2 3 6 (すなわち、図 5 B に示されるアミノ
 酸配列の残基 2 6 0) が C y s で置換される。場合によっては、成熟 H L A - C アミノ酸
 配列の残基 2 3 6 (すなわち、図 5 C に示されるアミノ酸配列の残基 2 6 0) が C y s で
 置換される。場合によっては、図 6 に示されるアミノ酸配列の残基 3 2 (成熟 2 M の A 20
 r g - 1 2 に対応する) が C y s で置換される。

【 0 1 1 2 】

場合によっては、2 M ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 1 3 】

【 化 4 】

IQRTPKIQVY

SRHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW

SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTLSPQ KIVKWDRDM

【 0 1 1 4 】

場合によっては、2 M ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 1 5 】

【 化 5 】

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS

NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF

TPTEKDEYAC RVNHVTLSPQ KIVKWDRDM

【 0 1 1 6 】

場合によっては、H L A クラス I 重鎖ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列 (配列番号 40
 1 9) を含む。

【 0 1 1 7 】

【化 6】

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGET
 RKVKAHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQRM YGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKE
 DLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLR RYLENGKETLQRTDAPKTHMTHH
 AVSDHEATLRCWALS FYP AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRP AGDGTFQKWA AVVVP SGQEQR
 YTCHVQHEGLPKPLTLR WEP

【0118】

10

場合によっては、HLAクラスI重鎖ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列（配列番号20）を含む。

【0119】

【化 7】

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKVKAHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQRM YGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDY
 IALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLR RYLENGKETLQRTDAPKT
 HMTTHAVSDHEATLRCWALS FYP AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRP CGDGTFQKWA AVVVP S
 GQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLR WEP

20

【0120】

場合によっては、2Mポリペプチドは、下記のアミノ酸配列（配列番号42）を含む。

【0121】

【化 8】

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE
 HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM

【0122】

30

本開示の多量体ポリペプチドHLAクラスI重鎖ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列（配列番号21）を含む。ここでは、下線が引かれ、太字のCys残基は、多量体ポリペプチド中で互いにジスルフィド結合を形成する。

【0123】

【化 9】

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKVKAHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQRM YGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDY
 IALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLR RYLENGKETLQRTDAPKT
 HMTHHAVSDHEATLRCWALS FYP AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRP CGDGTFQKWA AVVVP S
 GQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLR WEP

40

【0124】

免疫調節ポリペプチド

本開示の多量体ポリペプチドは、上記のように、変異PD-L1ポリペプチドを含む。したがって、本開示の多量体ポリペプチドは、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドを含む。

【0125】

D26の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチド

50

は、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 26 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、または Glu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ala、Gly、Val、Leu、または Ile である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ala、Gly、Val、Leu、Ile、または Arg である。場合によっては、本開示の変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Ala である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Gly である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Val である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Leu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 26 は、Arg である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD - 1 (例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチド) に対する図 2 B (または配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含む PD - L1 ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、PD - 1 ポリペプチドに対する結合親和性の約 40 % ~ 約 60 % の低下を示し、野生型 B7 - 1 ポリペプチド (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B7 - 1 ポリペプチド) に対する野生型 PD - L1 ポリペプチド (例えば、図 2 B または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む PD - L1 ポリペプチド) を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性の少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % を保持する。

【0126】

10

20

30

40

50

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、D26のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、D8のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、アスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにAla、Gly、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにAla、Gly、Val、Leu、Ile、またはArgである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにValである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸26は、Aspの代わりにArgである。

【0127】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、D8のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸8は、アスパラギン酸以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、アスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにAla、Gly、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにValである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸8は、Aspの代わ

【 0 1 2 8 】

10

【 0 1 2 9 】

50

%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Glyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Alaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Valである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Leuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Ileである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対して図2B（または配列番号2）に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約15%~約35%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図3Bまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B7-1に対する結合親和性の約70%~約90%の低下を示す）。

【0130】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、T37のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、T19のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにGly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにGly、Ala、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにArgである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸37は、Thrの代わりにLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペ

10

20

30

40

50

リペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 37 は、T h r の代わりに H i s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 37 は、T h r の代わりに G l y である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 37 は、T h r の代わりに A l a である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 37 は、T h r の代わりに V a l である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 37 は、T h r の代わりに L e u である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 37 は、T h r の代わりに I l e である。

10

【 0 1 3 1 】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、T 19 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸 19 は、スレオニン以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 19 は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、または G l u であり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、A r g、H i s、または L y s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに G l y、A l a、V a l、L e u、または I l e である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに A r g、H i s、または L y s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに A r g である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに L y s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに H i s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに G l y である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに A l a である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに V a l である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに L e u である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 19 は、T h r の代わりに I l e である。

20

30

40

【 0 1 3 2 】

I 5 4 の置換

50

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ala、Gly、Leu、Glu、Arg、またはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、GluまたはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Alaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Glyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Leuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Aspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Argである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD-1（例えば、図2Bに示される

アミノ酸配列を含むPD - 1ポリペプチド)に対して図2B(または配列番号2)に示されるアミノ酸配列を含むPD - L1ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約70%~約100%の結合親和性をPD - 1ポリペプチドに対して示し、野生型B7 - 1ポリペプチド(例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7 - 1ポリペプチド)に対する野生型PD - L1ポリペプチド(例えば、図3Bまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD - L1ポリペプチド)を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7 - 1に対する結合親和性の低下を示す(例えば、B7 - 1に対する結合親和性の約40%~約90%の低下を示す)。

【0133】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、バリン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ala、Gly、Leu、Glu、Arg、またはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、GluまたはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Glyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Leuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Aspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変

10

20

30

40

50

異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Gluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Argである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Aに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対して図2A（または配列番号1）に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約70%～約100%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Cに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図2Aまたは配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B7-1に対する結合親和性の約40%～約90%の低下を示す）。

10

【0134】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、I54のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、I36のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸54は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにAla、Gly、Leu、Arg、またはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸54は、Ileの代わりにArgである。

20

30

40

【0135】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、V54のアミノ酸置換を有する図2Aに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、V36のアミノ酸置換を有する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示さ

50

れるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、バリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 54 は、Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 54 は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにAla、Gly、Leu、Glu、Arg、またはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにGluまたはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Aに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Valの代わりにArgである。

10

20

30

40

50

【0136】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、Ile-36のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸36は、イソロイシン以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、イソロイシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにAla、Gly、Leu、Arg、またはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、Ileの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は

、I l eの代わりにG l yである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、I l eの代わりにA s pである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、I l eの代わりにA r gである。

【0137】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、V 36のアミノ酸置換を有する配列番号1に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、バリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、G l y、A l a、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、またはG l uであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、イソロイシンまたはバリン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸36は、G l y、A l a、L e u、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、またはG l uであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにA l a、G l y、L e u、G l u、またはA s pである。場合によっては、本開示の変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにG l uまたはA s pである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにL e uである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにG l yである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにA s pである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにG l uである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸36は、V a lの代わりにA r gである。

【0138】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、図2Hに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、図2Iに示されるアミノ酸配列を含む。

【0139】

Q 66の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L 1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、グルタミン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸66は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、L y s、A r g、H i s、A s p、またはG l uである。場合によ

っては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、GluまたはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Gluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Aspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD-1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド）に対して図2B（または配列番号2）に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約80%～約100%の結合親和性をPD-1ポリペプチドに対して示し、野生型B7-1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7-1ポリペプチド）に対する野生型PD-L1ポリペプチド（例えば、図3Bまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7-1に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B7-1に対する結合親和性の約40%～約90%の低下を示す）。

10

20

30

40

【0140】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、Q66のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、Q48のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、グルタミン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸66は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Glnの代わりにAla、Gly、Leu、Glu、またはAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Glnの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Glnの代わりにLeuである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Glnの代わりにGlyである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Glnの代わりにAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸66は、Glnの代わりにGluである。

【0141】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、Q48のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくと

50

も 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸 48 は、グルタミン以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、グルタミン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 48 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp、または Glu であり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Ala、Gly、Leu、Glu、または Asp である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Glu または Asp である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Ala である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Leu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Gly である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Asp である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 48 は、Gln の代わりに Glu である。

10

20

【0142】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 J に示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 K に示されるアミノ酸配列を含む。

【0143】

E72 の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、グルタミン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 72 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、または Asp である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、Arg、Lys、または His である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、Asp、Arg、Lys、または His である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列

30

40

50

を含み、アミノ酸 72 は、A r g である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、L y s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、H i s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、A s p である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、P D - 1 (例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む P D - 1 ポリペプチド)に対して図 2 B (または配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約 30 % ~ 約 60 % の結合親和性を P D - 1 ポリペプチドに対して示し、野生型 B 7 - 1 ポリペプチド (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B 7 - 1 ポリペプチド)に対する野生型 P D - L 1 ポリペプチド (例えば、図 3 B または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む P D - L 1 ポリペプチド)を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B 7 - 1 に対する結合親和性の低下を示す (例えば、B 7 - 1 に対する結合親和性の約 40 % ~ 約 90 % の低下を示す)。

【0144】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、E 72 のアミノ酸置換を有する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、E 54 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、グルタミン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 72 は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T y r、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、または A s p であり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、G l u の代わりに A s p、A r g、H i s、または L y s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、G l u の代わりに A r g である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、G l u の代わりに L y s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、G l u の代わりに H i s である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 72 は、G l u の代わりに A s p である。

【0145】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、E 54 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性

を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸 54 は、グルタミン酸以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、グルタミン酸以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 54 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、または Asp であり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Glu の代わりに Asp、Arg、His、または Lys である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Glu の代わりに Arg、His、または Lys である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Glu の代わりに Lys である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Glu の代わりに His である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 54 は、Glu の代わりに Asp である。

10

20

【0146】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 L に示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 M に示されるアミノ酸配列を含む。

【0147】

Y56 の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 56 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、または Glu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Ala、Gly、Val、Leu、または Ile である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Asp または Glu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Arg、His、または Lys である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 %

30

40

50

のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Ala、Asp、または Arg である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Arg である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Asp である。場合によっ

10

ては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Ala である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD-1 (例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD-1 ポリペプチド) に対して図 2 B (または配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含む PD-L1 ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約 50 % ~ 約 100 % の結合親和性を PD-1 ポリペプチドに対して示し、野生型 B7-1 ポリペプチド (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B7-1 ポリペプチド) に対する野生型 PD-L1 ポリペプチド (例えば、図 3 B または

20

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む PD-L1 ポリペプチド) を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7-1 に対する結合親和性の低下を示す (例えば、B7-1 に対する結合親和性の約 60 % ~ 約 95 % の低下を示す)。

【0148】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、Y56 のアミノ酸置換を有する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、Y38 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、チロシン以外の任意のアミノ酸であり、例え

30

ば、アミノ酸 56 は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、または Glu であり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Tyr の代わりに Ala、Val、Gly、Leu、または Ile である。場合によっ

40

ては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Tyr の代わりに Arg、His、または Lys である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Tyr の代わりに Asp または Glu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Tyr の代わりに Arg である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 56 は、Tyr の代わりに Asp である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、ア

【0149】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD-L1 ポリペプチドは、Y38 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %

50

、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸38は、チロシン以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、チロシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸38は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、Tyrの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、Tyrの代わりにAspまたはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、Tyrの代わりにAla、Gly、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、Tyrの代わりにArgである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、Tyrの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸38は、Tyrの代わりにAspである。

【0150】

G119の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸119は、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸119は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸119は、Ala、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸119は、AspまたはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸119は、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸119は、Aspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少な

くとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Arg である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Ala である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、PD - 1 (例えば、図 3 B に示されるアミノ酸配列を含む PD - 1 ポリペプチド) に対して図 2 B (または配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含む PD - L1 ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約 20 % ~ 約 50 % または約 50 % ~ 100 % の結合親和性を PD - 1 ポリペプチドに対して示し、野生型 B7 - 1 ポリペプチド (例えば、図 3 D に示されるアミノ酸配列を含む B7 - 1 ポリペプチド) に対する野生型 PD - L1 ポリペプチド (例えば、図 3 B または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む PD - L1 ポリペプチド) を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7 - 1 に対する結合親和性の低下を示し (例えば、B7 - 1 に対する結合親和性の約 60 % ~ 約 95 % の低下を示す)。

10

【0151】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、G119 のアミノ酸置換を有する図 2 B に示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、G101 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、グリシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 119 は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、または Glu であり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Gly の代わりに Ala、Val、Leu、または Ile である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Gly の代わりに Arg、His、または Lys である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Gly の代わりに Asp または Glu である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Gly の代わりに Arg である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Gly の代わりに Asp である。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 119 は、Gly の代わりに Ala である。

20

30

【0152】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、G101 のアミノ酸置換を有する配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸 101 は、グリシン以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 PD - L1 ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸 101 は、グリシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 101 は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、または Glu であり得る。場合によっては、本

40

50

開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸101は、Glyの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸101は、Glyの代わりにAspまたはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸101は、Glyの代わりにAla、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸101は、Glyの代わりにArgである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸101は、Glyの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸101は、Glyの代わりにAspである。

10

【0153】

G120の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸120は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Ala、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、AspまたはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Arg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Aspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Alaである。場合によっては、本開示の多

20

30

40

50

量体ポリペプチドは、PD - 1（例えば、図3Bに示されるアミノ酸配列を含むPD - 1ポリペプチド）に対して図2B（または配列番号2）に示されるアミノ酸配列を含むPD - L1ポリペプチドを含む対照多量体ポリペプチドが示す結合親和性の約20%～約50%または約50%～100%の結合親和性をPD - 1ポリペプチドに対して示し、野生型B7 - 1ポリペプチド（例えば、図3Dに示されるアミノ酸配列を含むB7 - 1ポリペプチド）に対する野生型PD - L1ポリペプチド（例えば、図3Bまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むPD - L1ポリペプチド）を含む対照多量体ポリペプチドの結合親和性と比較して、B7 - 1に対する結合親和性の低下を示す（例えば、B7 - 1に対する結合親和性の約60%～約95%の低下を示す）。

【0154】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、G120のアミノ酸置換を有する図2Bに示されるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、G102のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、グリシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸120は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Glyの代わりにAla、Val、Leu、またはIleである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Glyの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Glyの代わりにAspまたはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Glyの代わりにArgである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Glyの代わりにAspである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、図2Bに示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸120は、Glyの代わりにAlaである。

【0155】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、G102のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、すなわち、アミノ酸102は、グリシン以外のものである。例えば、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、グリシン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸101は、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、またはGluであり得る。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、Glyの代わりにArg、His、またはLysである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、Glyの代わりにAspまたはGluである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD - L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、Glyの代わりにAla、Val、Leu、またはIleである。場合

によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、Glyの代わりにArgである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、Glyの代わりにAlaである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異PD-L1ポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸102は、Glyの代わりにAspである。

【0156】

複数の変異PD-L1免疫調節ドメイン

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、単一の変異PD-L1免疫調節ポリペプチドを含む。

10

【0157】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、2つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドを含む。場合によっては、2つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドは、ポリペプチド鎖に直列に存在する。場合によっては、2つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドは、別々のポリペプチド鎖に存在する。場合によっては、2つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドは、多量体ポリペプチドの別々のポリペプチド鎖に存在する。場合によっては、2つの変異PD-L1ポリペプチドは、互いに同一のアミノ酸配列を有する。場合によっては、2つの変異PD-L1ポリペプチドは、異なるアミノ酸配列を有する（例えば、これら2つは、少なくとも1つのアミノ酸が互いに異なる）。

20

【0158】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、3つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドを含む。場合によっては、3つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドは、ポリペプチド鎖に直列で存在する。場合によっては、3つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドのうちの1つは、多量体ポリペプチドにおいてその他の2つの変異PD-L1免疫調節ポリペプチドとは別のポリペプチド鎖に存在する。場合によっては、3つの変異PD-L1ポリペプチドは、互いに同一のアミノ酸配列を有する。場合によっては、3つの変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、異なるアミノ酸配列を有する（例えば、それぞれ、少なくとも1つのアミノ酸がその他の2つとは異なる）。

30

【0159】

骨格ポリペプチド

本開示のT細胞調節多量体ポリペプチドは、Fcポリペプチドまたは別の適切な骨格ポリペプチドを含む。

【0160】

適切な骨格ポリペプチドとしては、抗体ベースの骨格ポリペプチド及び非抗体ベースの骨格が挙げられる。非抗体ベースの骨格としては、例えば、アルブミン、XTEN（伸長組換え）ポリペプチド、トランスフェリン、Fc受容体ポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（例えば、Hassouneh et al. (2012) Methods Enzymol. 502: 215を参照されたい。例えば、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸である（Val-Pro-Gly-X-Gly）のペンタペプチド繰り返し単位を含むポリペプチド）、アルブミン結合ポリペプチド、シルク様ポリペプチド（例えば、Valuzzi et al. (2002) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 357: 165）を参照されたい）、シルク-エラスチン様ポリペプチド（SELP：例えば、Megeed et al. (2002) Adv Drug Deliv Rev. 54: 1075を参照されたい）などが挙げられる。適切なXTENポリペプチドとしては、例えば、WO2009/023270、WO2010/091122、WO2007/103515、US2010/0189682及びUS2009/0092582に開示されているものが挙げられ、Schellenberger et al. (2009) Nat Biotechnol. 27: 1186）も参照されたい。適切なアルブミンポリペプチドとしては、例えば、ヒト血清アルブミンが

40

50

挙げられる。

【0161】

適切な骨格ポリペプチドは、場合によっては、半減期延長ポリペプチドである。したがって、場合によっては、適切な骨格ポリペプチドは、骨格ポリペプチドを欠く対照多量体ポリペプチドと比較して、多量体ポリペプチドのインビボ半減期（例えば、血清半減期）を延ばす。例えば、場合によっては、骨格ポリペプチドは、骨格ポリペプチドを欠く対照多量体ポリペプチドと比較して、多量体ポリペプチドのインビボ半減期（例えば、血清半減期）を少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約25倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍または100倍超延ばす。一例を挙げると、場合によっては、Fcポリペプチドは、Fcポリペプチドを欠く対照多量体ポリペプチドと比較して、多量体ポリペプチドのインビボ半減期（例えば、血清半減期）を少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約25倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍または100倍超延ばす。

10

【0162】

Fcポリペプチド

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの第1及び/または第2のポリペプチド鎖は、Fcポリペプチドを含む。本開示の多量体ポリペプチドのFcポリペプチドは、ヒトIgG1 Fc、ヒトIgG2 Fc、ヒトIgG3 Fc、ヒトIgG4 Fcなどでもよい。場合によっては、Fcポリペプチドは、図4A～4Cに示されるFc領域のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Fc領域は、図4Aに示されるヒトIgG1 Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Fc領域は、図4Aに示されるヒトIgG1 Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つN77の置換を含み、例えば、Fcポリペプチドは、N77A置換を含む。場合によっては、Fcポリペプチドは、図4Aに示されるヒトIgG2 Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、例えば、Fcポリペプチドは、図4Aに示されるヒトIgG2 Fcポリペプチドのアミノ酸99～325に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Fcポリペプチドは、図4Aに示されるヒトIgG3 Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、例えば、Fcポリペプチドは、図4Aに示されるヒトIgG3 Fcポリペプチドのアミノ酸19～246に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Fcポリペプチドは、図4Bに示されるヒトI

20

30

40

50

g M F c ポリペプチドに対して少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、例えば、F c ポリペプチドは、図 4 B に示されるヒト Ig M F c ポリペプチドに対するアミノ酸 1 ~ 276 に対して少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、F c ポリペプチドは、図 4 C に示されるヒト Ig A F c ポリペプチドに対して少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、例えば、F c ポリペプチドは、図 4 C に示されるヒト Ig A F c ポリペプチドに対するアミノ酸 1 ~ 234 に対して少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0163】

さらなるポリペプチド

本開示の多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖は、上記のものに加えて、1つまたは複数のポリペプチドを含むことができる。適切なさらなるポリペプチドとしては、エピトープタグ及び親和性ドメインが挙げられる。1つまたは複数のさらなるポリペプチドは、本開示の多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖の N 末端、本開示の多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖の C 末端または本開示の多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖の内部に含まれ得る。

20

【0164】

エピトープタグ

適切なエピトープタグとしては、限定されないが、ヘマグルチニン (HA: 例えば、Y P Y D V P D Y A (配列番号 22))、F L A G (例えば、D Y K D D D D K (配列番号 23))、c - m y c (例えば、E Q K L I S E E D L (配列番号 24)) などが挙げられる。

30

【0165】

親和性ドメイン

親和性ドメインは、特定または精製に有用な結合パートナー、例えば固体支持体に固定化されたものなどと相互作用することができるペプチド配列を含む。複数の連続した単一アミノ酸、例えばヒスチジンをコードする DNA 配列は、発現タンパク質に融合している場合に、ニッケルセファロースなどの樹脂カラムへの高親和性結合による組換えタンパク質のワンステップ精製に使用することができる。例示的親和性ドメインとしては、H i s 5 (H H H H H) (配列番号 25)、H i s X 6 (H H H H H H) (配列番号 26)、C - m y c (E Q K L I S E E D L) (配列番号 27)、F l a g (D Y K D D D D K) (配列番号 28)、S t r e p T a g (W S H P Q F E K) (配列番号 29)、ヘマグルチニン、例えば、H A タグ (Y P Y D V P D Y A) (配列番号 30)、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T)、チオレドキシン、セルロース結合ドメイン、R Y I R S (配列番号 31)、P h e - H i s - H i s - T h r (配列番号 32)、キチン結合ドメイン、S - ペプチド、T 7 ペプチド、S H 2 ドメイン、C 末端 RNA タグ、W E A A A R E A C C R E C C A R A (配列番号 33)、金属結合ドメイン、例えば、亜鉛結合ドメインまたはカルシウム結合ドメイン、例えば、カルシウム結合タンパク質、例えば、カルモジュリン、トロポニン C、カルシニューリン B、ミオシン軽鎖、リカバリン、S - モジュリン、ビジニン、V I L I P、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フリクエニン、カルトラクチン、カルパイン大サブユニット、S 100 タンパク質、パルプアルブミン、カルビンディン D 9 K、カルビンディン D 28 K 及びカルレチニン由来のもの、インティン、ピ

40

50

オチン、ストレプトアビジン、MyoD、Id、ロイシンジッパー配列ならびにマルトース結合タンパク質が挙げられる。

【0166】

例示的多量体ポリペプチド

本開示の例示的多量体ポリペプチドを以下に記載する。

【0167】

D26の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、ii) 2Mポリペプチド、及びiii) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸26が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸26が、AlaもしくはArgである変異PD-L1ポリペプチド、または配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸8が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸8が、AlaもしくはArgである変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びii) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸26が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸26が、AlaもしくはArgである変異PD-L1ポリペプチド、または配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸8が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸8が、AlaもしくはArgである変異PD-L1ポリペプチド、及びiii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、ii) 2Mポリペプチド、iii) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、iv) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、及びv) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸26が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸26が、AlaもしくはArgであるアミノ酸配列を含むか、またはi i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸8が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸8が、AlaもしくはArgであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びi i) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、i i) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、i i i) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、i v) クラスI MHC重鎖、及びv) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸26が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸26が、AlaもしくはArgであるアミノ酸配列を含むか、またはi i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸8が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸8が、AlaもしくはArgであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びi i) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、i i) リンカー、i i i) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、i v) リンカー、v) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、v i) クラスI MHC重鎖、及びv i i) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸26が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸26が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸26が、AlaもしくはArgであるアミノ酸配列を含むか、またはi i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%

、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸8が、アスパラギン酸以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸8が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸8が、AlaもしくはArgであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、リンカーは、(GSSSS)nという配列(nは、1、2、3、4、または5である)を含む。場合によっては、nは、4である。場合によっては、nは、5である。

【0168】

T37の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、ii) 2Mポリペプチド、及びiii) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸37が、スレオニン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisである変異PD-L1ポリペプチド、または配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸19が、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり得、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisである変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びii) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸37が、スレオニン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisである変異PD-L1ポリペプチド、または配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸19が、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり得、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisである変異PD-L1ポリペプチド、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、ii) 2Mポリペプチド、iii) 本開示の第1の変

10

20

30

40

50

異PD-L1ポリペプチド、i v) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、及びv) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びi i) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸37が、スレオニン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisであるアミノ酸配列を含むか、またはi i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸19が、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり得、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びi i) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、i i) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、i i i) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、i v) クラスI MHC重鎖、及びv) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸37が、スレオニン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisであるアミノ酸配列を含むか、またはi i) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸19が、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり得、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びi i) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、i i) リンカー、i i i) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、i v) リンカー、v) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、v i) クラスI MHC重鎖、及びv i i) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列

に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸37が、スレオニン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり、例えば、アミノ酸37が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisであるアミノ酸配列を含むか、またはii)配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸19が、スレオニン以外の任意のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであり得、例えば、アミノ酸19が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys、もしくはHisであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、リンカーは、(GSSSS)_nという配列(nは、1、2、3、4、または5である)を含む。場合によっては、nは、4である。場合によっては、nは、5である。

【0169】

Y56の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、ii) 2Mポリペプチド、及びiii) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸56が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸56が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸56が、Ala、Gly、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸56が、AspもしくはGluであるか、またはアミノ酸56が、Arg、His、もしくはLysである変異PD-L1ポリペプチド、あるいは配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸38が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸56が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸38が、Ala、Gly、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸38が、AspもしくはGluであるか、またはアミノ酸38がArg、His、もしくはLysである変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びii) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸56が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸56が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸56が、Ala、Gly、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸56が、AspもしくはGluであるか、または

アミノ酸 56 が、A r g、H i s、もしくは L y s である変異 P D - L 1 ポリペプチド、あるいは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異 P D - L 1 ポリペプチドであって、アミノ酸 38 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 38 が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、もしくは G l u であるか、アミノ酸 38 が、A l a、G l y、V a l、L e u、もしくは I l e であるか、アミノ酸 38 が、A s p もしくは G l u であるか、またはアミノ酸 38 が、A r g、H i s、もしくは L y s である変異 P D - L 1 ポリペプチド、及び i i) F c ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、i i) 2 M ポリペプチド、i i i) 本開示の第 1 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、i v) 本開示の第 2 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、及び v) 本開示の第 3 の変異 P D - L 1 ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、b) i) クラス I M H C 重鎖、及び i i) F c ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第 1 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、第 2 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、及び第 3 の変異 P D - L 1 ポリペプチドはそれぞれ、i) 図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸 56 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 56 が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、もしくは G l u であるか、アミノ酸 56 が、A l a、G l y、V a l、L e u、もしくは I l e であるか、アミノ酸 56 が、A s p もしくは G l u であるか、またはアミノ酸 56 が、A r g、H i s、もしくは L y s であるアミノ酸配列を含むか、あるいは i i) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸 38 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 38 が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、もしくは G l u であるか、アミノ酸 38 が、A l a、G l y、V a l、L e u、もしくは I l e であるか、アミノ酸 38 が、A s p もしくは G l u であるか、またはアミノ酸 38 が、A r g、H i s、もしくは L y s であるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及び i i) 2 M ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、b) i) 本開示の第 1 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、i i) 本開示の第 2 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、i i i) 本開示の第 3 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、i v) クラス I M H C 重鎖、及び v) F c ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第 1 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、第 2 の変異 P D - L 1 ポリペプチド、及び第 3 の変異 P D - L 1 ポリペプチドはそれぞれ、i) 図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸 56 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 56 が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、T r p、S e r、T h r、C y s、M e t、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p、もしくは G l u であるか、アミノ酸 56 が、A l a、G l y、V a l、L e u、もしくは I l e であるか、アミノ酸 56 が、A s p もしくは G l u であるか、またはアミノ酸 56 が、A r g、H i s、もしくは L y s であるアミノ酸配列を含むか、ある

10

20

30

40

50

いは i i) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸 38 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 38 が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくは Glu であるか、アミノ酸 38 が、Ala、Gly、Val、Leu、もしくは Ile であるか、アミノ酸 38 が、Asp もしくは Glu であるか、またはアミノ酸 38 が、Arg、His、もしくは Lys であるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及び i i) 2 M ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 1 のポリペプチドと、b) i) 本開示の第 1 の変異 PD - L 1 ポリペプチド、i i) リンカー、i i i) 本開示の第 2 の変異 PD - L 1 ポリペプチド、i v) リンカー、v) 本開示の第 3 の変異 PD - L 1 ポリペプチド、v i) クラス I MHC 重鎖、及び v i i) Fc ポリペプチドを N 末端から C 末端の順序で含む第 2 のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第 1 の変異 PD - L 1 ポリペプチド、第 2 の変異 PD - L 1 ポリペプチド、及び第 3 の変異 PD - L 1 ポリペプチドはそれぞれ、i) 図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸 56 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 56 が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくは Glu であるか、アミノ酸 56 が、Ala、Gly、Val、Leu、もしくは Ile であるか、アミノ酸 56 が、Asp もしくは Glu であるか、またはアミノ酸 56 が、Arg、His、もしくは Lys であるアミノ酸配列を含むか、あるいは i i) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸 38 が、チロシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 38 が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくは Glu であるか、アミノ酸 38 が、Ala、Gly、Val、Leu、もしくは Ile であるか、アミノ酸 38 が、Asp もしくは Glu であるか、またはアミノ酸 38 が、Arg、His、もしくは Lys であるアミノ酸配列を含む。場合によっては、リンカーは、(GSSSS)_n という配列 (n は、1、2、3、4、または 5 である) を含む。場合によっては、n は、4 である。場合によっては、n は、5 である。

【0170】

G119 の置換

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、i i) 2 M ポリペプチド、及び i i i) 図 2 B に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異 PD - L 1 ポリペプチドであって、アミノ酸 119 が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸 119 が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくは Glu であるか、アミノ酸 119 が、Ala、Val、Leu、もしくは Ile であるか、アミノ酸 119 が、Arg、His、もしくは Lys であるか、またはアミノ酸 119 が、Glu もしくは Asp である変異 PD - L 1 ポリペプチド、あるいは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有する

アミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸101が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸101が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸101が、GluもしくはAspである変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びii) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸119が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸119が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸119が、GluもしくはAspである変異PD-L1ポリペプチド、あるいは配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異PD-L1ポリペプチドであって、アミノ酸101が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸101が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸101が、GluもしくはAspである変異PD-L1ポリペプチド、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、ii) 2Mポリペプチド、iii) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、iv) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、及びv) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) クラスI MHC重鎖、及びii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸119が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸119が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸119が、GluもしくはAspであるアミノ酸配列を含むか、あるいはii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸101が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Ar

g、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸101が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸101が、GluもしくはAspであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びii) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、ii) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、iii) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、iv) クラスI MHC重鎖、及びv) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸119が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸119が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸119が、GluもしくはAspであるアミノ酸配列を含むか、あるいはii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸101が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸101が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸101が、GluもしくはAspであるアミノ酸配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドは、a) i) エピトープ、及びii) 2MポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第1のポリペプチドと、b) i) 本開示の第1の変異PD-L1ポリペプチド、ii) リンカー、iii) 本開示の第2の変異PD-L1ポリペプチド、iv) リンカー、v) 本開示の第3の変異PD-L1ポリペプチド、vi) クラスI MHC重鎖、及びvii) FcポリペプチドをN末端からC末端の順序で含む第2のポリペプチドと、を含む。場合によっては、第1の変異PD-L1ポリペプチド、第2の変異PD-L1ポリペプチド、及び第3の変異PD-L1ポリペプチドはそれぞれ、i) 図2Bに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸119が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸119が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸119が、Arg、His、もしくはLysであるか、またはアミノ酸119が、GluもしくはAspであるアミノ酸配列を含むか、あるいはii) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸101が、グリシン以外のアミノ酸であり、例えば、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp、もしくはGluであるか、アミノ酸101が、Ala、Val、Leu、もしくはIleであるか、アミノ酸101が、Arg、His、もしくはLysであ

るか、またはアミノ酸 1 0 1 が、G l u もしくは A s p であるアミノ酸配列を含む。場合によっては、リンカーは、(G S S S S)_n という配列 (n は、1、2、3、4、または 5 である) を含む。場合によっては、n は、4 である。場合によっては、n は、5 である。

【 0 1 7 1 】

上記の実施形態のいずれかでは、多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 1 0 または図 1 1 に示されるうちの 1 つのアミノ酸の置換を含み得る。例としては、下記のもの挙げられる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の D 2 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の D 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の T 3 7 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の T 1 9 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の D 4 9 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の D 3 1 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の L 5 3 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の L 3 5 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の I 5 4 (マウス P D - L 1 では V 5 4) の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の I 3 6 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Y 5 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の Y 3 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Y 5 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の Y 3 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Q 6 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の Q 4 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Q 6 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の Q 4 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の E 7 2 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の E 5 4 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の M 1 1 5 (マウス P D - L 1 の I 1 1 5) の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の M 9 7 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の I 1 1 6 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の I 9 8 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の G 1 1 9 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の G 1 0 1 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の G 1 2 0 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の G 1 0 2 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の G 1 2 0 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の G 1 0 2 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の A 1 2 1 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の A 1 0 3 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の D 1 2 2 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の D 1 0 4 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の Y 1 2 3 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列の Y 1 0 5 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の K 1 2 4 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の K 1 0 6 の置換を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する変異 P D - L 1 ポリペプチドは、図 2 B に示されるアミノ酸配列の R 1 2 5 の置換、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の K 1 0 7 の置換を含む。

【 0 1 7 2 】

核酸

本開示は、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本開示は、本開示の P D - L 1 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

10

【 0 1 7 3 】

本開示は、本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの個々のポリペプチド鎖は、別々の核酸にコードされる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドのすべてのポリペプチド鎖は、単一の核酸にコードされる。場合によっては、第 1 の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、第 2 の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。場合によっては、単一の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチド及び本開示の多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 1 7 4 】

多量体ポリペプチドの個々のポリペプチド鎖をコードする別々の核酸

本開示は、本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。上記のように、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの個々のポリペプチド鎖は、別々の核酸にコードされる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの別々のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素、例えば、真核細胞で機能的なプロモーターなどのプロモーターに作動可能に連結され、ここでは、プロモーターは構成的プロモーターでもよいし、誘導性プロモーターでもよい。したがって、本開示は、第 1 の核酸及び第 2 の核酸を含む組成物を提供し、第 1 の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、第 2 の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 1 7 5 】

本開示は、第 1 の核酸及び第 2 の核酸を提供し、ここでは、第 1 の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、a) エピトープ (例えば、T 細胞エピトープ)、b) 第 1 の M H C ポリペプチド、及び c) 免疫調節ポリペプチド (例えば、本開示の変異 P D - L 1 ポリペプチド) を含み、第 2 の核酸は本開示の多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、a) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び b) I g F c ポリペプチドを含む。適切な T 細胞エピトープ、M H C ポリペプチド、免疫調節ポリペプチド及び I g F c ポリペプチドは既に記載されている。場合によっては、第 1 及び第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素に作動可能に連結される。場合によっては、転写制御要素は真核細胞で機能的なプロモーターである。場合によっては、核酸は別々の発現ベクター中に存在する。

40

【 0 1 7 6 】

本開示は、第 1 の核酸及び第 2 の核酸を提供し、ここでは、第 1 の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、a) エピトープ (例えば、T 細胞エピトープ)

50

、及びb)第1のMHCポリペプチドを含み、第2の核酸は、本開示の多量体ポリペプチドの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、第2のポリペプチドは、N末端からC末端の順に、a)免疫調節ポリペプチド(例えば、本開示の変異PD-L1ポリペプチド)、b)第2のMHCポリペプチド、及びc)IgFcポリペプチドを含む。適切なT細胞エпитープ、MHCポリペプチド、変異PD-L1免疫調節ポリペプチド及びIgFcポリペプチドは既に記載されている。場合によっては、第1及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素に作動可能に連結される。場合によっては、転写制御要素は真核細胞で機能的なプロモーターである。場合によっては、核酸は別々の発現ベクター中に存在する。

【0177】

多量体ポリペプチド中に存在する2つ以上のポリペプチドをコードする核酸

本開示は、少なくとも本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドが、第1、第2及び第3のポリペプチドを含む場合は、核酸は、第1、第2及び第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に挿入された、タンパク分解により切断可能なリンカーを含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に挿入された配列内リボソーム進入部位(IRES)を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に挿入されたりリボソームスキッピングシグナル(またはシス作用性ヒドロラーゼ要素、CHYSEL)を含む。核酸の例は以下に記載され、ここでは、タンパク分解により切断可能なリンカーは、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとをコードするヌクレオチド配列の間に提供され、これらの実施形態のうちのいずれかでは、タンパク分解により切断可能なリンカーをコードするヌクレオチド配列の代わりに、IRESまたはリボソームスキッピングシグナルを使用することができる。

【0178】

場合によっては、第1の核酸(例えば、組換え発現ベクター、mRNA、ウイルスRNAなど)は、本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、第2の核酸(例えば、組換え発現ベクター、mRNA、ウイルスRNAなど)は、本開示の多量体ポリペプチドの第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。場合によっては、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及び第2のポリペプチドをコードする第2のヌクレオチド配列は、それぞれ、転写制御要素、例えば、真核細胞で機能的なプロモーターなどのプロモーターに作動可能に連結され、ここでは、プロモーターは構成的プロモーターでもよいし、誘導性プロモーターでもよい。

【0179】

本開示は、組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、ここでは、組換えポリペプチドは、N末端からC末端の順に、a)エピトープ(例えば、T細胞エピトープ)、b)第1のMHCポリペプチド、c)免疫調節ポリペプチド(例えば、本開示の変異PD-L1ポリペプチド)、d)タンパク分解により切断可能なリンカー、e)第2のMHCポリペプチド、及びf)免疫グロブリン(Ig)Fcポリペプチドを含む。本開示は、組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、ここでは、組換えポリペプチドは、N末端からC末端の順に、a)第1のリーダーペプチド、b)エピトープ、c)第1のMHCポリペプチド、d)免疫調節ポリペプチド(例えば、本開示の変異PD-L1ポリペプチド)、e)タンパク分解により切断可能なリン

10

20

30

40

50

カー、f) 第2のリーダーペプチド、g) 第2のMHCポリペプチド、及びh) Ig Fcポリペプチドを含む。本開示は、組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、ここでは、組換えポリペプチドは、N末端からC末端の順に、a) エピトープ、b) 第1のMHCポリペプチド、c) タンパク分解により切断可能なリンカー、d) 免疫調節ポリペプチド(例えば、本開示の変異PD-L1ポリペプチド)、e) 第2のMHCポリペプチド、及びf) Ig Fcポリペプチドを含む。場合によっては、第1のリーダーペプチド及び第2のリーダーペプチドは2-Mリーダーペプチドである。場合によっては、ヌクレオチド配列は転写制御要素に作動可能に連結される。場合によっては、転写制御要素は真核細胞で機能的なプロモーターである。

【0180】

適切なMHCポリペプチドは既に記載されている。場合によっては、第1のMHCポリペプチドは2-ミクログロブリンポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドはMHCクラスI重鎖ポリペプチドである。場合によっては、2-ミクログロブリンポリペプチドは、図6に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、MHCクラスI重鎖ポリペプチドは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-KまたはHLA-L重鎖である。場合によっては、MHCクラスI重鎖ポリペプチドは、図5A~Cのうちの1つに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、第1のMHCポリペプチドはMHCクラスIIアルファ鎖ポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドはMHCクラスIIベータ鎖ポリペプチドである。

【0181】

適切なFcポリペプチドは既に記載されている。場合によっては、Ig Fcポリペプチドは、IgG1 Fcポリペプチド、IgG2 Fcポリペプチド、IgG3 Fcポリペプチド、IgG4 Fcポリペプチド、IgA FcポリペプチドまたはIgM Fcポリペプチドである。場合によっては、Ig Fcポリペプチドは、図4A~4Cに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0182】

適切な変異PD-L1免疫調節ポリペプチドは既に記載されている。

【0183】

タンパク分解により切断可能な適切なリンカーは既に記載されている。場合によっては、タンパク分解により切断可能なリンカーは、a) LEVLFQGP(配列番号34)、b) ENLYTQS(配列番号35)、c) DDDDK(配列番号36)、d) LVPR(配列番号37)、及びe) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(配列番号38)から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0184】

場合によっては、エピトープと第1のMHCポリペプチドとの間のリンカーは第1のCys残基を含み、第2のMHCポリペプチドは、第2のCys残基をもたらしようにアミノ酸置換を含み、その結果、第1及び第2のCys残基がリンカーと第2のMHCポリペプチドとの間にジスルフィド結合をもたらし。場合によっては、第1のMHCポリペプチドは第1のCys残基をもたらしようにアミノ酸置換を含み、第2のMHCポリペプチドは第2のCys残基をもたらしようにアミノ酸置換を含み、その結果、第1のCys残基及び第2のCys残基が、第1のMHCポリペプチドと第2のMHCポリペプチドとの間にジスルフィド結合をもたらし。

【0185】

組換え発現ベクター

本開示は、本開示の核酸を含む組換え発現ベクターを提供する。場合によっては、組換

え発現ベクターは非ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換え発現ベクターはウイルスコンストラクト、例えば、組換えアデノ随伴ウイルスコンストラクト（例えば、米国特許第7,078,387号を参照されたい）、組換えアデノウイルスコンストラクト、組換えレンチウイルスコンストラクト、組換えレトロウイルスコンストラクト、非組込みウイルスベクターなどである。

【0186】

適切な発現ベクターとしては、限定されないが、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543-2549, 1994、Borras et al., Gene Ther 6:515-524, 1999、Li and Davidson, PNAS 92:7700-7704, 1995、Sakamoto et al., Hum Gene Ther 5:1088-1097, 1999、WO94/12649、WO93/03769、WO93/19191、WO94/28938、WO95/11984及びWO95/00655を参照されたい）、アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9:81-86, 1998、Flannery et al., PNAS 94:6916-6921, 1997、Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857-2863, 1997、Jomary et al., Gene Ther 4:683-690, 1997、Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641-648, 1999、Ali et al., Hum Mol Genet 5:591-594, 1996、Srivastava in WO93/09239、Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828、Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165、及びFlotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617を参照されたい）、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., PNAS 94:10319-10323, 1997、Takahashi et al., J. Virol 73:7812-7816, 1999を参照されたい）に基づくウイルスベクター）、レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス及び乳房腫瘍ウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクター）などが挙げられる。

【0187】

多数の適切な発現ベクターが当業者に既知であり、多くが市販されている。例として、以下のベクターが提供される。真核宿主細胞用：pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG及びpSVLSV40 (Pharmacia)。しかし、宿主細胞に適合さえすれば、任意の他のベクターを使用することができる。

【0188】

利用する宿主/ベクター系に応じて、構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネータなどを含めたいくつかの適切な転写及び翻訳制御要素を発現ベクターで使用する（例えば、Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544を参照されたい）。

【0189】

いくつかの実施形態では、DNA標的化RNA及び/または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、制御要素、例えば、プロモーターなどの転写制御要素に作動可能に連結される。転写制御要素は、真核細胞、例えば哺乳類細胞、または原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）のいずれかで機能的であり得る。いくつかの実施形態では、DNA標的化RNA及び/または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、DNA標的化RNA及び/または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を原核細胞及び真核細胞の両方で可能にする複数の制

御要素に作動可能に連結される。

【0190】

適切な真核性プロモーター（真核細胞で機能的なプロモーター）の非限定例としては、サイトメガロウイルス（CMV）最初期、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ、初期及び後期SV40、レトロウイルスのロングターミナルリピート（LTR）ならびにマウスメタロチオネイン-I由来のものが挙げられる。適切なベクター及びプロモーターの選択は、十分に当技術分野の通常の技能のレベル内である。発現ベクターは、翻訳開始のためのリボソーム結合部位及び転写ターミネータも含むことができる。発現ベクターは、発現を増幅するための適切な配列を含むこともできる。

【0191】

遺伝子改変宿主細胞

本開示は、宿主細胞が本開示の核酸で遺伝子改変されている、遺伝子改変宿主細胞を提供する。

【0192】

適切な宿主細胞としては、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞などの真核細胞が挙げられる。場合によっては、宿主細胞は哺乳類細胞株の細胞である。適切な哺乳類細胞株としては、ヒト細胞株、非ヒト霊長類細胞株、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）細胞株などが挙げられる。適切な哺乳類細胞株としては、限定されないが、HeLa細胞（例えば、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）番号CCL-2）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、ATCC番号CRL9618、CCL61、CRL9096）、293細胞（例えば、ATCC番号CRL-1573）、ベロ細胞、NIH3T3細胞（例えば、ATCC番号CRL-1658）、Huh-7細胞、BHK細胞（例えば、ATCC番号CCL10）、PC12細胞（ATCC番号CRL1721）、COS細胞、COS-7細胞（ATCC番号CRL1651）、RAT1細胞、マウスL細胞（ATCC番号CCLI-3）、ヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞（ATCC番号CRL1573）、HLHepG2細胞などが挙げられる。

【0193】

場合によっては、宿主細胞は、内生のMHC 2-Mを合成しないように遺伝子改変された哺乳類細胞である。

【0194】

多量体ポリペプチドの生成方法

本開示は、本開示の多量体ポリペプチドの生成方法を提供する。この方法は、一般に、多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターで遺伝子改変されている宿主細胞を培養培地で培養すること、ならびに遺伝子改変宿主細胞及び/または培養培地から多量体ポリペプチドを単離することを含む。多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターで遺伝子改変されている宿主細胞は、「発現宿主」とも称される。上記のように、場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの個々のポリペプチド鎖は、別々の組換え発現ベクターにコードされる。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドのすべてのポリペプチド鎖は、単一の組換え発現ベクターにコードされる。

【0195】

発現宿主細胞（例えば、発現宿主細胞のライセート）及び/または宿主細胞が培養される培養培地からの多量体ポリペプチドの単離は、タンパク質精製の標準的な方法を使用し行うことができる。

【0196】

例えば、ライセートを発現宿主から調製することができ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーまたは他の精製技法を使用してライセートを精製することができる。あるいは、多量体ポリペプチドが発現宿主細胞から培養培地中に分泌される場合は、HPLC、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーまたは他の精製技法

10

20

30

40

50

を使用して、多量体ポリペプチドを培養培地から精製することができる。場合によっては、使用される組成物は、生成物の調製及びその精製の方法と関係がある混入物と比べて、少なくとも80重量%、少なくとも約85重量%、少なくとも約95重量%または少なくとも約99.5重量%の所望の生成物を含む。パーセンテージは総タンパク質に基づき得る。

【0197】

場合によっては、例えば、多量体ポリペプチドが親和性タグを含む場合は、親和性タグの固定化された結合パートナーを使用して、多量体ポリペプチドを精製することができる。

【0198】

組成物

本開示は、医薬組成物を含めて、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む組成物を提供する。本開示は、医薬組成物を含めて、本開示の多量体ポリペプチドを含む組成物を提供する。本開示は、医薬組成物を含めて、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含む組成物を提供する。

【0199】

多量体ポリペプチドを含む組成物

本開示の組成物は、本開示の多量体ポリペプチドに加えて、以下の1つまたは複数を含むことができる：塩、例えば、NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄など、緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)など、可溶化剤、デタージェント、例えば、非イオン性デタージェント、例えばTween-20など、プロテアーゼ阻害剤、グリセロールなど。

【0200】

組成物は、医薬的に許容可能な賦形剤を含むことができ、様々な医薬的に許容可能な賦形剤が当技術分野で既知であり、本明細書で詳細に論じる必要はない。医薬的に許容可能な賦形剤は、例えば、“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 19th Ed. (1995)または最新版、Mack Publishing Co、A. Gennaro (2000) “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins、及びHandbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assocを含めた、様々な刊行物で十分に記載されている。

【0201】

医薬組成物は、本開示の多量体ポリペプチド及び医薬的に許容可能な賦形剤を含むことができる。場合によっては、対象の医薬組成物は対象への投与に適しており、例えば、無菌である。例えば、いくつかの実施形態では、対象の医薬組成物はヒト対象への投与に適しており、例えば、ここでは、組成物は無菌であり、検出可能な発熱物質及び/または他の毒素を含んでいない。

【0202】

タンパク質組成物は、他の成分、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカン、セルロース

10

20

30

40

50

、グルコース、ショ糖、マグネシウム、カーボネートなどを含むことができる。組成物は、生理的条件下に近づけるために必要とされる医薬的に許容可能な補助物質、例えば、pH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、塩酸塩、硫酸塩、溶媒和化合物（例えば、混合イオン性塩、水、有機物）、水和物（例えば、水）などを含むことができる。

【0203】

例えば、組成物は、水溶液、粉体、顆粒、錠剤、丸剤、坐剤、カプセル、懸濁液、スプレーなどを含むことができる。組成物は、以下に記載の様々な投与経路に応じて製剤化することができる。

【0204】

本開示の多量体ポリペプチドが（例えば、皮下に、腹腔内に、筋肉内に、及び/または静脈内に）直接的に組織に注射剤として投与される場合、製剤は、すぐに使える剤形として、または非水性形態（例えば、再構成可能な貯蔵安定性粉末剤）または水性形態、例えば、医薬的に許容可能な担体及び賦形剤から構成される液剤として、提供することができる。タンパク質含有製剤は、投与後に対象タンパク質の血清半減期を延ばすように提供することもできる。例えば、タンパク質は、コロイドとして調製されたりリボソーム製剤、または血清半減期を延ばすための他の従来の技法で提供することができる。例えば、Szoka et al., 1980 Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467、米国特許第4,235,871号、第4,501,728号及び第4,837,028号に記載されているように、リボソームを調製するために様々な方法が利用可能である。制御放出形態または徐放性形態で調製物を提供することもできる。

【0205】

非経口投与に適した製剤の他の例としては、等張無菌注射液、抗酸化剤、静菌薬及び製剤を目的のレシピエントの血液と等張にする溶質、懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤及び防腐剤が挙げられる。例えば、対象の医薬組成物は、容器、例えば無菌容器、例えば注射器中に存在していてもよい。製剤は、単位用量または多用量の密閉容器、例えば、アンプル及びバイアル中に提供することができ、注射のために無菌液体賦形剤、例えば水を使用直前に添加することしか必要としないフリーズドライ（凍結乾燥）状態で貯蔵することができる。即時の注射液及び懸濁液は、無菌の粉末剤、顆粒剤及び錠剤から調製することができる。

【0206】

製剤中の本開示の多量体ポリペプチドの濃度は、広範に変動する（例えば、重量基準で、約0.1%未満（通常、約2%または少なくとも2%）～20%から50%程度またはそれ以上）可能性があり、選択される特定の投与様式及び患者の要求に従って、主として流体量、粘性及び患者に基づく因子を基に通常選択される。

【0207】

本開示は、本開示の組成物、例えば液体組成物を含む容器を提供する。容器は、例えば、注射器、アンプルなどでもよい。場合によっては、容器は無菌である。場合によっては、容器と組成物との両方が無菌である。

【0208】

本開示は、医薬組成物を含めて、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む組成物を提供する。組成物は、a)本開示の変異PD-L1ポリペプチド、及びb)多量体ポリペプチドについて上述した賦形剤を含むことができる。場合によっては、賦形剤は医薬的に許容可能な賦形剤である。

【0209】

核酸または組換え発現ベクターを含む組成物

本開示は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含む組成物、例えば医薬組成物を提供する。多種多様の医薬的に許容可能な賦形剤が当技術分野で既知であり、本明細書で詳細に論じる必要はない。医薬的に許容可能な賦形剤は、例えば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice

10

20

30

40

50

of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins, 及び Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assocを含めた、様々な刊行物に十分に記載されている。

【0210】

本開示の組成物は、a) 対象の核酸または組換え発現ベクター、及びb) 緩衝液、界面活性剤、抗酸化剤、親水性ポリマー、デキストリン、キレート剤、懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、静菌剤、湿潤剤及び防腐剤の1つまたは複数を含むことができる。適切な緩衝液としては、限定されないが、(例えば、N, N - ビス(2 - ヒドロキシエチル) - 2 - アミノエタンスルホン酸(BES)、ビス(2 - ヒドロキシエチル)アミノ - トリス(ヒドロキシメチル)メタン(ビス - トリス)、N - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - N' 3 - プロパンスルホン酸(EPFSまたはHEPFS)、グリシルグリシン、N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - 2 - エタンスルホン酸(HEPES)、3 - (N - モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン - N, N' - ビス(2 - エタン - スルホン酸)(PIPES)、炭酸水素ナトリウム、3 - (N - トリス(ヒドロキシメチル) - メチル - アミノ) - 2 - ヒドロキシ - プロパンスルホン酸)TAPSO、(N - トリス(ヒドロキシメチル)メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸(TES)、N - トリス(ヒドロキシメチル)メチル - グリシン(トリシン)、トリス(ヒドロキシメチル) - アミノメタン(トリス)など)が挙げられる。適切な塩としては、例えば、NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄などが挙げられる。

【0211】

本開示の医薬製剤は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを約0.001% ~ 約90%(w/w)の量で含むことができる。以下の製剤の説明では、「対象の核酸または組換え発現ベクター」は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含むと理解される。例えば、いくつかの実施形態では、対象の製剤は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含む。

【0212】

対象の核酸または組換え発現ベクターを、他の化合物または化合物の混合物と混合する、カプセル化する、コンジュゲートするまたは結合させることができ、そのような化合物としては、例えば、リボソームまたは受容体標的分子を挙げることができる。対象の核酸または組換え発現ベクターを、取込み、分配及び/または吸収を助ける1種または複数の成分と製剤中で組み合わせることができる。

【0213】

対象の核酸または組換え発現ベクターの組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、軟質ゲル剤、坐剤及び浣腸剤などの多くの考えられる剤形のうちのいずれかに製剤化することができる。対象の核酸または組換え発現ベクターの組成物は、水性、非水性または混合媒体の懸濁剤として製剤化することもできる。水性懸濁剤は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール及び/またはデキストランを含めた、懸濁剤の粘性を高める物質をさらに含むことができる。懸濁剤は、安定化剤を含むこともできる。

【0214】

対象の核酸または組換え発現ベクターを含む製剤は、リボソーム製剤でもよい。本明細書で使用する場合、用語「リボソーム」は、球状の二重層(複数可)に配置された両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リボソームは、親油性材料から形成される膜及び送達される組成物を含む水性の内部を有する、単層または多層状の小胞である。陽イオン性リボソームは、負に荷電したDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成することが

できる、正に荷電したリボソームである。pH感受性であるまたは負に荷電したリボソームは、DNAとの複合体化ではなく、DNAを封入すると考えられている。陽イオン性及び非陽イオン性リボソームの両方を、対象の核酸または組換え発現ベクターを送達するために使用することができる。

【0215】

リボソームは「立体的に安定化した」リボソームも含み、本明細書で使用する場合、この用語は、リボソームに組み込まれた場合に、特殊化した脂質を欠くリボソームと比較して循環寿命を高める1種または複数種の特殊化した脂質を含むリボソームを指す。立体的に安定化したリボソームの例は、リボソームの小胞形成脂質部分の一部が1種または複数種の糖脂質を含むか、ポリエチレングリコール(PEG)部分などの1種または複数種の親水性ポリマーで誘導体化されているものである。リボソーム及びその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0216】

本開示の製剤及び組成物は界面活性剤を含むこともできる。薬物製品、製剤及び乳剤における界面活性剤の使用は当技術分野で周知である。界面活性剤及びその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。

【0217】

一実施形態では、核酸の効率的な送達をもたらすために、様々な浸透促進剤が含まれる。細胞膜を超えて非親油性薬物が拡散するのを助けることに加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も高める。浸透促進剤は、5つの広いカテゴリー、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤及び非キレート化非界面活性剤のうちの1つに属するように分類され得る。浸透促進剤及びその使用は米国特許第6,287,860号にさらに記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0218】

経口投与用の組成物及び製剤としては、粉末剤もしくは顆粒剤、マイクロ粒子剤、ナノ粒子剤、水もしくは非水性媒体中の懸濁剤もしくは溶液剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、サッシェ剤、錠剤またはミニ錠剤が挙げられる。増粘剤、着香剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が望ましい場合もある。適切な経口製剤としては、対象のアンチセンス核酸が、1種または複数の浸透促進剤、界面活性剤及びキレート剤とともに投与されるものが挙げられる。適切な界面活性剤としては、限定されないが、脂肪酸及び/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸及び/またはその塩が挙げられる。適切な胆汁酸/塩及び脂肪酸ならびにその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。浸透促進剤の組み合わせ、例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩も適切である。例示的な適切な組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸及びUDCAのナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤としては、限定されないが、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル及びポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる。適切な浸透促進剤としては、プロピレングリコール、ジメチルスルホキシド、トリエタノールアミン、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミド、2-ピロリドン及びそれらの誘導体、テトラヒドロフルフリルアルコールならびにAZONE(商標)も挙げられる。

30

40

【0219】

治療方法

本発明は、個体においてエピトープ特異的T細胞の活性を選択的に調節する方法を提供し、この方法は、個体においてエピトープ特異的T細胞の活性を選択的に調節するために有効な量の本開示の多量体ポリペプチドまたは多量体ポリペプチドをコードする1種または複数の核酸を個体に投与することを含む。場合によっては、本開示の治療方法は、本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む1種または複数の組換え発現ベクターをそれらを必要とする個体に投与することを含む。場合によっては、本開示の治療方法は、本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む1種また

50

は複数の mRNA 分子をそれらを必要とする個体に投与することを含む。場合によっては、本開示の治療方法は、本開示の多量体ポリペプチドをそれらを必要とする個体に投与することを含む。

【0220】

本開示は、個体においてエピトープ特異的 T 細胞の活性を選択的に調節する方法を提供し、この方法は、有効量の、本開示の多量体ポリペプチドまたは多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む 1 種もしくは複数の核酸（例えば、発現ベクター、mRNA など）を個体に投与することを含み、ここでは、多量体ポリペプチドは、個体においてエピトープ特異的 T 細胞の活性を選択的に調節する。エピトープ特異的 T 細胞の活性を選択的に調節することは、個体において疾患または障害を治療することができる。したがって、本開示は、有効量の本開示の多量体ポリペプチドをそれらを必要とする個体に投与することを含む治療方法を提供する。

10

【0221】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する免疫調節ポリペプチド（例えば、本開示の変異 PD-L1 ポリペプチド）は抑制ポリペプチドであり、変異 PD-L1 ポリペプチドを含む多量体ポリペプチドは、エピトープ特異的 T 細胞の活性を抑制する。場合によっては、エピトープは、自己エピトープであり、多量体ポリペプチドは、自己エピトープに特異的な T 細胞の活性を選択的に抑制する。

【0222】

本開示は、個体において自己免疫障害を治療する方法を提供し、この方法は、有効量の、本開示の多量体ポリペプチドまたは多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む 1 種もしくは複数の核酸を個体に投与することを含み、ここでは、多量体ポリペプチドは自己エピトープである T 細胞エピトープを含み、多量体ポリペプチドは、本開示の変異 PD-L1 ポリペプチドを含む。場合によっては、多量体ポリペプチドの「有効量」は、それらを必要とする個体に 1 または複数用量で投与される場合に、多量体ポリペプチドの投与前の、または多量体ポリペプチドを用いる投与がない状態の個体における自己反応性 T 細胞の数及び / または活性と比較して、自己反応性 T 細胞の数及び / または活性を少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % 減らす量である。場合によっては、多量体ポリペプチドの「有効量」は、それらを必要とする個体に 1 または複数用量で投与される場合に、個体において Th2 サイトカインの生成を低減させる量である。場合によっては、多量体ポリペプチドの「有効量」は、それらを必要とする個体に 1 または複数用量で投与される場合に、個体において自己免疫疾患に付随する 1 つまたは複数の症状を回復させる量である。

20

30

【0223】

本開示の方法での治療に適した自己免疫障害としては、限定されないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性の卵巣炎及び精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー - 皮膚炎、慢性疲労免疫不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャージ・ストラウス症候群、癰痕性類天疱瘡、CREST 症候群（限定された皮膚型の全身性硬化症としても知られる）、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、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）、過敏性腸疾患（irritable bowel disease）（IBD）、IGA ニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1 型糖尿病、重症筋無力症、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、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎及び皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、

40

50

ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、ステイフ・マン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎（疱疹状皮膚炎血管炎（dermatitis herpetiformis vasculitis）など）、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症が挙げられる。

【0224】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドに存在する免疫調節ポリペプチド（例えば、本開示の変異PD-L1ポリペプチド）は抑制ポリペプチドであり、変異PD-L1ポリペプチドを含む多量体ポリペプチドは、エピトープ特異的T細胞の活性を抑制する。場合によっては、エピトープは、同種移植片（例えば、皮膚同種移植片、肝臓同種移植片、腎臓同種移植片、心臓同種移植片、骨同種移植片、軟骨同種移植片、肺同種移植片、細胞同種移植片（例えば、骨髄同種移植片）など）に存在するエピトープであり、多量体ポリペプチドは、同種移植片に存在する抗原に特異的なT細胞の活性を選択的に抑制する。

【0225】

本開示は、個体における同種移植片拒絶の抑制方法を提供し、方法は、個体（例えば、同種移植片のレシピエントである個体、または間もなく同種移植片のレシピエントになる個体）に対して、本開示の多量体ポリペプチド、または多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む1つもしくは複数の核酸を有効量で投与することを含み、多量体ポリペプチドは、同種移植片に存在するエピトープであるT細胞エピトープを含むと共に、多量体ポリペプチドは、本開示の変異PD-L1ポリペプチドを含む。場合によっては、多量体ポリペプチドの「有効量」は、それを必要とする個体に1つまたは複数の用量で投与されると、多量体ポリペプチドの投与前の個体、または多量体ポリペプチドが投与されない個体におけるアロ反応性（同種移植片反応性）のT細胞の数及び／または活性と比較して、アロ反応性（同種移植片反応性）のT細胞の数及び／または活性を少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%低減する量である。場合によっては、多量体ポリペプチドの「有効量」は、それを必要とする個体に1つまたは複数の用量で投与されると、個体における同種移植片の生存期間を延ばす量であり、例えば、個体における同種移植片の生存期間は、多量体ポリペプチドが投与されない個体における同種移植片の生存期間と比較して、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、または少なくとも100倍延びる。場合によっては、多量体ポリペプチドの「有効量」は、それを必要とする個体に1つまたは複数の用量で投与されると、個体における同種移植片拒絶と関連する1つまたは複数の症状を寛解させる量である。

【0226】

上記のように、場合によっては、対象の治療方法の実施において、本開示の多量体ポリペプチドは、それ自体がポリペプチドとしてそれらを必要とする個体に投与される。他の場合では、対象の治療方法の実施において、本開示の多量体ポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列を含む核酸がそれらを必要とする個体に投与される。したがって、他の場合では、本開示の1種または複数の核酸、例えば、本開示の1種または複数の組換え発現ベクターがそれらを必要とする個体に投与される。

【0227】

製剤

適切な製剤は既に記載されており、適切な製剤は医薬的に許容可能な賦形剤を含む。場合によっては、適切な製剤は、a) 本開示の多量体ポリペプチド、及びb) 医薬的に許容可能な賦形剤を含む。場合によっては、適切な製剤は、a) 本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及びb) 医薬的に許容可能な賦形剤を含み、ある場合には、核酸はmRNAである。場合によっては、適切な製剤は、a) 本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸

、b) 本開示の多量体ポリペプチドの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸、及びc) 医薬的に許容可能な賦形剤を含む。場合によっては、適切な製剤は、a) 本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター、及びb) 医薬的に許容可能な賦形剤を含む。場合によっては、適切な製剤は、a) 本開示の多量体ポリペプチドの第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の組換え発現ベクター、b) 本開示の多量体ポリペプチドの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の組換え発現ベクター、及びc) 医薬的に許容可能な賦形剤を含む。

【0228】

医薬的に許容可能な適切な賦形剤は既に記載されている。

10

【0229】

投薬量

適切な投薬量は、様々な臨床因子に基づいて、主治医または資格を有する他の医療関係者が決定することができる。医学分野で周知であるように、任意のある患者に対する投薬量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定のポリペプチドまたは核酸、患者の性別、投与の時間及び経路、全体的な健康状態ならびに同時に投与される他の薬物を含めた、多くの因子に依存する。本開示の多量体ポリペプチドは、投与あたり $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重 $\sim 20 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、例えば、 $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 $\sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、例えば、 $0.5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 $\sim 5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の間の量で投与することができるが、特に前述した因子を考慮すれば、この例示的範囲より低いまたは高い用量が想定される。レジメンが持続注入である場合は、これはまた、 $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg} / \text{キログラム体重} / \text{分}$ の範囲でもよい。

20

【0230】

場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの適切な用量は、 $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{ g} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \mu\text{g} \sim 10 \text{ g} / \text{kg}$ 体重、 $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{ g} / \text{kg}$ 体重、 $10 \mu\text{g} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、 $100 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重または $100 \mu\text{g} \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重である。体液または組織における投与される薬剤の測定した滞留時間及び濃度に基づいて、当業者は投薬の反復速度を容易に推定することができる。成功した治療に続いて、病態の再発を予防するために、維持療法を患者に受けさせることが望ましい場合もあり、ここでは、本開示の多量体ポリペプチドは、 $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{ g} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \mu\text{g} \sim 10 \text{ g} / \text{kg}$ 体重、 $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{ g} / \text{kg}$ 体重、 $10 \mu\text{g} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、 $100 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重または $100 \mu\text{g} \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の範囲の維持量で投与される。

30

【0231】

当業者は、特定の多量体ポリペプチド、症状の重症度及び副作用に対する対象の感受性に応じて、用量レベルが変動し得ることを容易に認識するであろう。所与の化合物に対する好ましい投薬量は、様々な手段で当業者によって容易に決定される。

【0232】

いくつかの実施形態では、複数回用量の本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターが投与される。本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターの投与頻度は、様々な因子のうちのいずれか、例えば、症状の重症度などに応じて変動し得る。例えば、いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは、月1回、月2回、月3回、隔週 (q o w)、週1回 (q w)、週2回 (b i w)、週3回 (t i w)、週4回、週5回、週6回、隔日 (q o d)、1日1回 (q d)、1日2回 (q i d) または1日3回 (t i d) 投与される。

40

【0233】

本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターの投与の持続期間、例えば、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターが投与される期間は、様々な因子のうちのいずれか、例えば、患者の応答な

50

どに応じて変動し得る。例えば、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは、約 1 日～約 1 週、約 2 週～約 4 週、約 1 か月～約 2 か月、約 2 か月～約 4 か月、約 4 か月～約 6 か月、約 6 か月～約 8 か月、約 8 か月～約 1 年、約 1 年～約 2 年、または約 2 年～約 4 年、またはそれ以上に及ぶ期間にわたって投与することができる。

【0234】

投与経路

活性薬剤（本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクター）は、インビボ及びエキソビボの方法を含めた、薬物送達に適した任意の利用可能な方法及び経路、ならびに全身的及び局部的投与経路を使用して、個体に投与される。

10

【0235】

従来の医薬的に許容可能な投与経路としては、腫瘍内、腫瘍周囲、筋肉内、気管内、頭蓋内、皮下、皮内、局所適用、静脈内、動脈内、直腸、経鼻、経口ならびに他の経腸及び非経口投与経路が挙げられる。投与経路は、必要であれば、多量体ポリペプチド及び/または所望の効果に応じて、組み合わせることができ、または調整することができる。本開示の多量体ポリペプチドまたは本開示の核酸もしくは組換え発現ベクターは、単回用量または複数回用量で投与することができる。

【0236】

いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは筋肉内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは局部的に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは腫瘍内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは腫瘍周囲に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは頭蓋内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは皮下に投与される。

20

【0237】

いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチドは静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチドは筋肉内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチドは局部的に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチドは腫瘍内に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチドは腫瘍周囲に投与される。いくつかの実施形態では、本開示の多量体ポリペプチドは頭蓋内に投与される。いくつかの実施形態では、多量体ポリペプチドは皮下に投与される。

30

【0238】

本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターは、全身的または局部的経路を含めた、従来の薬物の送達に適した任意の利用可能な従来の方法及び経路を使用して、宿主に投与することができる。一般に、本発明が意図する投与経路としては、必ずしも限定されるわけではないが、経腸、非経口または吸入経路が挙げられる。

40

【0239】

吸入投与以外の非経口投与経路としては、必ずしも限定されるわけではないが、局所、経皮、皮下、筋肉内、眼窩内、嚢内、髄腔内、胸骨内、腫瘍内、腫瘍周囲及び静脈内経路、すなわち、消化管経路以外の任意の投与経路が挙げられる。非経口投与は、本開示の多量体ポリペプチド、本開示の核酸または本開示の組換え発現ベクターの全身的または局部的送達をもたらすために行うことができる。全身的送達が所望される場合は、投与は、典型的には、侵襲的または全身的に吸収される、医薬調製物の局所または粘膜投与を含む。

50

【0240】

治療に適する対象

本開示の方法による治療に適する対象としては、がんを有すると診断された個体、がんを治療したが、治療に応答することができなかった個体、及びがんを治療し、初期に応答したが、その後に治療に対して抵抗性になった個体を含めた、がんを有する個体が挙げられる。本開示の方法による治療に適する対象としては、感染を有すると診断された個体、及び感染を治療したが、治療に応答することができなかった個体を含めた、感染（例えば、病原体、例えば、細菌、ウイルス、原生動物などによる感染）を有する個体が挙げられる。本開示の方法による治療に適する対象としては、細菌感染を有すると診断された個体、及び細菌感染を治療したが、治療に応答することができなかった個体を含めた、細菌感染を有する個体が挙げられる。本開示の方法による治療に適する対象としては、ウイルス感染を有すると診断された個体、及びウイルス感染を治療したが、治療に応答することができなかった個体を含めた、ウイルス感染を有する個体が挙げられる。本開示の方法による治療に適する対象としては、自己免疫疾患を有すると診断された個体、及び自己免疫疾患を治療したが、治療に応答することができなかった個体を含めた、自己免疫疾患を有する個体が挙げられる。

10

【実施例】

【0241】

以下の実施例は、本発明の製造方法及び使用方法を当業者に完全に開示及び説明するために提供され、本発明者らが自身の発明であると見なすものの範囲を限定することを意図せず、また、以下の実験がすべての、または唯一の実施した実験であることを示すことも意図しない。使用される数字（例えば、量、温度など）に関して正確性を確実にするために努力したが、いくつかの実験上の誤差及び偏差は考慮されるべきである。別段指示がない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。標準的な省略形を使用することができ、例えば、b p、塩基対（複数可）：k b、キロベース（複数可）：p l、ピコリットル（複数可）：s またはs e c、秒（複数可）：m i n、分（複数可）：h またはh r、時間（複数可）：a a、アミノ酸（複数可）：k b、キロベース（複数可）：b p、塩基対（複数可）：n t、ヌクレオチド（複数可）：i . m .、筋肉内の（筋肉内に）：i . p .、腹腔内の（腹腔内に）：s . c .、皮下の（皮下に）などである。

20

30

【0242】

実施例1：PD-L1変異体の生成及び特徴付け

材料及び方法

PD-L1への変異導入

C l o n t e c h N 1 m C h e r r y ベクターのS a c I及びB a m H Iによる制限酵素部位にマウスの全長PD-L1をクローニングした。局在性及び発現レベルを改善するために、天然のリーダーペプチド配列をE P Oリーダーペプチド配列によって置き換えた。部位特異的変異導入は、フィデリティが高いK O Dポリメラーゼ、2 m Mのd N T P、及び4 m MのM g C l₂を使用して実施した。変異導入位置は、ヒトのPD-L1とPD-1とによって形成された複合体の結晶構造（P D B：3 B I K）に基づいて選択した。マウスPD-L1における、対応する表面接触可能位置は、ヒトPD-L1に対して配列アライメントをとることによって同定した（合計で36位置）。変異導入は、それぞれの選択位置がA l a残基、G l u残基、またはA r g残基に変異するように試みた。全体の変異導入成功率は約70%であり、位置によっては、すべての置換（A、E、及びR）は得られなかった。H E K 2 9 3細胞の浮遊液1 m Lを使用した一過性の遺伝子導入によって、配列検証済変異体の発現を試験した。その後、発現が野生型PD-L1と同等であり、膜局在化が正しく生じる変異体のみをマイクロアレイ及びF A C Sによる結合試験において利用し、その結果、アッセイに供するための60のPD-L1変異体を含む最終セットを得た。

40

【0243】

50

FACSによるマイクロビーズ結合アッセイ

PD-L1 mCherry変異コンストラクトをHEK293S細胞に一過性に遺伝子導入した後、プロテインAマイクロビーズ(Miltenyi)を負荷した。このプロテインAマイクロビーズは、PD-1 Fc融合体とFITC-Fcタンパク質とを4:1で含む混合物で事前に飽和させたものを使用した。Genentechによる以前の報告(16)に基づき、ビーズに対する総Fcタンパク質の比率は、マイクロビーズ10 μ L当たり5 μ gとした。FITC-Fcは、通常であれば非蛍光のマイクロビーズに緑色蛍光を与えるために使用した。各滴定実験について、10 μ gのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-Fcと、40 μ gのPD-1-Fcタンパク質またはB7-1-Fcタンパク質のいずれかと、を総体積5 mLの1 \times リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に含めた混合物を500 μ LのプロテインAマイクロビーズに負荷した。このビーズを4 $^{\circ}$ Cで一晩(約16時間)インキュベートした。負荷型ビーズを使用するまでの保管期間は、最大で2週間とした。最初の実験では、野生型PD-L1を遺伝子導入(遺伝子導入効率は、一貫して60~70%であった)した150,000個の細胞を飽和させるために十分な負荷型ビーズの量は75 μ Lであることを決定した。滴定実験については、HEK-293細胞の浮遊液1 mLを含む24ウェル組織培養プレートにおいて野生型及び変異したPD-L1コンストラクトのセットの遺伝子導入を行った。遺伝子導入から3日後に細胞の数を数え、2%のBSAを含む1 \times PBSで細胞を希釈して1 \times 10⁶ 個細胞/mLとした。150 K個の細胞(150 μ L)をエッペンドルフチューブに移し、2%のウシ血清アルブミン(BSA)を含む追加の1 \times PBS(100 μ L)と共に、負荷型マイクロビーズを75 μ L添加した。反応液を回転させて4 $^{\circ}$ Cで1時間混合した後、4 $^{\circ}$ C、6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を添加し、BD Aria IIサイトメーターでフローサイトメトリーを行うことによって試料を直ちに分析した。データ解析は、生細胞(DAPI陰性)を最初にゲートした後、mCherry陽性細胞(PD-L1発現)のゲートを行うことによって実施した。FITC陽性(マイクロビーズの結合)のmCherry陽性細胞の割合を「結合パーセント」として使用した。各実験について、結合パーセントは、野生型の結合に基準化した。

【0244】

組換えFc融合タンパク質の精製

mPD-L1 Fc融合タンパク質のクローニングを行うために、全長の野生型または変異したPD-L1の外部ドメイン(残基F19~R237)を、C末端にhisタグを有するFcドメイン(mIgG2a-10 \times His)を含むLICベクターにサブクローニングした。こうしたコンストラクト及びアイソトープ(isotope)のみの対照をHEK293細胞の浮遊液1 L中で一過性に発現させた。遺伝子導入から4日後、培地を収集し、50 mMのMESを添加してpHを調整し、100 mMのArg-Cl(pH7.6)を添加することで溶解性を改善した。その後、Fc融合体をNi²⁺-NTA樹脂(GE)で精製した。この精製は、バッチでの結合方法を使用した後、総体積10 mLの樹脂を詰めたガラスカラム(容積600 mL)で重量流を用いることによって行った。このNi²⁺-ニトロロ酢酸(nitroloacetic acid)(NTA)樹脂を100カラム体積の洗浄緩衝液(50 mMのMES(pH6.5)、100 mMのArg-Cl、5 mMのイミダゾール、150 mMのNaCl、10%のグリセロール)で洗浄し、500 mMのイミジゾール(immidizole)を含む同一の緩衝液で結合タンパク質を溶出させた。ニッケル樹脂からの溶出液を濃縮し、50 mMのMES(pH6.5)、100 mMのArg-Cl、150 mMのNaCl、10%のグリセロールにおいてS200 sephadexカラム(GE)でゲル濾過を行うことによってさらに精製した。野生型のmPD-1 Fc(残基L25~Q167)コンストラクト及びmB7-1 Fc(残基D37~K245)コンストラクトは、レンチウイルス発現用のLICベクターにクローニングした。このベクターもまた、mIgG2a-10 \times Hisタグを含むものである。これらのコンストラクトをレンチウイルスパッケージングプラスミドと同時に遺伝子導入し、2日後にウイルス上清を収集した。大スケールの形質導入は、20 \times 10⁶

個の細胞及び5～10 mLのウイルス上清を用いて125 mLのバフフル付きフラスコにおいて開始した。形質導入から3日目に完全培地の交換を実施し、5日目に培養のスケールアップを開始し、最終体積が1.5 Lとなるまで行って終了した。12日目に、精製に向けて上清を収集した。得られたレンチウイルス上清を精製することでPD-1及びB7-1を得た。この精製は、mPD-L1を対象に記載したように行った。

【0245】

FACS滴定アッセイ

上記のように社内で精製したPD-1 Fc融合タンパク質及びB7-1 Fc融合タンパク質を用いて蛍光活性化細胞選別(FACS)滴定アッセイを実施した。野生型または変異したPD-L1コンストラクトでHEK293浮遊細胞の遺伝子導入を行った。遺伝子導入から3日後に細胞の数を数え、 1×10^6 個細胞/mLとした。最終濃度 $1 \mu\text{M}$ のFc融合タンパク質及び $1.5 \mu\text{M}$ のAlexa488ヤギ抗マウス二次抗体を含む事前混合反応液を氷上で30分間インキュベートした。その後、この事前混合反応液を96ウェルプレートのウェルに対して量を増やしながら添加し、体積を50 μL に調整した。その後、150 μL の希釈細胞(総細胞数150,000個)をウェルに添加した。結合は、4で1時間実施し、遠心分離によってPBSで細胞を3回洗浄した後、FACSによって分析した。ゲートした生細胞をmCherryで部分ゲートし、mCherry陽性細胞をAlexa-488で部分ゲートした。結合パーセントは、Alexa-488が陽性であるmCherry細胞の割合を示す。結合部位が単一の場合の方程式である $Y = B_{\text{最大}} * X / (EC_{50} + X)$ に対して3つの独立した実験を当てはめたものの平均値がデータとして示される。

【0246】

T細胞活性化アッセイ

C57BL/6マウスから脾臓を収集し、マウス抗CD4マイクロビーズ(Milltenyi)を使用してCD4⁺T細胞を単離した。10%のウシ胎仔血清(FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質、2 mMのL-グルタミン、及び0.1%のBMEが添加されたRPMI完全培地にCD4⁺T細胞を収集した。細胞の数を数え、製造者のプロトコールを使用してカルボキシフルオレセインN-スクシンイミジルエステル(CFSE)(Invitrogen)で細胞を染色した後、細胞の数を再度数えた。同日に、96ウェルTCプレートにウェル当たり75,000個の細胞を播種してRPMI完全培地に含め、そのままにして非活性化状態とするか、33.3 nM(約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の抗CD3で活性化するか、または約5倍モル過剰(174.3 nM)の対照Fcタンパク質、野生型PD-L1-Fcタンパク質、もしくは変異PD-L1 Fcタンパク質のいずれかの存在下で33.3 nMの抗CD3で活性化した。活性化から4日後、非活性化T細胞に対してゲートを実施し、それによってCFSEの希釈を解析することで、FACSによって増殖を決定した。各実験から得られたデータは、対照のFc集団に基準化し、合計3つの独立した実験を平均化した。

【0247】

PD-1/B7-1競合結合実験

mB7-1 hIgG1Fc融合コンストラクトのクローニングを行った。このコンストラクトでは、元の上記mIgG2aコンストラクトと同一のエリスロポエチン(EPO)リーダー、mB7-1外部ドメイン境界、及びリンカー配列を使用した。このコンストラクトは、HEK293細胞において一過性に発現させ、使用した他のFc融合タンパク質を対象に上に記載したように精製した。競合実験に向けて、野生型mPD-L1 mCherryを用いてHEK293浮遊細胞に一過性の遺伝子導入を行った。遺伝子導入から3日後、遺伝子導入細胞の数を数え、細胞を希釈して 1×10^6 個細胞/mLとした。B7-1 hIgG1融合タンパク質を最終二量体濃度5 nMで100,000個の遺伝子導入細胞に添加し、その際、PD-1 mIgG2aタンパク質の非存在下とするか、またはPD-1 mIgG2aタンパク質を濃度上昇系列(二量体濃度0.01～250 nM)として存在させた。並行実験として、精製したmIgG2aアイソタイプ対照の滴

定を同等モル濃度で実施した。タンパク質の結合は、96ウェルプレートの振とう機上で、900rpm、22℃で1時間振とうして実施した。結合の後、0.2%のBSAを含む1×PBSでプレートを2回洗浄し、抗ヒト(H+L)Alexa488標識二次抗体(Invitrogen)を0.01μg/μL(合計1μg)で添加し、30分間インキュベートした。その後、0.2%のBSAを含む1×PBSでさらに2回、細胞を洗浄した。試料を直ちにFACSによって分析し、mCherryが陽性(FL4-PD-L1発現)であり、Alexa488もまた陽性(FL1-B7-1結合)である細胞のパーセントについてデータのゲートを行った。競合データは、mPD-1非存在下での5nMのB7-1の結合に基準化し、 $\log[mPD-1]$ の関数としてプロットした。競合部位が1つの競合モデル方程式である $Y = \text{最小値} + (\text{最大値} - \text{最小値}) / (1 + 10^{x - \log EC50})$ を使用し、3つの独立した実験に由来する平均データを当てはめた。

10

【0248】

結果

マイクロアレイ分析による機構的解析

選択的なPD-L1試薬を生成するために、PD-1とPD-L1との複合体のX線構造をフレームワークとして使用することで、変異導入のための残基を同定し、その結果、PD-L1のIg可変ドメインに含まれる36の溶媒露出残基を同定した(24)。それぞれの残基をアラニン、アルギニン、及びグルタミン酸に変更することで、側鎖の一連の特徴的な物理化学的特性のサンプリングを行った。一連の野生型及び変異したPD-L1コンストラクトに対してPD-1またはB7-1のFc融合タンパク質を負荷するために、細胞マイクロアレイプラットフォームを最初に使用した。こうした実験によって、PD-1結合のみに影響した変異体(D122A、Y123A、Y123R、K124A、K124D、R125A、R125D)、B7-1結合のみに影響した変異体(Y56A、Y56D、E72R、G119D、G120D)、または両方に影響した変異体(L53R、G119R、A121R)を同定した(図10に示される表1)。しかしながら、下記の理由から、細胞マイクロアレイを使用し、PD-1/B7-1結合を一貫して定量化することは困難であることが判明した。(1)PD-L1に対するB7-1の親和性が低いことから、PD-1を負荷したものと比較して、こうしたアレイではシグナル対ノイズ比が低下したこと、(2)結合の完全消失の同定は容易であったが、結合の中程度の減少は、より可変性であることが多かったこと、(3)スライドが独立してプリント、遺伝子導入、及び処理されることと関連して生じるスライドごとの固有の可変性がシグナル対ノイズ比の可変性に加わり、直接的な比較をより困難なものにしたこと。

20

30

【0249】

FACS分析による検証

PD-L1変異体の結合特性を検証し、より定量的に評価するために、我々は、ハイスループットな蛍光活性化細胞選別(FACS)アッセイを実施した。このアッセイでは、約15分ごとに96の試料を調べることが可能である。このFACSプラットフォームでは、細胞マイクロアレイと比較してダイナミックレンジの向上がもたらされる。検索タンパク質の提示様式が修正されることは、注目すべきことである。マイクロアレイプラットフォームにおいて使用した二価のIg融合体は、中程度の親和性を有する相互作用の同定には有効であるが、より弱い相互作用は見逃される可能性がある。PD-L1変異体のライブラリーの分析において予測される広範囲の見かけの親和性の検出を支援するために、磁性マイクロビーズによる捕捉及び提示によって高まった結合価を利用した(図7A)。例えば、PD-L1を提示するマイクロアレイの探索では、PD-1Fcと比較してB7-1Fcの濃度を高めることが必要であり、このことによってバックグラウンドシグナルが強くなるという結果を招いた。FACSマイクロビーズアッセイを使用することで観測されるダイナミックレンジの向上は、非特異的な結合によるバックグラウンドが減少することに少なくとも部分的には起因するものである。このことの理由は、以下の2つである可能性がある。(1)マイクロビーズアッセイでは二次抗体を使用しないこと、(2)親和性の向上が、細胞の負荷に使用し得るタンパク質の量の減少を意味すること。マイ

40

50

クロビーズアッセイは、洗浄段階を全く必要としないという利点を追加で有しており、このことによって結合試料の消失が最小化し、アッセイにおけるタンパク質結合の測定が、よりいっそう直接的なものとなる。さらに、B7-1とPD-L1との間の相互作用などの、いくつかのより低い親和性相互作用については、FACSアッセイにおいて可溶性のB7-1Fcで飽和を達成することは困難であるが、B7-1Fc結合型のマイクロビーズでは顕著な改善がもたらされた。

【0250】

簡潔に記載すると、表面ディスプレイされる55個の異なる変異PD-L1-mCherry融合体をHEK293細胞株に対して個別に一過性に遺伝子導入した。野生型PD-L1Ig融合タンパク質または野生型B7-1Ig融合タンパク質を結合させたFITC負荷型マイクロビーズのいずれかにこうした細胞が結合する能力をフローサイトメトリーによって探索した(図7B)。重要なことに、分析に使用した変異体のすべてについて一過性のタンパク質発現レベルは野生型と同様であったことから、こうした変異がPD-L1の構造または安定性に全体的な変化を生じさせたということはなさそうである。また、野生型及び変異PD-L1変異体を蛍光顕微鏡で調べると、C末端mCherry融合タンパク質が膜に正しく局在化していることが示され、このことは、変異タンパク質が正しく折り畳まれ、プロセッシングを受け、膜に挿入された状態であったことを示唆している。こうした試験の結果、PD-1に特異的に結合したPD-L1変異体(D49R、V54D、V54R、Y56A、Y56D、Y56R、Q66D、E72R、G119D、G120D)もしくはB7-1に特異的に結合したPD-L1変異体(D122A、Y123R、Y123A、K124A、K124D、K124R、R125A、R125D)、またはPD-1もしくはB7-1のいずれにも結合しなかったPD-L1変異体(L53D、L53R、I115D、I116R、G119R、G120A、G120R、A121D、A121R、D122R)の同定に至った。影響を受けた残基をPD-1とPD-L1との複合体の結晶構造にマッピングしたところ、PD-1結合及びB7-1結合を担うPD-L1表面は重複しているが明確に異なることが示されている。こうした結果によって、最初の細胞マイクロアレイ実験によって得られたものの検証が行われ、特に、PD-1またはB7-1に対する結合が顕著に減少するが消失はしないことが示された変異体について、PD-1結合及びB7-1結合に対する、より定量的な評価が得られた(表1(図10)、表2(図11))。例えば、細胞マイクロアレイ実験では、V54D PD-L1変異体及びQ66D PD-L1変異体に対するPD-1結合及びB7-1結合のレベルは同様であったが、マイクロビーズFACSアッセイの場合、これらの同一の2つの変異体では、PD-1結合は野生型レベルであり、B7-1結合は顕著に減少していることが示された。

【0251】

PD-L1とPD-L2との配列アライメント解析からもまた、PD-1結合及びB7-1結合に対するこうした残基の相対的な重要性に対する手がかりが得られる。一般に、PD-1結合に特異的な残基は、PD-L1とPD-L2との両方において高度に保存されており、このことから、両方のリガンドがPD-1に結合することが予測される。一方で、B7-1に特異的に結合すると同定された残基の多くは、PD-L1のみにおいて高度に保存されており、PD-L2ではそうではなく、このことは、PD-L2がB7-1に結合しないことから理にかなったことである。このことは、B7-1結合にはV54及びY56が特に重要であることを強調するデータを支持するものである。

【0252】

T細胞増殖アッセイにおけるPD-L1変異体の生物学的活性

24ウェル浮遊組織培養プレートにおけるHEK293細胞のハイスループットな一過性の遺伝子導入では、スクリーニングに見合う量で組換えの分泌型Fc融合タンパク質が産生するように最適化を行った。この方法を利用し、結合特性が改変されたPD-L1変異体のサブセットについてFc融合タンパク質の精製を行った。PD-L1タンパク質を小スケールでニッケル精製した後、分析ゲル濾過によって、選択変異体の挙動が野生型タ

ンパク質と同様であることが示された。T細胞増殖試験において活性を試験する前に、表面固定型のPD-1またはB7-1（GF P融合体）を発現するHEK細胞に対する結合について、それぞれの変異タンパク質の品質をFACS分析によって評価し、その結果、可溶性試薬の挙動が予測どおりであることが確認された（すなわち、PD-L1—Y56A—Fcは、PD-1を発現する細胞には結合するが、B7-1を発現する細胞には結合しない）。

【0253】

機能的に精査されたPD-L1変異体の生物学的活性を特徴付けるために、インビトロのT細胞活性化アッセイを使用した。これは、広く用いられるアッセイであり、このアッセイでは、T細胞受容体を介してT細胞の活性を刺激するためにプレート結合型の抗CD3抗体が使用される。IgG対照、野生型PD-L1、またはPD-L1変異体のいずれかの存在下で抗CD3を同時にプレートに固定化し、CSFEで標識した初代CD4⁺マウスT細胞の活性化を測定した。抗CD3存在下にCD4⁺T細胞が活性化する状況において、野生型PD-L1は、アイソタイプ対照と比較して活性化を抑制し（図8D）、PD-L1結合のレベルが低下したPD-L1変異体は、T細胞の活性化を抑制する能力が顕著に低下することが示された。対照的に、B7-1活性が低下したPD-L1変異体は、野生型PD-L1と同等の作用を誘発した。こうしたデータは、用いたインビトロの実験系下では、CD4⁺T細胞の活性化のPD-L1誘導性の抑制が、PD-L1がPD-1と相互作用することを主に介して生じることを示唆している。こうしたデータは、哺乳類免疫に対して、PD-L1とPD-1との相互作用、及びPD-L1とB7-1との相互作用が明確に異なって寄与することの定義に役立ち得る特定の生物学的活性を有する変異体の生成の実現可能性を示すものである。

【0254】

PD-L1に対する結合に関するPD-1のB7-1との競合

変異導入データによって、PD-1及びB7-1に結合するPD-L1の結合表面が、重複しているが、明確に異なることが示され、このことは、PD-1とB7-1とが、PD-L1に対する結合について競合するであろうことを示唆している。この仮説は、2つの異なるFc融合アイソタイプを使用して我々が精製したB7-1及びPD-1のFc融合タンパク質を利用する細胞ベースのFACS競合アッセイを使用して試験した。こうした試薬を用いて、PD-1（mIgG2a）の濃度上昇系列で滴定し、それと同時に、野生型PD-L1を発現するHEK細胞に結合しているB7-1（hIgG1）の消失を、抗ヒトAlexa488二次抗体を使用して選択的に監視した（図9A）。PD-1結合が、PD-L1を発現する細胞からB7-1を効率的に置き換えることが結果によって示され、このことは、結合部位が重複しているという、PD-L1変異導入に基づく知見を支持するものである。

【0255】

図7A～7C：FACSによるハイスループットなマイクロビーズ結合アッセイを使用したPD-L1変異体のスクリーニング

A) FACSによるマイクロビーズ結合アッセイの模式図を示す。B) 代表的な対照マイクロビーズ実験を示す。対照Fc、PD-1 Fc融合タンパク質、またはB7-1 Fc融合タンパク質が結合したマイクロビーズを、mCherry単独（-対照）またはPD-L1 mCherryのいずれかを発現する細胞に負荷した。FACSデータは、すべての生細胞に対してゲートを行ったものであり、野生型PD-L1を発現する細胞に対して、PD-1がコートされたマイクロビーズと、B7-1がコートされたマイクロビーズとの両方が結合することを示している（右上の四分区分画）。C) 54個PD-L1変異体の一団に対するFACSによるマイクロビーズ結合のデータを示す。データは、PD-1（青色）またはB7-1（赤色）のいずれかでコートされたマイクロビーズに結合したmCherry陽性細胞（PD-L1発現）のフラクションを示しており、結合は、野生型に基準化されている。PD-1結合及びB7-1結合は、3連の実験において並行して実施したものであり、エラーバーは、標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

【0256】

図8A～8D：PD-1またはB7-1に対する結合を改変したPD-L1変異体の特徴付け

A) PD-1とPD-L1との複合体の結晶構造(PDB: 3SBW)であり、PD-L1のIgCドメイン及びIgVドメインのみが示される。IgVドメインが拡大されており、変異すると結合が変化した残基は下記に従って標識及び色付けされている。緑色 = PD-1結合が影響を受ける、赤色 = B7-1結合が影響を受ける、灰色 = PD-1結合とB7-1結合との両方が影響を受ける。B) 野生型PD-L1または変異体のいずれかを発現する細胞を組換えのPD-1Fc融合タンパク質またはB7-1Fc融合タンパク質の濃度上昇系列で滴定したFACS滴定実験から得られたデータを示す。結合は、抗マウスAlexa488二次抗体を使用して検出した。データ点は、3つの独立した実験の平均値を示し、エラーバーは、標準偏差を示す。曲線は、結合部位が単一の場合の結合モデルにデータを当てはめたものを示す。C) BにおけるFACS滴定実験から得られたEC₅₀値及びB最大値の表を示す。星印は、滴定するには非常に結合が弱く(ベースライン)、データを当てはめることが不可能であったものを示す。D) データは、C57BL/6マウスから単離してCSFEで標識し、アイソタイプ対照、野生型、または変異したPD-L1Fc融合タンパク質の存在下で、抗CD3で4日間刺激した後に活性化したCD4⁺T細胞のフラクションを示す。活性化は、アイソタイプ対照に基準化したものであり、3つの独立した実験を示す。

10

【0257】

20

図9A～9B：PD-L1に対する結合に関するPD-1のB7-1との競合

A) 競合アッセイの模式図を示す。簡潔に記載すると、PD-L1 mCherryを一過性に遺伝子導入したHEK293細胞を、mPD-1 mIgG2aの濃度上昇系列の非存在下または存在下でmB7-1 hIgG1タンパク質と共にインキュベートした。その後、細胞に結合したmB7-1 hIgG1の量を、抗ヒトAlexa488抗体を使用し、FACS分析によって監視した。B) 1つの代表的な実験に由来する結果を示すヒートマップを示す。対照mIgG2aの存在下では、mB7-1 hIgG1の結合の消失は観測されなかった。グラフは、3つの独立した実験から得られたデータに対する平均値及び標準偏差を示す。このデータは、Prismソフトウェアにおいて競合部位が1つの場合のモデル方程式を使用して当てはめたものであり、EC₅₀は、8.3 ± 1.5 nMと計算された。

30

【0258】

実施例2：PD-L1/synTacのインビボの活性

1型糖尿病のNY8.3 TCR遺伝子導入NODモデル(NOD8.3)では、MHCクラスI対立遺伝子であるH-2K^dと関連して膵β細胞抗原であるIgrp206-214を標的とする侵襲性のT細胞自己免疫が生じる。NOD8.3マウスは、循環性の遺伝子導入(Igrp特異的)T細胞を高頻度で有する。脾臓における病原性の遺伝子導入T細胞の頻度に対する作用を決定するために、Igrp₂₀₆₋₂₁₄/H-2K^d及びPD-L1(G119R変異体)を有するPD-L1/synTacをNOD8.3マウスに投与した。図12に示されるように、PD-L1(G119R)/synTacは、Igrp₂₀₆₋₂₁₄/H-2K^dに特異的なT細胞の用量依存的な枯渇を引き起こすが、非特異的なT細胞にはこの作用を及ぼさない。

40

【0259】

本発明をその特定の実施形態に関して説明してきたが、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことができ、均等物で置換することができることを当業者は理解されたい。さらに、特定の状況、材料、物質の組成物、方法、方法のステップ(複数可)を本発明の目的、趣旨及び範囲に適合させるために、多くの修正を行うことができる。すべてのそのような修正は、本明細書に添付の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

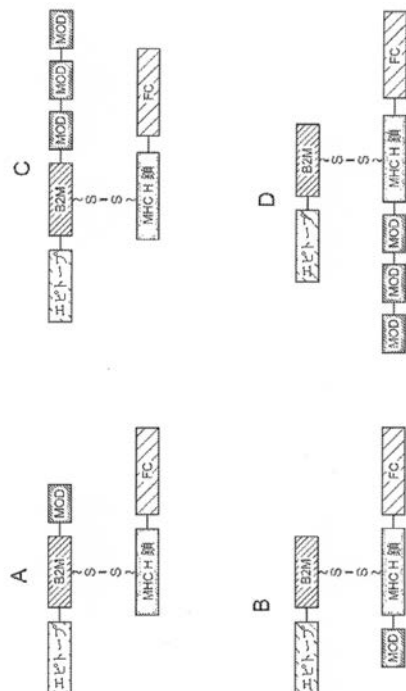
【0260】

50

相互参照

本出願は、2016年5月18日出願の米国仮特許出願第62/338,128号の利益を主張し、当該出願は、その全体が参照によって本明細書に援用される。

【図1】



【図2-1】

A

Mus musculus PD-L1

アミノ酸1~18 = シグナル

アミノ酸240~260 = 膜貫通

```
1 MRIFAGIIPT ACCHLLRAFT ITAPKDLYVV EYGSNVTMEC RFPVERELDL
LALVVYWEKE
61 DEQVIQFVAG EEDLKPQHSN FRGRASLPKD QLLKGNAALQ ITDVKLQDAG
VYCCIIISYGG
121 ADYKRITLKV NPYRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEQYP EAEVIWNTSD
HQPVSQKRSV
181 TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIPELPA
THPPQNRTHW
241 VLLGSILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDISSK NRNDTQFEET
(配列番号1)
```

B

Homo sapiens PD-L1

```
1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdaq
vyrcmlsygg
121 adykritkvk napynkingr ilvdpvtse heltcgaegy pkaeviwntss
dhqvisgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttnelfyct frldpeenh taelvipgni
lnvsikiclt
241 lspst (配列番号2)
```

【図 2 - 2】

C

10 20 30 40 50

60
マウス
MRIFAGLIIFTACCHLLRAFTITAPKOLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKE 60
AL+VYWE E MRIFA IF HLL APT+T PKOLYVVEYGSN+T+EC+FPVE+LDL
ヒト
MRIFAVFIEMTYWHLLNAFTVTVPKOLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME 60

マウス
DEQVIQFVAGEEDLKQHSNFRGRASLPKDQLLKGNALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGG 120
D+ +IQFV GEEDLK QHS++R RA L KDQL GNAALQITDVKLQDAGVY
C+ISYGG
ヒト
DKNIIQFVHGGEEDLKQHSNFRGRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG 120

マウス
ADYKRITLVNAPYRKINQRI-
SVPATSEHELICQAEGYPEAEVIWNTSDHQFVSGKRS 179
ADYKRIT+KVNAPY KINQRI VDP TSEHEL CQAEGYP+AEVIWT+SDHQ
+SGK +
ヒト
ADYKRITVKVNAPYKINQRIILVVDPTSEHELICQAEGYPKAEVIWNTSDHQVLSGKTT 180

マウス
VTTSTRTEGMLNVNTSSLRVNATANEVFYCTFWRSQFGQNHIAELIPELPPQNR 237
T S+ E L NVTS+LR+N T N++FYCTF R P +NHTAEL+IP
ヒト
TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPGNILNVSICI- 237

【図 2 - 3】

D

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkalyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvhqss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvlkldag
vyrmsisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldepenh taelvipgni
lnvsikielt
241 lspst (配列番号46)

E

FT VTPVKALYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKQVHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSICI (配列番号47)

F

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkalyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvhqss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvlkldag
vyrmsisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldepenh taelvipgni
lnvsikielt
241 lspst (配列番号48)

G

FT VTPVKALYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKQVHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSICI (配列番号49)

【図 2 - 4】

H

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkalyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvhqss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvlkldag
vyrmsisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldepenh taelvipgni
lnvsikielt
241 lspst (配列番号50)

I

FT VTPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKQVHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSICI (配列番号51)

J

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkalyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvhqss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvlkldag
vyrmsisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldepenh taelvipgni
lnvsikielt
241 lspst (配列番号52)

K

FT VTPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKQVHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSICI (配列番号53)

【図 2 - 5】

L

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkalyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvhqss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvlkldag
vyrmsisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldepenh taelvipgni
lnvsikielt
241 lspst (配列番号54)

M

FT VTPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKQVHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSICI (配列番号55)

【図 3 - 1】

A

Atus musculus PD-1 (配列番号56)

1 mwvrvqvpwfsf twavqlswq sgwllvpng pwrsltfypa wltvsegana
tftcslnsws
61 edlmnlwnrl spsnqtekqa afcnglsqpv qdarfqiql pnrhdfhnni
ldtrrndsg
121 ylcgaishlp kakieespga elvvtterile tstriypspsp kpegrfqqmv
igimsalvgi
181 pvlillawal avfcstsmse argagskddt lkeepsaapv psvayeeldf
qgrektpeip
241 tacvhteyat ivfteglgas amgrrgsadg lqgprpprhe dghcswpl

B

Homo sapiens PD-1 (配列番号57)

1 mqipqapwpv vwavqlgwr pgwfldspdr pwnpftfspa livvtegdna
tftcsfsnts
61 esfvlnwrym spsnqtdkla afpedrsqpy qdcfrfvrtl pngdrfhmsv
vrarrndsgt
121 ylcgaishlp kakieslra elrvterae vptahpspsp rpaggfqtlv
vgvvgllgs
181 lvllvwvav icssraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygelfdqw
rektpeppvp
241 cvpeqtayat ivfsgmgts sparrgsadg prsagplrpe dghcswpl

【図 3 - 2】

C

Mus musculus B7-1 (配列番号 58)

```

1 macncqlmqd tpllkfpcpr lillfvllir lsqvssdvde qlsksvdkdv
llpcrynsp
61 edesedriyw qkhdkvvlsv iagklkvwpe yknrtlydnt tysliilglv
lsdrgtyscv
121 vqkkgertye vkhlalvklis ikadistpni tesgnpsadt kriticfasgg
fppkprfswle
181 ngrelpgint tisqdpesl ytissqlafn ttrnhtikcl ikygdahvae
dftwekpped
241 ppdsksntlvl fgagfgavit vvvivviiko fckhrscfrr neasretmns
ltfgpeeala
301 eqtvfl

```

D

Homo sapiens B7-1 (CD80) (配列番号 59)

```

1 mghtrrrgts psckpylnff qlilvlaglsh fcsgvihvtx evkevatlsc
ghnvsveela
61 qtriywqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnnls ivilalrpsd
egtyecvvlk
121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe
phlswlengc
181 elnainttvs qdpetelyav sskldfnmtt nhsfmcliky ghrlvngtfn
wnttkqehfp
241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv

```

【図 4 - 2】

B

GenBank AAA52770

Homo sapiens IgD Fc (アミノ酸 162~383) (配列番号 63)

222 アミノ酸

```

1 ptkapdvfpi isgcrhpkdn spvvlaclit gyhptsvtvt wymgtqsgqp
rtfpeiqrdd
61 syymtssqls tplqgwrgge ykcvvghtas kskkeifwfp espkqaassv
ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkekekeeeq eeretktpec pshtqplgvy
lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgstdkdah ltwevagkvp tggveeqlle zhsnqsgsqh
srlltprslw
241 nagtsvtctt nhpslppqri malrepaaga pvklslnila ssdppeaasw
llcevsqgfs
301 pnillmwled qrevntsgfa parppppqrs ttifawsvlr vpappspqpa
tytcvvsdhd
361 srlllnasrs levsyvtahg pmk

```

GenBank Q308221A

Homo sapiens IgM Fc (配列番号 64)

276 アミノ酸

```

1 vstltlikzs dwlgesmftc rvdhrgltfq gnassmcvdp qdtairvfai
ppsfasiflt
61 kstkltlclvt dlttybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavge
asicedbdws
121 gerftctvtth tdlpsplkgt isrpkgvalh rpbvylppa rzzlniresa
titclvtgfs
181 padvfvevmq rgeplspgky vtsapmpepq apgryfahsi litvseeewnt
ggtytcvvah
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvslvmsd tagtcy

```

【図 4 - 1】

A

GenBank 3S7G_A

Homo sapiens IgG1 Fc (配列番号 60)

227 アミノ酸

```

1 dkthtccppcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshd
pevkfnwyvd
61 gvevhnatk preeqynsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkappa
plektiskak
121 gqprepvyt lpsrdeltk nqvsltlclv gfypsdiave wesngqpenn
ykttppvlds
181 dgsfflyskl tvdksrwqgg nvfscsvmhe alhnhytqks lsispkg

```

GenBank AAN76044

Homo sapiens IgG2 Fc (アミノ酸 9~325) (配列番号 61)

227 アミノ酸

```

1 stkgpsvfpl apcsrstsaa taalgclvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh
tfpavlqsgg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpns tkvdktkverk ccvecppcpa
ppvagpsvfl
121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshdede vqfnwyvdgv evhnaktkpr
eeqfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisktkgq prepqvytlp
psreemtknq
241 vsltclvkgf ypsdiaweve sngqpennyk ttpmldsdg sfflyskltv
dksrwqggqv
301 fscsvmheal hnhytqksls lispkg

```

GenBank AAW65947

Homo sapiens IgG3 Fc (アミノ酸 19~246) (配列番号 62)

238 アミノ酸

```

1 hkpsntkvdk rvelktplgd thtccppcpa pellggpsvf flfppkpkdtl
misrtpevtc
61 vvvvdvshdp evkfnwyvdg vevhnatktp reeqynstyr vsvltvlhqd
dwlngkeykc
121 kvsnkappa iektiskakg qprepvytl ppsrdeltkn qvsltlclvg
fypsdiaweve
181 esngqpenny kttppvldsds gsfflysklt vdksrwqggv nvfscsvmhea
lhnhytqksl
241 lsispkg

```

【図 4 - 3】

C

GenBank P01876

Homo sapiens IgA Fc (アミノ酸 120~353) (配列番号 65)

234 アミノ酸

```

1 asptspkvfp lsicstqpdg nvviacivgg ffpqepilsvt wsesggqgvt
rnfpssqdas
61 gdltytssql tlpatqolag ksvtchvkhy tnpqgvtvtp cpvpstpttp
spstpttpp
121 scchprlsih rpaledlllg seanltctlt glrdasgvtf twrpsgksa
vqgpperdlc
181 gcysvssvlp gcaepwnhgg tftctaaype sktpiltatls ksntfrpev
hlippseel
241 alnelvtltc largfspkdv lvrwlqsgse lprekyltwa srqpsqggt
tfavtsilrv
301 aaedwkkgdt fscmvgheal plaftgktid rlagkpchvn vsvvmaevdg
tcy

```

GenBank 1F6A_B

Homo sapiens IgE Fc (アミノ酸 6~222) (配列番号 66)

212 アミノ酸

```

1 adpcdsnprg vsaylsrpsp fdlfirkspt itclvvdlap skgtvnltws
rasgkpvnh
61 trkeekqrng tlvtstltpv gtrdwieget yqcrvthphl pralmrsttk
tsgrpraapev
121 yafatpewpg srdrklacil ignfmpedis vqwlhnevgi pdarhsttqp
rktksggffv
181 fsrlvtrae weqkdeficr avheaaspsq tvqgravsvnp gk

```

GenBank P01861

Homo sapiens IgG4 Fc (アミノ酸 100~327) (配列番号 67)

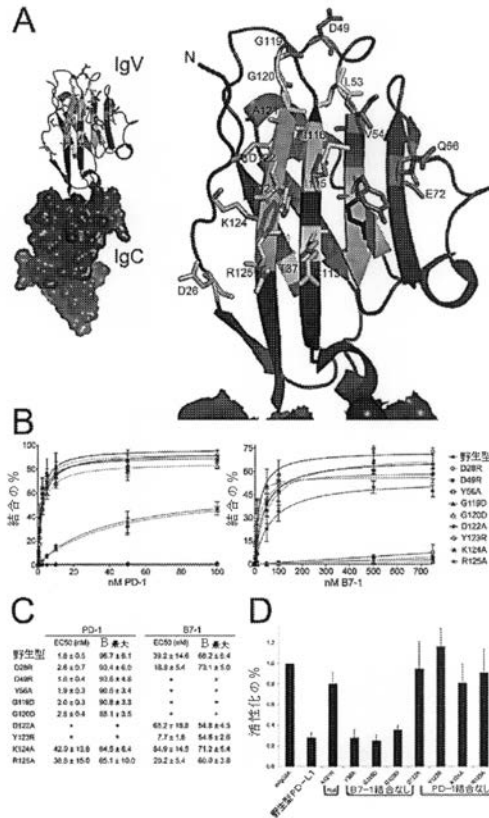
228 アミノ酸

```

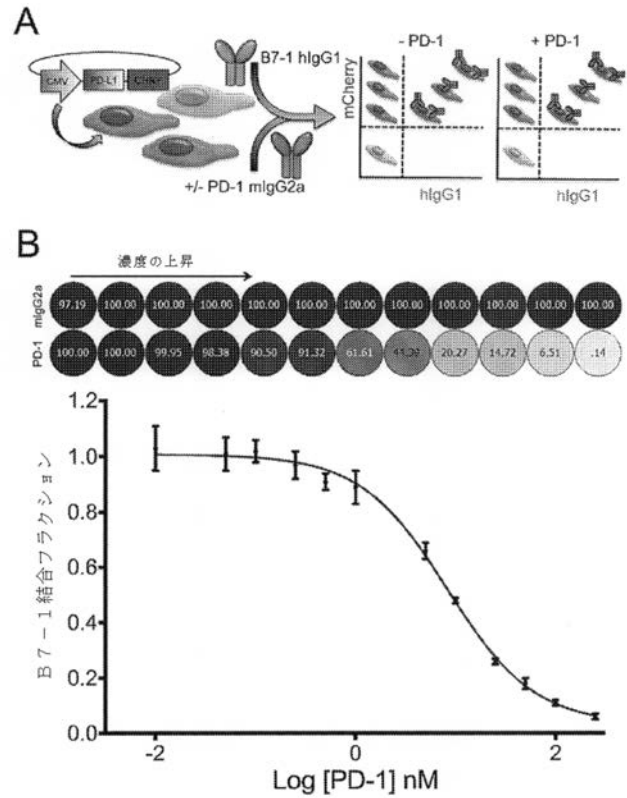
1 astkgpsvfpl apcsrstsaa taalgclvkd dyfpepvtvs wnsaltsgv
htfpavlqss
61 glyslssvvt vpssslgkkt ytcnvdkhps ntkvdkrves kygppcpscp
apeflggpsv
121 flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsged pevqfnwyvd gvevhnatk
preeqfnsty
181 rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkglps siektiskak gqprepvyt
lpsqeemtk
241 nqvsltlclv gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysr
l tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alhnhytqks lsislkg

```


【図 8】



【図 9】



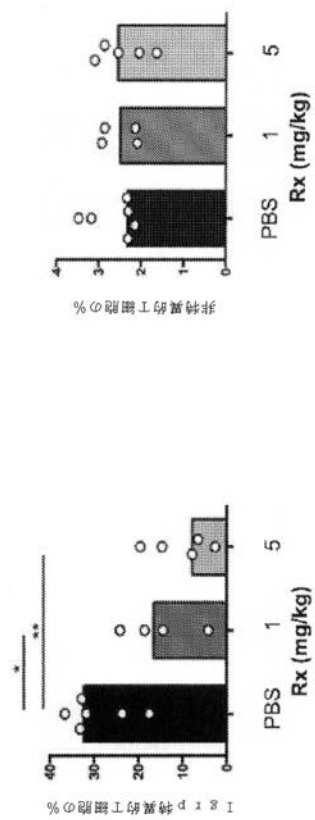
【図 10】

	PD-1	B7-1
野生型	+	+
mCherry	-	-
D49A	+	+
D49R	+	R
L53R	-	-
V54D	R	R
V54A	+	+
Y56A	+	-
Y56D	+	-
Q66A	+	+
Q66D	+	R
E72A	+	+
E72R	+	-
G119D	+	-
G119R	-	-
G120D	+	-
A121R	-	-
D122A	-	+
Y123A	-	+
Y123R	-	+
K124A	-	+
K124D	-	+
R125A	R	+
R125D	-	+

【図 11】

	PD-1	B7-1
野生型	1.00	1.00
mCherry	0.02 ± 0.02	0.10 ± 0.06
D26A	0.54 ± 0.26	0.93 ± 0.03
D26R	0.42 ± 0.07	0.96 ± 0.06
T37A	0.31 ± 0.03	0.26 ± 0.04
T37R	0.22 ± 0.11	0.17 ± 0.07
D49R	0.88 ± 0.06	0.31 ± 0.06
L53D	0.16 ± 0.10	0.09 ± 0.04
L53R	0.14 ± 0.10	0.10 ± 0.05
V54D	0.88 ± 0.12	0.30 ± 0.04
V54R	0.95 ± 0.04	0.49 ± 0.07
Y56A	1.07 ± 0.16	0.08 ± 0.04
Y56D	0.77 ± 0.10	0.07 ± 0.03
Y56R	0.64 ± 0.13	0.11 ± 0.06
Q66D	1.05 ± 0.07	0.54 ± 0.06
E72D	0.55 ± 0.07	0.56 ± 0.10
E72R	0.48 ± 0.15	0.11 ± 0.05
I115D	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.03
I116R	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
G119D	1.40 ± 0.20	0.08 ± 0.04
G119R	0.29 ± 0.10	0.02 ± 0.01
G120A	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
G120D	0.84 ± 0.20	0.05 ± 0.04
G120R	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.04
A121D	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03
A121R	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03
D122A	0.01 ± 0.01	0.74 ± 0.12
D122R	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Y123A	0.01 ± 0.01	0.65 ± 0.08
Y123D	0.01 ± 0.01	0.33 ± 0.16
Y123R	0.01 ± 0.01	1.12 ± 0.04
K124A	0.02 ± 0.01	0.94 ± 0.06
K124D	0.03 ± 0.01	0.48 ± 0.05
K124R	0.02 ± 0.01	0.85 ± 0.08
R125A	0.03 ± 0.04	1.03 ± 0.02
R125D	0.02 ± 0.01	1.12 ± 0.08

【 図 1 2 】



【 配 列 表 】

2019522466000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33042

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.: 4-6, 20-26, 29-86
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:

--Please See Supplemental Page---

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 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.:
Group 1+ claims 1, 2 (in-part), 3 (in-part), 7-15, 16 (in-part), 17 (in-part), 27 (in-part) and 28 (in-part)

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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/395; C07K 14/705, 16/28 (2017.01)

CPC - A61K 39/3955; C07K 14/70539, 16/2827; G01N 33/6857

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/000619 A1 (BEIGENE, LTD) 07 January 2016; paragraphs [0112], [0149], [0156], [0159]	1-2, 3/1-2, 7-15, 16/7-15, 17/16/7-15, 27/7-14, 28/7-14
A	US 2013/0017199 A1 (LANGERMANN, S) 17 January 2013; paragraphs [0078]-[0080], [0085], [0093]	1-2, 3/1-2, 7-15, 16/7-15, 17/16/7-15, 27/7-14, 28/7-14
A	US 2016/0011204 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY) 14 January 2016; figures 12, 18; paragraphs [0031], [0038]	1-2, 3/1-2, 7-15, 16/7-15, 17/16/7-15, 27/7-14, 28/7-14
A	WO 2015/195531 A2 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC.) 23 December 2015; paragraphs [0033]-[0034], [0049]; figures 19F, 26A	7-15, 16/7-15, 17/16/7-15, 27/7-14, 28/7-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

26 September 2017 (26.09.2017)

Date of mailing of the international search report

10 OCT 2017

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US17/33042

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-3, 7-19, 27, 28; a D26 mutation; NP_004039 (SEQ ID NO: 3) and SEQ ID NO: 68 are directed toward a variant PD-L1 immunomodulatory polypeptide and a multimeric polypeptide comprising the variant PD-L1 immunomodulatory polypeptide.

The immunomodulatory peptide and multimeric polypeptide will be searched to the extent they encompass a D26 mutation (first exemplary PD-L1 mutation), a B2-microglobulin polypeptide encompassing NP_004039 (SEQ ID NO: 3) (first exemplary B2-microglobulin sequence) and a MHC polypeptide encompassing SEQ ID NO: 68 (first exemplary MHC polypeptide). Applicant is invited to elect additional mutation site(s), and/or B2-microglobulin sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each; and/or MHC polypeptide sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional mutation(s) and/or B2-microglobulin and/or MHC polypeptide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2 (in-part), 3 (in-part), 7-15, 16 (in-part), 17 (in-part), 27 (in-part) and 28 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a D26 mutation (PD-L1 mutation), NP_004039 (SEQ ID NO: 3) (B2-microglobulin sequence) and SEQ ID NO: 68 (MHC polypeptide). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a PD-L1 mutation encompassing a T37 mutation (first exemplary elected PD-L1 mutation).

No technical features are shared between the B2-microglobulin and/or MHC polypeptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a multimeric polypeptide comprising: a) a first polypeptide comprising, in order from N-terminus to C-terminus: i) an epitope; ii) a first major histocompatibility complex (MHC) polypeptide; and b) a second polypeptide comprising, in order from N-terminus to C-terminus: i) a second MHC polypeptide; and ii) optionally an immunoglobulin (Ig) Fc polypeptide or a non-Ig scaffold, wherein the multimeric polypeptide comprises one or more immunomodulatory domains, wherein at least one of the one or more immunomodulatory domain is: A) at the C-terminus of the first polypeptide; B) at the N-terminus of the second polypeptide; C) at the C-terminus of the second polypeptide; or D) at the C-terminus of the first polypeptide and at the N-terminus of the second polypeptide, wherein the immunomodulatory domain comprises an amino acid sequence having at least 85% amino acid sequence identity to the PD-L1 amino acid sequence depicted in FIG. 2A or 2B, to the PD-L1 amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, wherein the variant PD-L1 immunomodulatory polypeptide has one or more amino acid substitutions relative to the PD-L1 amino acid sequence depicted in FIG. 2A or to the PD-L1 amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1; and wherein the variant PD-L1 immunomodulatory polypeptide exhibits: a) reduced binding affinity to a PD1 polypeptide having an amino acid sequence depicted in FIG. 3A or 3B, compared to the binding affinity of the PD-L1 amino acid sequence depicted in FIG. 2A or 2B, or compared to the binding affinity of the PD-L1 amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, for the PD1 polypeptide.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2015/195531 A2 to Albert Einstein College of Medicine, Inc. (hereinafter 'Einstein') in view of US 2016/0011204 A1 to Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University (hereinafter 'Yeshiva') and US 2013/0017199 A1 (LANGERMANN).

Einstein discloses a multimeric polypeptide (a multimeric polypeptide; paragraph [0033]) comprising: a) a first polypeptide (comprising: a) a first polypeptide; paragraph [0033]) comprising, in order from N-terminus to C-terminus (comprising, in order from N-terminus to C-terminus; paragraph [0033]): i) an epitope (an epitope; paragraph [0033]); ii) a first major histocompatibility complex (MHC) polypeptide (a first major histocompatibility complex (MHC) polypeptide; paragraph [0033]); and b) a second polypeptide (and b) a second polypeptide; paragraph [0033]) comprising, in order from N-terminus to C-terminus (comprising, in order from N-terminus to C-terminus; paragraph [0033]): i) a second MHC polypeptide (a second MHC polypeptide; paragraph [0033]); wherein the multimeric polypeptide comprises one or more immunomodulatory domains (wherein the multimeric polypeptide comprises one or more immunomodulatory domains; paragraph [0033]), wherein at least one of the one or more immunomodulatory domain is: A) at the C-terminus of the first polypeptide (wherein at least one of the one or more immunomodulatory domain is: A) at the C-terminus of the first polypeptide; paragraph [0033]), wherein the immunomodulatory domain comprises a PD-L1 polypeptide or modified form thereof (wherein the immunomodulatory domain comprises a PD-L1 polypeptide or modified form thereof; paragraph [0034], [0049], Figure 19F); as well as a reference PD-L1 sequence comprising SEQ ID NO: 1 (a reference PD-L1 sequence comprising SEQ ID NO: 94 (SEQ ID NO: 1); paragraph [0069], Figure 26A, SEQ ID NO: 94; wherein SEQ ID NO: 94 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 1).

Einstein does not disclose wherein the immunomodulatory domain comprises an amino acid sequence having at least 85% amino acid sequence identity to the PD-L1 amino acid sequence depicted in FIG. 2A or 2B, to the PD-L1 amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, wherein the variant PD-L1 immunomodulatory polypeptide has one or more amino acid substitutions relative to the PD-L1 amino acid sequence depicted in FIG. 2A or to the PD-L1 amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1; and wherein the variant PD-L1 immunomodulatory polypeptide exhibits: a) reduced binding affinity to a PD1 polypeptide having an amino acid sequence depicted in FIG. 3A or 3B, compared to the binding affinity of the PD-L1 amino acid sequence depicted in FIG. 2A or 2B, or compared to the binding affinity of the PD-L1 amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, for the PD1 polypeptide.

---Continued Within the Next Supplemental Box---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33042

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Yeshiva discloses PD-L1 single amino acid mutants (PD-L1 single amino acid mutants; Figure 12; paragraph [0031]); wherein the mutants demonstrated impaired binding to PD-1 or B7-1 or both (wherein the mutants demonstrated impaired binding to PD-1 or B7-1 or both; paragraph [0031]).

Langermann discloses inhibiting PD-1 (inhibiting PD-1; abstract), including a murine PD-1 sequence comprising SEQ ID NO: 56 (a Murine PD-1 sequence comprising SEQ ID NO: 17 (SEQ ID NO: 56); paragraph [0083]); SEQ ID NO: 17; wherein SEQ ID NO: 17 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 56).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Einstein to have used a reference sequence for an interacting receptor, such as a murine PD-1 reference sequence as disclosed by Langermann, in order to enable a practitioner of skill in the art to express the receptor for use in assessing binding to the constructs disclosed by Einstein. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Einstein include multimeric constructs including of single amino acid PD-L1 mutants (having at least 55% identity to the PD-L1 sequence disclosed by Einstein), wherein the mutants have reduced binding affinity for a cognate receptor, such as PD-1, as disclosed by Yeshiva, in order to have assessed the immunomodulatory capabilities of the mutant PD-L1 molecules.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Einstein, Yeshiva and Langermann references, unity of invention is lacking.

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 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	

(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, 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, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 アルモ , スティーブン , シー .

アメリカ合衆国 1 0 8 0 3 ニューヨーク州 , ペラム , ジェームス ストリート 8 5 0

(72) 発明者 ザイデル , ロナルド , ディー .

アメリカ合衆国 1 0 5 3 8 ニューヨーク州 , ラーチモント , ラーチモント エイカーズ 7 2 6 , アプト . C

F ターム(参考) 4B064 AG01 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA94X AA94Y AB01 BA02 CA23 CA44
 4C084 AA02 AA03 AA13 BA02 BA22 CA18 DA38 MA66 NA13 ZA021
 ZA961 ZB051 ZB081
 4C087 BC83 CA12 MA66 NA13 ZA02 ZA96 ZB05 ZB08
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74