

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-500065
(P2024-500065A)

(43)公表日 令和6年1月4日(2024.1.4)

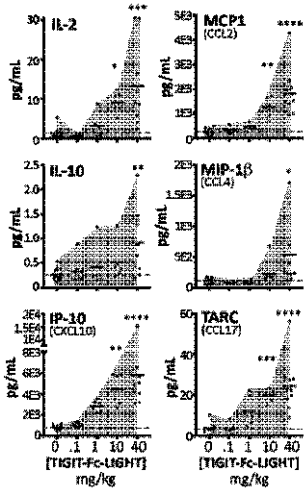
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		4 H 0 4 5
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全217頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-534210(P2023-534210)	(71)出願人	519302132	(72)発明者 アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス オースティン、ウェスト 5 ストリート 5 0 0、スイート 1 2 0 0 シャタック ラボ、インコーポレイテッド 内	
(86)(22)出願日	令和3年12月3日(2021.12.3)	(74)代理人	110001519		
(85)翻訳文提出日	令和5年8月4日(2023.8.4)		弁理士法人太陽国際特許事務所		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/061841	(72)発明者	シュレイバー、テイラー		
(87)国際公開番号	WO2022/120191		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス		
(87)国際公開日	令和4年6月9日(2022.6.9)		オースティン、ウェスト 5 ストリート		
(31)優先権主張番号	63/276,066		5 0 0、スイート 1 2 0 0		
(32)優先日	令和3年11月5日(2021.11.5)		シャタック		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ラボ、インコーポレイテッド 内		
(31)優先権主張番号	63/215,735	(72)発明者	フロム、ジョージ		
(32)優先日	令和3年6月28日(2021.6.28)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		オースティン、ウェスト 5 ストリート		
(31)優先権主張番号	63/173,090			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 T I G I Tベースのキメラタンパク質及びL I G H Tベースのキメラタンパク質を使用してがんを処置する方法

(57)【要約】

本開示は、とりわけ、疾患の処置に見出すキメラタンパク質を含む組成物及び方法、並びにキメラタンパク質を使用した薬剤耐性がんの検出及び処置に関する。

FIG. 22E



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がんの処置を必要とする対象においてがんを処置するための方法であって、

N末端－(a)－(b)－(c)－C末端

の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を前記対象に投与する工程を含み、
式中、

(a)は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、

(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジャーCH2－CH3Fcドメインを含むリンカーであり、

(c)は、ヒトLIGHT(リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、

投与される前記キメラタンパク質の用量は、約0.0001mg/kg～約50.0mg/kgであり、任意に、1mg/kg、約3mg/kg、約6mg/kg、又は約10mg/kg、約12mg/kg、約15mg/kg、約18mg/kg、約20mg/kg、約22mg/kg、約25mg/kg、約27mg/kg、約30mg/kg、約33mg/kg、約35mg/kg、約37mg/kg、約40mg/kg、約42mg/kg、約45mg/kg、約48mg/kg、及び約50mg/kgから選択される、
方法。

10

20

【請求項 2】

前記対象がヒトであり、任意に成人ヒトである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記キメラタンパク質が、少なくともおよそ週に1回投与される、請求項1又は請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記キメラタンパク質が、少なくともおよそ1ヶ月に1回投与される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記キメラタンパク質が、少なくともおよそ1ヶ月に2回投与される、請求項4に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記キメラタンパク質が、少なくともおよそ1ヶ月に3回投与される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記がんが(局所性及び／又は転移性の)固形腫瘍又はリンパ腫を含む、請求項1～請求項6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記がんが、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫(低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)を含む)；小リンパ球性(SL)NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度のびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病(CLL)；急性リンパ性白血病(ALL)；毛状細胞白血病；又は慢性骨髄芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん(gastric cancer)；胃腸がん(gastrointestinal cancer)を含む)；神経膠芽腫；肝がん(hepatic carcinoma)；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん(kidney or renal cancer)；喉頭がん；白血病；肝臓がん(liver cancer)；肺がん(例えば、小細胞肺がん、非

40

50

小細胞肺癌、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん（stomach cancer）；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん（renal carcinoma）；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される、請求項7に記載の方法。

10

【請求項9】

リンパ球の増殖の誘導を必要とする対象においてリンパ球の増殖を誘導するための方法であって、

N末端－（a）－（b）－（c）－C末端

の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を前記対象に投与する工程を含み、
式中、

20

（a）は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体（TIGIT）の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、

（b）は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジャーCH2－CH3Fcドメインを含むリンカーであり、

（c）は、ヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインである、
方法。

【請求項10】

リンパ球のマージネーション（margination）の誘導を必要とする対象においてリンパ球のマージネーションを誘導するための方法であって、

30

N末端－（a）－（b）－（c）－C末端

の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を前記対象に投与する工程を含み、
式中、

（a）は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体（TIGIT）の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、

（b）は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジャーCH2－CH3Fcドメインを含むリンカーであり、

（c）は、ヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインである、
方法。

40

【請求項11】

前記対象が、約3日ごと～約10日ごと、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、約2週間ごと～約4週間ごと、約3週間ごと～約5週間ごと、約4週間ごと～約6週間ごと、約5週間ごと～約7週間ごと、約6週間ごと～約8週間ごと、及び約6週間ごと～約2ヶ月ごとから選択される投薬レジメンで投与される、請求項1、請求項9又は請求項10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記第1のドメインがTIGITリガンドを結合することができる、請求項1～請求項

50

1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 のドメインが、T I G I T の細胞外ドメインの実質的に全てを含む、請求項 1 ～請求項 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記第 2 のドメインが L I G H T 受容体を結合することができる、請求項 1 ～請求項 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記第 2 のドメインが、L I G H T の細胞外ドメインの実質的に全てを含む、請求項 1 ～請求項 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記リンカーが、フレキシブルアミノ酸配列、I g G ヒンジ領域及び／又は抗体配列から選択されるポリペプチドである、請求項 1 ～請求項 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記リンカーが、I g G 1 又は I g G 4 に由来するヒンジ－C H 2 －C H 3 F c ドメインを含む、請求項 1 ～請求項 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ヒンジ－C H 2 －C H 3 F c ドメインがヒト I g G 1 又はヒト I g G 4 に由来する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記リンカーが、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 1 1 2 又は配列番号 1 1 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 6 %、又は少なくとも 9 7 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記リンカーが、配列番号 4 9 ～9 5 から独立して選択される 1 又は複数の連結リンカーを含む、請求項 1 ～請求項 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記リンカーが、配列番号 4 9 ～9 5 から独立して選択される 2 つ以上の連結リンカーを含み、ここで、1 つの連結リンカーは、ヒンジ－C H 2 －C H 3 F c ドメインに対して N 末端側にあり、別の連結リンカーは、ヒンジ－C H 2 －C H 3 F c ドメインに対して C 末端側にある、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 1 のドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 6 %、又は少なくとも 9 7 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～請求項 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 2 のドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 6 %、又は少なくとも 9 7 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～請求項 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

(a) 前記第 1 のドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、

(b) 前記第 2 のドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、

(c) 前記リンカーが、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 1 1 2 又は配列番号 1 1 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～請求項 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

(a) 前記第 1 のドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含み、

(b) 前記第2のドメインが、配列番号2のアミノ酸配列を含み、

(c) 前記リンカーが、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～請求項24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記キメラタンパク質が、SKYGPPCPSCP（配列番号49）、SKYGPPCPPCP（配列番号50）、IEGRMD（配列番号52）から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの連結リンカーを更に含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記キメラタンパク質が、IEGRMD（配列番号52）のアミノ酸配列を含む前記連結リンカーを含む、請求項26に記載の方法。

10

【請求項28】

IEGRMDのアミノ酸配列が、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列のC末端に位置する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～請求項28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

20

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.2%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載の方法。

30

【請求項33】

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.4%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.6%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

40

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.8%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記キメラタンパク質が、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記対象が標準治療を受けたことがある、標準治療に対して耐性がある（been tolerant to）、若しくは標準治療に不適格である、及び／又は前記がんには標準治療と見なされている承認された治療がない、請求項1～請求項36のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 38】

前記対象が、併用的な化学療法、免疫療法、生物学的療法又はホルモン療法を受けていない、請求項 1～請求項 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

がん処置を必要とする対象におけるがん処置の有効性を評価する方法であって、

(i) 一般構造：

N 末端－(a)－(b)－(c)－C 末端

を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、
式中、

(a) は Ig ドメイン及び ITIM ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体 (TIGIT) の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、 10

(b) は第 1 及び第 2 のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ－CH2－CH3 Fc ドメインを含むリンカーであり、

(c) はヒト LIGHT (リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、T リンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター (HVEM) について HSV 糖タンパク質 D と競合する) の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、

ここで、前記用量は約 0.03 mg/kg～約 50 mg/kg である、工程と、

(ii) 前記対象から生物学的試料を得る工程と、

(iii) 前記生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1β (CCL4) TARC (CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12 及び SDF1a (CXCL12) から選択される 20
サイトカインのレベル及び／又は活性を決定する工程と、

(iv) 前記対象が、IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1β (CCL4) TARC (CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12 及び SDF1a (CXCL12) から選択される少なくとも 1 つのサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を有する場合、投薬を継続する工程と、
を含む、方法。

【請求項 40】

がんの療法による処置の対象を選択する方法であって、

(i) 一般構造：

N 末端－(a)－(b)－(c)－C 末端

を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、
式中、

(a) は Ig ドメイン及び ITIM ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体 (TIGIT) の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、

(b) は第 1 及び第 2 のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ－CH2－CH3 Fc ドメインを含むリンカーであり、

(c) はヒト LIGHT (リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、T リンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター (HVEM) について HSV 糖タンパク質 D と競合する) の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、 40
ここで、前記用量は約 0.03 mg/kg～約 50 mg/kg である、工程と、

(ii) 前記対象から生物学的試料を得る工程と、

(iii) 前記生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1β (CCL4) TARC (CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12 及び SDF1a (CXCL12) から選択される 50
サイトカインのレベル及び／又は活性を決定する工程と、

(iv) 前記対象が、IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1β (CCL4) TARC (CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12 及び SDF1a (CXCL12) から選択される少なくとも 1 つのサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を有する場合、前記のがんの療法による処置の対象に前記対象を

選択する工程と、
を含む、方法。

【請求項 4 1】

前記生物学的試料が、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である、請求項 3 9～請求項 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記生物学的試料が生検試料である、請求項 3 9～請求項 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記生検試料が、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記生物学的試料が、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む、請求項 3 9～請求項 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記生物学的試料が、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる、請求項 3 9～請求項 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記生物学的試料が、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔（cavities）の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記生物学的試料が少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含む、請求項 3 9～請求項 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記腫瘍が、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B 細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性 NHL；中悪性度のびまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度の小型非切断細胞 NHL；巨大病変 NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS 関連リンパ腫；及びフルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髄芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（gastric cancer）（胃腸がん（gastrointestinal cancer）を含む）；神経膠芽腫；肝がん（hepatic carcinoma）；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん（kidney or renal cancer）；喉頭がん；白血病；肝臓がん（liver cancer）；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん（stomach cancer）；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系の

10

20

30

40

50

がん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん（renal carcinoma）；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される、請求項47に記載の方法。

10

【請求項49】

前記アッセイが、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロットティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる、請求項39～請求項48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記アッセイが、前記試料を、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1α（CXCL12）から選択される少なくとも1つのサイトカインに特異的に結合する1又は複数の剤と接触させることによって行われる、請求項49に記載の方法。

20

【請求項51】

少なくとも1つのサイトカインに特異的に結合する前記剤が、1又は複数の抗体、抗体様分子又はその断片を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記アッセイが、前記試料を、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1α（CXCL12）から選択されるサイトカインをコードする少なくとも1つの核酸に特異的に結合する1又は複数の剤と接触させることによって行われる、請求項49に記載の方法。

30

【請求項53】

少なくとも1つの核酸に特異的に結合する前記剤が、核酸プライマー又はプローブである、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

患者のがん処置を決定する方法であって、

（i）対象から生物学的試料を得ることと、

（ii）前記試料を、

細胞周期プロセスの正の調節、G1/S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IKKキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される、遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいは

40

リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択される、遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御；

について評価することと、

50

(i i i) 工程 (b) の評価に基づいて前記がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は T I G I T であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は L I G H T であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49 ~ 95 から選択される；又は

(B)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は S I R P α であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は 4 - 1 B B L であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49 ~ 95 から選択される、ことと、

を含む、方法。

【請求項 55】

がん処置のための患者を選択するための方法であって、

(i) 対象から生物学的試料を得ることと、

(i i) 前記試料を、

細胞周期プロセスの正の調節、G 1 / S 移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、I κ B キナーゼ / N F κ B シグナル伝達の正の調節、I 型 I F N シグナル伝達経路、I F N γ に対する細胞応答、I F N α 産生の正の調節、防御応答の正の調節、I F N β 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング / 提示の負の調節、及び M H C クラス I を介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング / 提示から選択される遺伝子オントロジー (G O) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御；並びに / あるいは

リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜への S R P 依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、ミトコンドリア翻訳伸長、D N A 依存性 D N A 複製及び A T P 生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー (G O) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の下方制御；

について評価することと、

(i i i) がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は T I G I T であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

10

20

30

40

50

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は L I G H T であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択され；又は

(B)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は S I R P α であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は 4-1 B B L であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択される、ことと、

を含む、方法。

【請求項 56】

がんを処置する方法であって、

(i) 対象から生物学的試料を得ることと、

(ii) 前記試料を、

細胞周期プロセスの正の調節、G1/S 移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、I κ B キナーゼ/NF κ B シグナル伝達の正の調節、I 型 I F N シグナル伝達経路、I F N γ に対する細胞応答、I F N α 産生の正の調節、防御応答の正の調節、I F N β 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング/提示の負の調節、及び M H C クラス I を介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング/提示から選択される遺伝子オントロジー (G O) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御；並びに/あるいは

リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜への S R P 依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、ミトコンドリア翻訳伸長、D N A 依存性 D N A 複製及び A T P 生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー (G O) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の下方制御；

について評価することと、

(iii) 前記がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は T I G I T であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は L I G H T であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択される；又は

(B)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は S I R P α であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、

前記膜貫通タンパク質は 4-1 B B L であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択される、ことと、
を含む方法。

【請求項 57】

前記上方制御が健康な組織と比較したものである、請求項 54～請求項 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記上方制御が、抗 PD-1 療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較したものである、請求項 54～請求項 56 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 59】

前記上方制御が、前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較したものである、請求項 54～請求項 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記下方制御が健康な組織と比較したものである、請求項 54～請求項 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記下方制御が、抗 PD-1 療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較したものである、請求項 54～請求項 59 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 62】

前記下方制御が、前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較したものである、請求項 54～請求項 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記生物学的試料が、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である、請求項 54～請求項 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

前記生物学的試料が生検試料である、請求項 63 に記載の方法。

30

【請求項 65】

前記生検試料が、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X 線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記生物学的試料が、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む、請求項 54～請求項 65 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 67】

前記生物学的試料が、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる、請求項 54～請求項 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

前記生物学的試料が、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる、請求項 67 に記載

50

の方法。

【請求項 69】

前記生物学的試料が少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含む、請求項 64～請求項 68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記腫瘍が、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B 細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性 NHL；中悪性度のびまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度の小型非切断細胞 NHL；巨大病変 NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS 関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髓芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（gastric cancer）（胃腸がん（gastrointestinal cancer）を含む）；神経膠芽腫；肝がん（hepatic carcinoma）；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん（kidney or renal cancer）；喉頭がん；白血病；肝臓がん（liver cancer）；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん（stomach cancer）；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びに B 細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性 NHL；中悪性度びまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度小型非切断細胞 NHL；巨大病変 NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS 関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及び Meigs 症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん（renal carcinoma）；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記評価することが、DNA 配列決定、RNA 配列決定、免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA 及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる、請求項 54～請求項 70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記評価することが、前記試料を、

（i）細胞周期プロセスの正の調節、G1／S 転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκB キナーゼ／NFκB シグナル伝達の正の調節、I 型 IFN シグナル伝達経路、IFNγ に対する細胞応答、IFNα 産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及び MHC クラス I を介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示；並びに／あるいは

（ii）リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜への SRP 依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA 依存性 DNA 複製、及び ATP 生合成プロセス

から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する 1 又は複数の遺伝子によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって

行われる、請求項 54～請求項 71 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

前記評価することが、前記試料を、(a) IFN γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング／提示の負の調節、(c) I 型 IFN シグナル伝達経路、(d) IKK キナーゼ／NF κ B シグナル伝達及び抗原プロセッシングの正の調節、並びに (e) MHC クラス I を介した内因性ペプチドの提示から選択される遺伝子オントロジー (GO) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記評価することが、前記試料を、IFN γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 72 又は請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

前記評価することが、前記試料を、I 型 IFN シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 72～請求項 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

前記評価することが、前記試料を、

(i) 細胞周期プロセスの正の調節、G1/S 転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IKK キナーゼ／NF κ B シグナル伝達の正の調節、I 型 IFN シグナル伝達経路、IFN γ に対する細胞応答、IFN α 産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFN β 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及び MHC クラス I を介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示；並びに

(ii) リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜への SRP 依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA 依存性 DNA 複製、及び ATP 生合成プロセス

から選択される遺伝子オントロジー (GO) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の核酸の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 54～請求項 71 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記評価することが、前記試料を、(a) IFN γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング／提示の負の調節、(c) I 型 IFN シグナル伝達経路、(d) IKK キナーゼ／NF κ B シグナル伝達及び抗原プロセッシングの正の調節、並びに (e) MHC クラス I を介した内因性ペプチドの提示から選択される遺伝子オントロジー (GO) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記評価することが、前記試料を、IFN γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 76 又は請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記評価することが、前記試料を、I 型 IFN シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 76～請求項 78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

前記核酸のうちの 1 又は複数の核酸に特異的に結合する前記剤が核酸プライマー又はプローブである、請求項 76～請求項 79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

10

20

30

40

50

前記評価することが、前記患者を高リスク群又は低リスク群に分類する情報を与える、請求項 54～請求項 80 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

前記高リスク分類には、PD-1、PD-L1 及び／又は PD-L2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが高いことが含まれる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記低リスク分類には、PD-1、PD-L1 及び／又は PD-L2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが低いことが含まれる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

前記低リスク分類が、前記がん療法を保留することを指示する、請求項 81～請求項 83 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 85】

前記高リスク分類が、前記がん療法を実施することを指示する、請求項 81～請求項 83 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 86】

がんの処置を必要とする対象においてがんを処置するための方法であって、有効量の医薬組成物を必要とする対象に有効量の医薬組成物を投与することを含み、前記医薬組成物が、

N 末端－(a)－(b)－(c)－C 末端

を含むキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は TIGIT であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は LIGHT であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択され、あるいは

(B)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は SIRPα であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は 4-1BBL であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択され、

ここで、前記がんは、PD-1、PD-L1 及び／又は PD-L2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を有する抗チェックポイント剤に耐性であるか又は耐性であると考えられる、

方法。

【請求項 87】

前記リンカーが、フレキシブルアミノ酸配列、IgG ヒンジ領域又は抗体配列から選択されるポリペプチドである、請求項 54～請求項 86 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 88】

前記リンカーが、IgG1 又は IgG4 に由来するヒンジ－CH2－CH3 Fc ドメ

10

20

30

40

50

インを含む、請求項 54～請求項 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 89】

前記ヒンジャー-CH₂-CH₃ Fcドメインがヒト IgG1 又はヒト IgG4 に由来する、請求項 54～請求項 88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

前記リンカーが、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 112 又は配列番号 113 のアミノ酸配列と少なくとも 95%、又は少なくとも 96%、又は少なくとも 97%、又は少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記リンカーが、配列番号 49～95 から独立して選択される 2 つ以上の連結リンカーを含み、ここで、1 つの連結リンカーは、ヒンジャー-CH₂-CH₃ Fcドメインに対して N 末端側にあり、別の連結リンカーは、ヒンジャー-CH₂-CH₃ Fcドメインに対して C 末端側にある、請求項 54～請求項 90 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

前記第 1 のドメインが、配列番号 10 のアミノ酸配列と少なくとも 95%、又は少なくとも 96%、又は少なくとも 97%、又は少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 54～請求項 91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記第 1 のドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95%、又は少なくとも 96%、又は少なくとも 97%、又は少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 54～請求項 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 94】

前記第 1 のドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含む、請求項 54～請求項 93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

前記キメラタンパク質が、配列番号 11、配列番号 109 及び配列番号 110 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 95%、又は少なくとも 96%、又は少なくとも 97%、又は少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 54～93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

前記キメラタンパク質が組換え融合タンパク質である、請求項 54～請求項 95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

前記抗チェックポイント剤が、ニボルマブ (OPDIVO)、ペンブロリズマブ (KEYTRUDA)、ピジリズマブ (CT-011、CURETECH)、MK-3475 (MERCCK)、BMS936559、MPDL3280A (ROCHE)、セミプリマブ (LIBTAYO)、アテゾリズマブ (TECENTRIQ)、アベルマブ (BAVENCIO)、及びデュルバルマブ (imfinzi) から選択される抗体である、請求項 54～請求項 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

抗チェックポイント剤の投与を更に含む、請求項 86～請求項 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

前記抗チェックポイント剤が、ニボルマブ (OPDIVO)、ペンブロリズマブ (KEYTRUDA)、ピジリズマブ (CT-011、CURETECH)、MK-3475 (MERCCK)、BMS936559、MPDL3280A (ROCHE)、セミプリマブ (LIBTAYO)、アテゾリズマブ (TECENTRIQ)、アベルマブ (BAVENCIO)、及びデュルバルマブ (imfinzi) から選択される抗体である、請求項 98 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 100】

前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物及び前記抗チェックポイント剤が、同時に又は同時期に投与される、請求項 98 又は請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物が、前記抗チェックポイント剤が投与された後に投与される、請求項 98～請求項 100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物が、前記抗チェックポイント剤が投与される前に投与される、請求項 98～請求項 100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物の用量が、前記抗チェックポイント剤による処置を受けたことがない又は受けていない対象に投与される前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物の用量よりも少ない、請求項 98～請求項 102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

投与される前記抗チェックポイント剤の用量が、前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物による処置を受けたことがない又は受けていない対象に投与される抗チェックポイント剤の用量よりも少ない、請求項 98～請求項 103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

前記対象が、前記キメラタンパク質を含む前記医薬組成物による処置を受けただけの対象又は受けているだけの対象と比較して、胃腸炎症及び体重減少を伴わずに生存する可能性が高く、及び／又は腫瘍サイズ若しくはがん有病率が低減している、請求項 98～請求項 104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記対象が、前記抗チェックポイント剤による処置のみを受けた又は受けている対象と比較して、胃腸炎症及び体重減少を伴わずに生存する可能性が高く、及び／又は腫瘍サイズ若しくはがん有病率が低減している、請求項 98～請求項 105 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

患者のがん処置を決定する方法であって、

(I) 対象から生物学的試料を得ることと、

(II) 前記生物学的試料を、

(i) CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6 及び KRT1 から選択される遺伝子；並びに／又は

(ii) RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7 及び LRG1 から選択される遺伝子

の発現について評価することと、

(III) 工程 (II) の評価に基づいて前記がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N 末端－(a)－(b)－(c)－C 末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は TIGIT であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、

10

20

30

40

50

前記膜貫通タンパク質はLIGHTであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、又は

(B)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はSIRPαであり、

(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、

を含む、方法。

【請求項108】

がん処置のために患者を選択する方法であって、

(I)対象から生物学的試料を得ることと、

(II)前記生物学的試料を、

(i)CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／又は

(ii)RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子

の発現について評価することと、

(III)工程(II)の評価に基づいて前記がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N末端－(a)－(b)－(c)－C末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はTIGITであり、

(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はLIGHTであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、又は

(B)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はSIRPαであり、

(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、

を含む、方法。

【請求項109】

がんを処置する方法であって、

(I) 対象から生物学的試料を得ることと、

(II) 前記生物学的試料を、

(i) CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／又は

(ii) RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子

の発現について評価することと、を含み、

(III) 前記がん療法が、

N末端－(a)－(b)－(c)－C末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はTIGITであり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はLIGHTであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、又は

(B)

(a) は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はSIRPαであり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、

(IV) 任意に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することを含む、方法。

【請求項110】

前記生物学的試料が少なくとも1つの腫瘍細胞を含む場合に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法が選択され、

CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6、及びKRT1から選択される遺伝子が、健康な組織、前記対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、前記少なくとも1つの腫瘍細胞において上方制御されていない、及び／又は

RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子は、健康な組織、前記対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、前記少なくとも1つの腫瘍細胞において下方制御されていない、

請求項107～請求項109のいずれか一項に記載の方法。

【請求項111】

前記生物学的試料が少なくとも1つの腫瘍細胞を含む場合、

10

20

30

40

50

C D 2 7 4、B 2 M、S T A T 1、S T A T 2、T R I M 7、I R F 1、T A P 1、T A P 2、C A S P 1、I R F、L T B R、P V R、G A S T A 3、L R G 1、S P R Y 2、A R G 1、T R I M 8、T R I M 2、M A P K 8 I P 1、T R I M 6、及び K R T 1 から選択される遺伝子が、健康な組織、前記対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、前記少なくとも 1 つの腫瘍細胞において上方制御され、及び／又は

R P L 4 1、R P S 1 5、R P S 8、T R I M 7 及び L R G 1 から選択される遺伝子が、健康な組織、前記対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、前記少なくとも 1 つの腫瘍細胞において下方制御され、前記がん療法が、

10

N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は T I G I T であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は L I G H T であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 4 9 ~ 9 5 から選択される、又は

20

(B)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は S I R P α であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は 4 - 1 B B L であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 4 9 ~ 9 5 から選択される、

30

請求項 1 0 7 ~ 請求項 1 0 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

健康な組織と比較して、(b) (i) に列挙される 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す、請求項 1 0 7 ~ 請求項 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

健康な組織と比較して、(b) (i i) に列挙される 1 又は複数の遺伝子が下方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す、請求項 1 0 7 ~ 請求項 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 1 4】

抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較して、(b) (i) に列挙される 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す、請求項 1 0 7 ~ 請求項 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較

50

して、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す、請求項107～請求項113のいずれか一項に記載の方法。

【請求項116】

前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する応答の欠如、耐性又は不応性を生じることを示す、請求項107～請求項115のいずれか一項に記載の方法。

【請求項117】

前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する応答の欠如、耐性又は不応性を生じることを示す、請求項107～請求項116のいずれか一項に記載の方法。

【請求項118】

健康な組織と比較した、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対して応答することを示す、請求項107～請求項117のいずれか一項に記載の方法。

【請求項119】

健康な組織と比較した、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対して応答することを示す、請求項107～請求項118のいずれか一項に記載の方法。

【請求項120】

抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較した、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す、請求項107～請求項119のいずれか一項に記載の方法。

【請求項121】

抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較した、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す、請求項107～請求項120のいずれか一項に記載の方法。

【請求項122】

前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する応答の欠如を生じることを示す、請求項107～請求項121のいずれか一項に記載の方法。

【請求項123】

前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する応答の欠如を生じることを示す、請求項107～請求項122のいずれか一項に記載の方法。

【請求項124】

前記生物学的試料が、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である、請求項107～請求項123のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 5】

前記生物学的試料が生検試料であり、任意に、前記生検試料が、内視鏡生検、骨髓生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される、請求項 1 0 7～請求項 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記生物学的試料が、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髓、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髓検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む、請求項 1 0 7～請求項 1 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記生物学的試料が、掻き取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られ、任意に、前記生物学的試料が、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、リンス／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる、請求項 1 0 7～請求項 1 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記生物学的試料が少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含む、請求項 1 2 1～請求項 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記腫瘍が、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度のびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髓芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（gastric cancer）（胃腸がん（gastrointestinal cancer）を含む）；神経膠芽腫；肝がん（hepatic carcinoma）；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん（kidney or renal cancer）；喉頭がん；白血病；肝臓がん（liver cancer）；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん（stomach cancer）；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeningeal症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん（renal carcinoma）；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される、請求項 1 0 8、請求項 1 0 9又は請求項 1 2 8 に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 130】

前記評価することが、DNA 配列決定、RNA 配列決定、免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA 及び蛍光活性化細胞選別 (FACS) 又はそれらの組み合わせによって行われる、請求項 107～請求項 129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 131】

前記評価することが、前記試料を、(b) (i) 及び／又は (b) (ii) に列挙される 1 又は複数の遺伝子によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われ、任意に、1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する前記剤が、抗体、抗体様分子又はその結合性断片を含む、請求項 107～請求項 130 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 132】

前記評価することが、前記試料を、(b) (i) 及び／又は (b) (ii) に列挙される遺伝子に関連する 1 又は複数の遺伝子の核酸のうちの 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 107～請求項 131 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 133】

前記核酸のうちの 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する前記剤が核酸プライマー又はプローブである、請求項 132 に記載の方法。

20

【請求項 134】

患者のがん処置を決定する方法であって、

(I) 対象から生物学的試料を得ることと、

(II) Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1 及び Ras から選択される経路の活性化について前記生物学的試料を評価することと、

(III) 工程 (II) の評価に基づいて前記がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

30

(A)

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は TIGIT であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は LIGHT であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択される、又は

(B)

40

(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は SIRPα であり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は 4-1BBL であり、前記リンカーは、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49～95 から選択される、ことと、

を含む、方法。

【請求項 135】

50

がん処置のための患者を選択する方法であって、

(I) 対象から生物学的試料を得ることと、

(II) Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路の活性化について前記生物学的試料を評価することと、

(III) 工程(I)の評価に基づいて前記がん療法を選択することであって、前記がん療法が、

N末端－(a)－(b)－(c)－C末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はTIGITであり、

(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はLIGHTであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、又は

(B)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はSIRPαであり、

(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、

を含む、方法。

【請求項136】

がんを処置する方法であって、

(I) 対象から生物学的試料を得ることと、

(II) Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路の活性化について前記生物学的試料を評価することと、を含み、

(III) 前記がん療法が、

N末端－(a)－(b)－(c)－C末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はTIGITであり、

(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はLIGHTであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、又は

(B)

(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はSIRPαであり、

10

20

30

40

50

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、

(IVI) 任意に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することを含む、方法。

【請求項137】

PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法が、前記生物学的試料が少なくとも1つの腫瘍細胞を含む場合に選択され、

Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路は、健康な組織、前記対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、前記少なくとも1つの腫瘍細胞において上方制御されない、請求項134～請求項136のいずれか一項に記載の方法。

【請求項138】

前記生物学的試料が少なくとも1つの腫瘍細胞を含む場合、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路は、健康な組織、前記対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、前記少なくとも1つの腫瘍細胞において上方制御され、前記がん療法は、

N末端－(a)－(b)－(c)－C末端

の一般構造のキメラタンパク質を含み、

式中、

(A)

(a) は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はTIGITであり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はLIGHTであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、又は

(B)

(a) は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、前記膜貫通タンパク質はSIRPαであり、

(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、

(c) は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、前記膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、前記リンカーは、前記第1のドメインと前記第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、

請求項134～請求項137のいずれか一項に記載の方法。

【請求項139】

健康な組織と比較して、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す、請求項134～請

10

20

30

40

50

求項 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較して、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す、請求項 1 3 4 ～請求項 1 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対する応答の欠如、耐性又は不応性が生じることを示す、請求項 1 3 4 ～請求項 1 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

健康な組織と比較した、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対して応答することを示す、請求項 1 3 4 ～請求項 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較した、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん療法に対して応答することを示す、請求項 1 3 4 ～請求項 1 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる前記がん処置に対する応答の欠如が生じることを示す、請求項 1 3 4 ～請求項 1 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記生物学的試料が、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である、請求項 1 3 4 ～請求項 1 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記生物学的試料が生検試料である、請求項 1 3 4 ～請求項 1 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記生検試料が、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（C T）支援生検、磁気共鳴画像法（M R I）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記生物学的試料が、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液

10

20

30

40

50

、並びに／又はそれらからの細胞を含む、請求項 1 3 4～1 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記生物学的試料が、掻取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる、請求項 1 3 4～請求項 1 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記生物学的試料が、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記生物学的試料が少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含む、請求項 1 3 4～請求項 1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記腫瘍が、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B 細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性 NHL；中悪性度のびまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度の小型非切断細胞 NHL；巨大病変 NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS 関連リンパ腫；及びフルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髓芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（gastric cancer）（胃腸がん（gastrointestinal cancer）を含む）；神経膠芽腫；肝がん（hepatic carcinoma）；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん（kidney or renal cancer）；喉頭がん；白血病；肝臓がん（liver cancer）；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん（stomach cancer）；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びに B 細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性 NHL；中悪性度びまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度小型非切断細胞 NHL；巨大病変 NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS 関連リンパ腫；及びフルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及び Meigs 症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん（renal carcinoma）；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される、請求項 1 3 5、請求項 1 3 6 又は請求項 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記評価することが、DNA 配列決定、RNA 配列決定、免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA 及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる、請求項 1 3 4～請求項 1 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記評価することが、前記試料を、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1 及び Ras から選択される経路によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項 1 3 4～請求項 1 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 155】

1又は複数のタンパク質に特異的に結合する前記剤が、抗体、抗体様分子又はその結合性断片を含む、請求項154に記載の方法。

【請求項 156】

前記評価することが、前記試料を、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路に関連する1又は複数の遺伝子の核酸の1又は複数に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる、請求項134～請求項154のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 157】

前記核酸のうちの1又は複数に特異的に結合する前記剤が核酸プライマー又はプローブである、請求項156に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は、2020年12月3日に提出された米国仮出願第63/121,083号、2021年4月9日に提出された第63/173,090号、2021年6月28日に提出された第63/215,735号、2021年11月5日に提出された第63/276,066号の利益及び優先権を主張し、その各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、とりわけ、疾患の処置に見出すキメラタンパク質を含む組成物及び方法、並びにキメラタンパク質を使用した薬剤耐性がんの検出及び処置に関する。

【0003】

電子的に提出されるテキストファイルの説明

本明細書と共に電子的に提出されるテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形式のコピー（ファイル名：SHK-038PC2__ST25；作成日：2021年12月1日；サイズ177,048バイト）。

【背景技術】

【0004】

がん免疫療法の分野は、過去数年にわたって飛躍的に成長してきた。これは、多くの腫瘍タイプにおけるチェックポイント分子ファミリー（例えば、CTLA-4及びPD-1/L1）を標的とする抗体の臨床的有効性によって主に推進されてきた。しかしながら、この成功にもかかわらず、単剤療法としてのこれらの薬剤に対する臨床的応答は少数の患者で起こり（様々な固形腫瘍で10～45%）、これらの療法は副作用によって妨げられる。

【0005】

そのような薬剤の適切な用量及びレジメンの発見は、がんの有効な処置に重要である。投与及びレジメンを含む新規な処置戦略の開発は、ヒト免疫系の複雑さ、高コスト、及びそのような介入から生じ得る毒性の可能性を考慮すると、依然として困難な課題である。

【0006】

更に、薬物耐性は、依然として、免疫療法を含むがん処置における最大の課題の1つである。また、進行がんを有する患者は、腫瘍の縮小を助ける薬物を投与されるが、数週間又は数ヶ月後にがんが再発し、薬物はもはや作用しないことも一般的である。したがって、薬物耐性は、処置前に存在する（内因性又は一次耐性）か、又は処置後に発症する（獲得耐性）かのいずれかであり、主な死因の1つであるがんのほとんどの再発の原因である。したがって、薬剤耐性の機序をよりよく理解することが、将来のがん処置に対する指針を提供するために要求される。残念なことに、抗チェックポイント療法に耐性のがんを有する一部の患者に利用可能な有効な治療選択肢はほとんどない。

【0007】

そのため、薬剤耐性がん罹患している患者に対する新たな処置法、及び薬剤耐性がん患者に対して適切な薬剤を選択する方法が、がん患者の転帰を改善するために求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

様々な態様において、本技術は、がん免疫療法に有用な組成物及び方法を提供する。更に、本開示は、例えば抗PD-1耐性がんの遺伝子発現プロファイルに基づいて、がん処置のために患者を選択する方法及びがん処置のための方法を部分的に提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

一態様では、本開示は、がんの処置を必要とする対象のがんを処置する方法に関し、前記方法は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a)は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH2-CH3Fcドメインを含むリンカーであり、(c)は、ヒトLIGHT(リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。いくつかの実施形態では、投与されるキメラタンパク質の用量は、約0.0001mg/kg~約50.0mg/kgであり、任意に、約1mg/kg、約3mg/kg、約6mg/kg又は約10mg/kg、約12mg/kg、約15mg/kg、約18mg/kg、約20mg/kg、約22mg/kg、約25mg/kg、約27mg/kg、約30mg/kg、約33mg/kg、約35mg/kg、約37mg/kg、約40mg/kg、約42mg/kg、約45mg/kg、約48mg/kg及び約50mg/kgから選択される。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトであり、任意で、成体ヒトである。

【0010】

一態様では、本開示は、リンパ球の増殖の誘導を必要とする対象においてリンパ球の増殖を誘導するための方法に関し、前記方法は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a)は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH2-CH3Fcドメインを含むリンカーであり、(c)は、ヒトLIGHT(リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。

【0011】

一態様では、本開示は、リンパ球のマージネーション(margination)の誘導を必要とする対象においてリンパ球のマージネーションを誘導するための方法に関し、前記方法は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a)は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH2-CH3Fcドメインを含むリンカーであり、(c)は、ヒトLIGHT(リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。

【0012】

一態様では、本開示は、がん処置を必要とする対象において、がん処置の有効性を評価する方法に関し、前記方法は、(i)一般構造：N末端－(a)－(b)－(c)－C末端を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、式中、(a)はIgドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ－CH2－CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、(c)はヒトLIGHT(リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、ここで、用量は、約0.03mg/kg～約50mg/kgである、工程と、(ii)対象から生物学的試料を得る工程と、(iii)生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択されるサイトカインのレベル及び／又は活性を決定する工程と、(iv)対象が、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択される少なくとも1つのサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を有する場合、投薬を継続する工程と、を含む。

10

【0013】

一態様では、本開示は、がんの療法による処置のための対象を選択する方法に関し、前記方法は、(i)一般構造：N末端－(a)－(b)－(c)－C末端を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、式中、(a)はIgドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ－CH2－CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、(c)はヒトLIGHT(リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、ここで、用量は、約0.03mg/kg～約50mg/kgである、工程と、(ii)対象から生物学的試料を得る工程と、(iii)生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択されるサイトカインのレベル及び／又は活性を決定する工程と、(iv)対象が、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択される少なくとも1つのサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を有する場合、がん療法による処置に対して対象を選択する工程と、を含む。

20

30

【0014】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、(i)対象から生物学的試料を得ることと、(ii)試料を、細胞周期プロセスの正の調節、G1/S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生

40

50

合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御について評価することと、（iii）工程（b）の評価に基づいてがん処置を選択することであって、がん処置が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は（B）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

10

20

30

40

50

【0015】

一態様では、本開示は、がん処置のための患者を選択するための方法に関し、前記方法は、（i）対象から生物学的試料を得ることと、（ii）試料を、細胞周期プロセスの正の調節、G1／S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御；について評価することと、（iii）がん療法を選択することであって、がん療法が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は（B）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

【0016】

一態様では、本開示は、がん処置の方法に関し、前記方法は、（i）対象から生物学的試料を得ることと、（ii）試料を、細胞周期プロセスの正の調節、G1／S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、

抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御；について評価することと、（iii）がん療法を選択することであって、がん療法が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は（B）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

10

20

【0017】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

30

【0018】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

40

【0019】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1

50

療法に感受性であることが知られている患者と比較して、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0020】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置に対して応答することを示す。

【0021】

実施形態では、生物学的試料は、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である。実施形態では、生物学的試料は生検試料である。実施形態では、生物学的試料は、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髓、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髓検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む。

【0022】

実施形態では、生物学的試料は、少なくとも1つの腫瘍細胞を含む。

【0023】

実施形態では、評価することは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別(FACS)又はそれらの組み合わせによって行われる。

【0024】

実施形態では、評価することは、試料を、本明細書で同定される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

【0025】

実施形態では、評価することは、試料を、本明細書で同定される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の核酸の1又は複数に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

【0026】

実施形態では、評価することは、患者を高リスク群又は低リスク群に分類する情報を与える。実施形態では、高リスク分類には、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが高いことが含まれる。実施形態には、低リスク分類では、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが低いことが含まれる。

【0027】

実施形態では、上方制御は、健康な組織と比較したものである。実施形態では、上方制御は、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較したものである。実施形態では、上方制御は、対象から得られた以前の生物学的試料と比較したものである。実施形態では、下方制御は、健康な組織と比較したものである。実施形態では、下方制御は、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較したものである。実施形態では、下方制御は、対象から得られた以前の生物学的試料と比較したものである。

【0028】

一態様では、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてがんを処置するための方法に関し、有効量の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、医薬組成物が、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端を含むキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、ここで、がんは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を有する抗チェックポイント剤に耐性であるか、耐性であると考えられる。

【0029】

実施形態では、リンカーは、フレキシブルアミノ酸配列、IgGヒンジ領域又は抗体配列から選択されるポリペプチドである。実施形態では、リンカーは、IgG1又はIgG4に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。実施形態では、ヒンジ-CH2-CH3 FcドメインはヒトIgG1に由来する。実施形態では、ヒンジ-CH2-CH3 FcドメインはヒトIgG4に由来する。実施形態では、リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、リンカーは、配列番号49～95から独立して選択される2つ以上の連結リンカーを含み、ここで、1つの連結リンカーは、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインに対してN末端側にあり、別の連結リンカーは、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインに対してC末端側にある(one joining linker is N terminal to the hinge-CH2-CH3 Fc domain and another joining linker is C terminal to the hinge-CH2-CH3 Fc domain)。

【0030】

実施形態では、第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、第1のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、組換え融合タンパク質である。

【0031】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、（I）対象から生物学的試料を得ることと、（II）生物学的試料を、（i）CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／あるいは（ii）RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子の発現について評価することと、（III）工程（II）の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは（B）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

10

20

【0032】

一態様では、本開示は、がん処置のために患者を選択する方法に関し、前記方法は、（I）対象から生物学的試料を得ることと、（II）生物学的試料を、（i）CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／あるいは（ii）RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子の発現について評価することと、（III）工程（II）の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは（B）（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

30

40

【0033】

一態様では、本開示は、がんを処置する方法に関し、前記方法は、（I）対象から生物学的試料を得ることと、（II）生物学的試料を、（i）CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／ある

50

いは (i i) RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子の発現について評価することと、(III)がん療法が、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、(VI)任意に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することと、を含む。一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、(I)対象から生物学的試料を得ることと、(II)Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路の活性化について生物学的試料を評価することと、(III)工程(II)の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

10

20

30

40

50

【0034】

一態様では、本開示は、がん処置のために患者を選択する方法に関し、前記方法は、(I)対象から生物学的試料を得ることと、(II)Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路の活性化について生物学的試料を評価することと、(III)工程(II)の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインで

あり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

【0035】

一態様では、本開示は、がんを処置する方法に関し、前記方法は、(I)対象から生物学的試料を得ることと、(II)Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路の活性化について生物学的試料を評価することと、(III)がん療法が、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、(IV)任意に、PD-1、PD-L1及び/又はPD-L2の機能及び/又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することと、を含む。

【0036】

実施形態では、抗チェックポイント剤は、ニボルマブ(OPDIVO)、ペンブロリズマブ(KEYTRUDA)、ピジリズマブ(CT-011、CURETECH)、MK-3475(MERCK)、BMS936559、MPDL3280A(ROCHE)、センプリマブ(LIBTAYO)、アテゾリズマブ(TECENTRIQ)、アベルマブ(BAVENCIO)、及びデュルバルマブ(imfinzi)から選択される抗体である。

【0037】

実施形態では、方法は、抗チェックポイント剤の投与を更に含む。実施形態では、抗チェックポイント剤は、ニボルマブ(OPDIVO)、ペンブロリズマブ(KEYTRUDA)、ピジリズマブ(CT-011、CURETECH)、MK-3475(MERCK)、BMS936559、MPDL3280A(ROCHE)、センプリマブ(LIBTAYO)、アテゾリズマブ(TECENTRIQ)、アベルマブ(BAVENCIO)、及びデュルバルマブ(imfinzi)から選択される抗体である。実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物及び抗チェックポイント剤は、同時に又は同時期に投与される。実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、抗チェックポイント剤が投与された後に投与される。実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、抗チェックポイント剤が投与される前に投与される。

【0038】

本明細書に開示された任意の態様は、任意の他の態様と組み合わせられてもよい。

【0039】

特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面(複数可)を伴うこの特許又は特許出願公開の写しは、請求及び必要な料金の支払いに応じて特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1A】抗PD-1耐性CT26腫瘍の発生を示す。図1Aは、抗PD-1耐性CT2

10

20

30

40

50

6 腫瘍を作製するために使用される方法の概略図を示す。簡潔には、BALB/Cマウスに500,000個のマウス結腸がんCT26細胞を接種し、平均腫瘍体積が80~100mm³に達したとき(0日目を示す)、マウスを抗PD-1(クローンRMP1-14; BioXcell)抗体で処置した。腫瘍を切除し、生存腫瘍細胞を解離させ、インビトロで培養した。これらの細胞は、「第1ラウンド」、「第1世代」又は「F1世代」細胞と呼ばれた。第1世代細胞をBALB/Cマウスに接種し、抗PD-1「第2ラウンド」、「第2世代」又は「F2世代」細胞の別の処置経過後に単離した。更に2ラウンド後、(合計4ラウンド)の抗PD-1選択、「第4ラウンド」、「第4世代」又は「F4世代」細胞を単離した。

【図1B】抗PD-1耐性CT26腫瘍の発生を示す。図1Bは、CT26親細胞及びPD-1耐性細胞を有するBALB/Cマウスにおける抗PD-1抗体(100µgの抗PD-1クローンRMP1-14; BioXcell)の有効性を比較するグラフを示す。BALB/Cマウスに、CT26親細胞及びPD-1耐性第4世代細胞を後側腹部に接種した。出発腫瘍体積(STV)が80~100mm³に達したら、マウスを以下の2つの処置群に無作為に分けた:(1)ビヒクル(PBS)、及び(2)抗PD-1抗体。マウスに、0、3及び6日目にビヒクル又は100µgの抗PD-1(クローンRMP1-14; BioXcell)の一連の腹腔内注射を行った。腫瘍体積を指示された日に測定した。

【図2A】RNA-seqを使用した抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリングを示す。図2A(上のパネル)は、トランスクリプトーム発現に基づいて試料を空間的に分離した主成分分析(PCA)を示す。図2A(下のパネル)は、群間(親対第2世代、親対第4世代、第2世代対第4世代)で決定され、ヒートマップにプロットされた示差的発現遺伝子(DEG)を示す。遺伝子発現のサブセットが一方のデータセットではより低く(青色)、他方ではより高かった(赤色)場合、各比較において遺伝子を2つの主要なクラスターに分離した、各行で順序遺伝子をランク付けするために階層的クラスター化を行った。

【図2B】RNA-seqを使用した抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリングを示す。図2Bは、各データセットにおける上方制御遺伝子又は下方制御遺伝子を示す。各遺伝子セットに関連する遺伝子オンロジー(GO)を同定するために、遺伝子をPANTHERに入力した。遺伝子セットを、関連するp値とともに示す。

【図2C】RNA-seqを使用した抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリングを示す。図2C(上のパネル)は、全てのデータセット間の遺伝子発現の重複のベン図を示す。図2C(下のパネル)は、選択された遺伝子における100万当たりの転写物(TPM; 正規化式データ)を示し、PD-L1、抗原プロセッシング/提示、タンパク質翻訳、ER輸送に関連する遺伝子のより高いベースライン発現を実証し、いくつかのデータセットでは他のデータセットよりも高い。

【図2D】RNA-seqを使用した抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリングを示す。図2Dは、選択された遺伝子100万個当たりの転写物(TPM; 正規化式データ)を示し、PD-L1、抗原プロセッシング/提示、タンパク質翻訳、ER輸送に関連する遺伝子のより高いベースライン発現を実証し、いくつかのデータセットでは他のデータセットよりも高い。

【図3】PD-L1/2MHCクラスI及びB2Mにおける遺伝子発現及び細胞表面タンパク質発現に不一致があることを示す。親及び第4世代抗PD-1耐性細胞を培養物から採取し、PD-L1、PD-L2、MHCクラスI及びβ2ミクログロブリン(B2M)の表面発現についてフローサイトメトリーによって分析した。ゲートは示されるように描かれ、各プロットの上には各ゲート中の細胞のパーセンテージが示され、各パーセンテージの右側には各マーカーのMFI(平均蛍光強度)が示される。

【図4A】抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリングを示す。図4Aは、第2及び第4世代の抗PD-1耐性細胞株とB16.F10との比較において、マウス黒色腫瘍であり、これは、これらの腫瘍が抗PD-1療法に応答しないので、抗P

10

20

30

40

50

D-1「一次耐性」のモデルとして役立った。細胞をIFN γ 中で24時間培養して、インビトロ応答性を評価した。これは、免疫細胞が浸潤し、IFN γ のようなエフェクターサイトカインを分泌するので、腫瘍細胞がインビボでどのように応答するかを模倣する。図4A（左パネル）は、未処置親CT26とIFN γ 処置親CT26との間で同定されたDEGを示す。これらのうち、338個の遺伝子が他のデータセットから使用可能なデータを有しており、それらの値を他の列に示す。Log2倍率変化をヒートマップにプロットし、遺伝子を親CT26に基づいて階層的にクラスター化した。遺伝子を3つの主要なクラスターに分離した。図4A（右パネル）は、DEGに関連するGO経路を示す。関連遺伝子をPANTHERに入力して、調節不全遺伝子に関連する経路を同定した。

【図4B】抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリングを示す。図4Bは、選択された遺伝子における100万当たりの転写物（TPM；正規化発現データ）を示しており、CT26抗PD-1耐性細胞がI型インターフェロン及びII型インターフェロンのベースライン過剰活性化を有するにもかかわらず、それらの細胞をIFN γ でチャレンジした場合、それらの細胞はこれらの遺伝子を下方制御することを実証している。

【図5A】図5A～図5Dは、抗PD-1に対する獲得耐性に関連する特定の遺伝子の逆説的な調節不全を示す。第4世代の抗PD-1耐性細胞で過剰発現されるCD274（図5A）及びB2m（図5B）をコードする遺伝子は、野生型CT26細胞では過剰発現されるが、IFN γ の存在下では第4世代の抗PD-1耐性細胞では抑制される。一方、第4世代の抗PD-1耐性細胞で抑制されるTrim7（図5C）及びLrg1（図5D）をコードする遺伝子は、野生型CT26細胞では抑制されるが、IFN γ に应答して第4世代の抗PD-1耐性細胞では過剰発現される。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図5B】同上。

【図5C】同上。

【図5D】同上。

【図6A】抗PD-1に対する獲得耐性に関与するドライバー遺伝子及びドライバー遺伝子によって影響される機能的経路の同定を示す。図6A、パネル1～4は、ドライバー遺伝子の同定に使用される方法論を示す。図6A（パネル1）は、1,999個の遺伝子が下方制御され、3607個の遺伝子がCT26細胞と比べてIFN γ の存在下で第4世代抗PD-1耐性細胞において上方制御されることを示す。図6A（パネル2）は、第4世代抗PD-1耐性細胞を下方制御するが、CT26細胞を上方制御する1,060個の遺伝子を示す。図6A（パネル3）は、IFN γ に対する応答性に従って選別することによって明らかにされるように、CT26細胞と比べて第4世代抗PD-1耐性細胞を下方制御する688個の遺伝子を示す。図6A（パネル4）は、CT26細胞と比べて、第4世代抗PD-1耐性細胞においてインビボで上方制御した70個の遺伝子を示す。

【図6B】抗PD-1に対する獲得耐性に関与するドライバー遺伝子及びドライバー遺伝子によって影響される機能的経路の同定を示す。図6Bは、図6Aの方法論を使用して同定された遺伝子に関連する遺伝子オントロジー（GO）経路を示す。

【図6C】抗PD-1に対する獲得耐性に関与するドライバー遺伝子及びドライバー遺伝子によって影響される機能的経路の同定を示す。図6Cは、タンパク質のTRIMファミリーによって影響される機能的経路を示す。

【図6D】抗PD-1に対する獲得耐性に関与するドライバー遺伝子及びドライバー遺伝子によって影響される機能的経路の同定を示す。図6Dは、Elk1及びc-Junが役割を果たす機能的経路を示す。

【図6E】抗PD-1に対する獲得耐性に関与するドライバー遺伝子及びドライバー遺伝子によって影響される機能的経路の同定を示す。図6Eは、Lrg1、B2m及びArg1と他の遺伝子との間の機能的接続を示す。

【図6F】抗PD-1に対する獲得耐性に関与するドライバー遺伝子及びドライバー遺伝子によって影響される機能的経路の同定を示す。図6Fは、Cancer Genome

Atlas (TCGA) がゲノミクスプログラムにおける腫瘍及び周囲の正常組織におけるElk1の発現レベルを示す。

【図7A】IFN γ に応答して過剰発現されるStat1遺伝子が、第4世代の抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代の抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図7B】IFN γ に応答して過剰発現されるStat2遺伝子が、第4世代の抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代の抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図7C】IFN γ に応答して過剰発現されるIrf1遺伝子が、第4世代の抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代の抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図7D】IFN γ に応答して過剰発現されるTap1遺伝子が、第4世代の抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代の抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図8A】Ras及びRap1シグナル伝達経路の同定をもたらした示差的発現遺伝子の経路分析を示す。図8Aは、図6A（パネル2）の上位1,000遺伝子を使用したWEBベースのGene Set Analysis Toolkit (WebGestalt) を使用した経路の同定を示す。

【図8B】Ras及びRap1シグナル伝達経路の同定をもたらした示差的発現遺伝子の経路分析を示す。図8Bは、図8Aに提示されたデータのボルケーノプロットを示す。

【図8C】Ras及びRap1シグナル伝達経路の同定をもたらした示差的発現遺伝子の経路分析を示す。図8Cは、RASシグナル伝達経路を示す。Raf/Mek/Erkシグナル伝達による収束は、楕円を使用して示されている。

【図8D】Ras及びRap1シグナル伝達経路の同定をもたらした示差的発現遺伝子の経路分析を示す。図8Dは、RAP1シグナル伝達経路を示す。Raf/Mek/Erkシグナル伝達による収束は、楕円を使用して示されている。

【図9A】IFN γ に応答して過剰発現されるCcl5 (RANTES) 遺伝子が、第4世代抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図9B】IFN γ に応答して過剰発現されるCxc10 (IP-10) 遺伝子が、第4世代抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図9C】IFN γ に応答して過剰発現されるIfnb1遺伝子が、第4世代抗PD-1耐性細胞において過剰発現され、IFN γ の存在下で第4世代抗PD-1耐性細胞において抑制されることを示す。第2世代の抗PD-1耐性細胞は中間の表現型を示す。

【図10A】TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図10Aは、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の分子モデルを示し、これはは、中央IgG4 Fcドメインの二量体化及びTNFリガンドドメインの三量体化を伴う、PDB (タンパク質データバンク) 構造に基づくLIGHT三量体の2つの機能的セットを有する六量体として存在する。

【図10B】TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図10Bは、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の特性決定を示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然の状態及び多量体を形成する傾向を実証する。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の未処理試料 (すなわち、還元剤又は脱グリコシル化剤なしで、まだ煮沸されている) を、各ブロットのNRとしてマークしたレーンにロードした。Rと表示したレーンの試料を還元剤 β -メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークされたレーン内の試料を脱グリコシル化剤、還元剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークされたレーンは、タンパク

10

20

30

40

50

質サイズのラダーを含んでいた。抗 T I G I T 抗体（左のプロット）、抗 F c 抗体（中央のプロット）又は抗 L I G H T 抗体（右のプロット）を使用して、キメラタンパク質の個々のドメインをプローブした。

【図 10 C】 T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図 10 C は、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質のチェックポイント標的（P V R）並びに骨髄細胞、C D 8 + T 細胞及び N K 細胞上に見出される免疫共刺激受容体（L T β R 及び H V E M）への同時結合を実証する M e s o S c a l e D i s c o v e r y（M S D）E L I S A アッセイを示す。

【図 10 D】 T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図 10 D は、細胞表面受容体結合（h P V R、h H V E M 及びヒト L T β R を発現する A 3 7 5 細胞を発現するように操作された C H O K 1 細胞を使用する）を評価するために開発された細胞ベースの結合アッセイを示す。

【図 10 E】 T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図 10 E は、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質による J u r k a t エフェクター細胞における下流シグナル伝達の活性化を示す。N F κ B / N I K レポーター細胞を組換え F c - L I G H T 対照又は T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質（それぞれ 1 8 n M）とインキュベーションし、シグナル伝達活性をルシフェラーゼ検出によって評価した。

【図 10 F】 T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図 10 F は、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質（又はマウス代用物、両方とも 1 0 n M）が、スーパー抗原 S E B と 3 日間共培養したヒト P B M C 又はマウス脾細胞で評価されるように、I L - 2 誘導によって T 細胞を活性化することを示す。

【図 10 G】 T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図 10 G は、J u r k a t エフェクター細胞（市販の 2 細胞レポーター系の一部）が、フローサイトメトリーを使用して示すように T I G I T、D N A M - 1 及び H V E M を発現することを示す。

【図 10 H】 T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の構築及び特性決定を示す。図 10 H は、J u r k a t エフェクター及び C H O / h P V R レポーター細胞の活性化を示す。これらの細胞を、I g G 4 コントロール、D N A M - 1 ブロッキング抗体、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質、又は L I G H T ブロッキング抗体と 6 時間プレインキュベートした T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質と（全て 1 5 0 n M で）共培養し、その後、ルシフェラーゼシグナル伝達活性を、ルミノメーターを使用して評価した。

【図 11】 示されるように処置されたマウスにおけるビヒクル単独処置マウスと比較した、C T 2 6（左パネル）、C T 2 6 抗 P D - 1 耐性細胞（中央パネル）又は B 1 6 . F 1 0（右パネル）同種移植片の腫瘍成長阻害を示す。点線は、抗 P D - 1 抗体（クローン 1 0 F . 9 G 2）によって引き起こされた腫瘍増殖阻害の量を示す。

【図 12 A】 がんに対する T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図 12 A は、個々の動物腫瘍成長曲線、各群が腫瘍負荷量に達した平均日、及び処置に応答して腫瘍を完全に拒絶したマウスの数を示す。

【図 12 B】 がんに対する T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図 12 B は、実験の経過にわたって C T 2 6 結腸直腸がん腫瘍、抗 P D - 1 耐性 C T 2 6 腫瘍又は B 1 6 . F 1 0 腫瘍の同種移植片を有するマウスの全生存を示す Kaplan - M e i e r 曲線を示す。

【図 12 C】 がんに対する T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図 12 C は、C T 2 6 野生型腫瘍を有し、2 0 0 μ g のマウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質（m T I G I T - F c - L I G H T）、又は 1 0 0 μ g の抗 L T β R、抗 T I G I T、F c - L I G H T、抗 P D - 1、抗 P D - L 1、又は示された組み合わせで処置したマウスの個々の動物腫瘍成長曲線を示す。群全体が腫瘍負荷量に達した平均日（点線でも示す）、及び腫瘍を完全に拒絶したマウスの数／分析した群

10

20

30

40

50

全体の大きさも示す。

【図12D】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Dは、図12Cからの経時変化の36日目までのカプラン・マイヤー生存プロットを示す。

【図12E】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Eは、B16.F10腫瘍を有し、200 μ gのmTIGIT-Fc-LIGHT、又は100 μ gの抗TIGIT、Fc-LIGHT、抗PD-1、抗PD-L1、又は、又は示された組み合わせで処置したマウスの個々の動物腫瘍成長曲線を示す。群全体が腫瘍負荷量に達した平均日（点線でも示す）、及び腫瘍を完全に拒絶したマウスの数／分析した群全体の大きさも示す。

10

【図12F】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Fは、図12Eからの経時変化の36日目までのカプラン・マイヤー生存プロットを示す。

【図12G】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Gは、腫瘍接種の7日後（0日目、3日目、6日目の処置後）の、抗原特異的CD8+T細胞（AH1+）及びCT26結腸直腸がん腫瘍又は抗PD-1耐性CT26腫瘍（CT26/AR）に浸潤するNK細胞の割合を示す。

【図12H】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Hは、B16.F10モデルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ活性に対するCD4+T、CD8+T又はNK細胞枯渇の影響を示す。B16.F10腫瘍が112.57mm³の平均開始腫瘍体積（STV）に達したとき、0日目を示す。マウスを、-1日目、1日目及び7日目に一連のCD4、CD8又はNK枯渇抗体で処置した。マウスに、0日目、3日目、及び6日目に3回のIP注射を行い、それぞれ200mgのmTIGIT-Fc-LIGHTからなり、0日目から11日目までの腫瘍体積の変化をプロットした。

20

【図12I】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Iは、抗PD-1耐性CT26腫瘍を有し、200 μ gのmTIGIT-Fc-LIGHT、又は100 μ gの抗TIGIT、Fc-LIGHT、抗PD-1、抗PD-L1、又は示された組み合わせで処置したマウスの個々の動物腫瘍成長曲線を示す。群全体が腫瘍負荷量に達した平均日（点線でも示す）、及び腫瘍を完全に拒絶したマウスの数／分析した群全体の大きさも示す。

30

【図12J】がんに対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビボ有効性を示す。図12Jは、図12Iからの経時変化の36日目までのカプラン・マイヤー生存プロットを示す。

【図12K】示された用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスにおける全CD8+細胞の誘導を示す。

【図12L】示された用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスにおける全CD4+DNAM1+細胞の誘導を示す。

【図12M】示された用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスにおける全CD4+細胞の誘導を示す。

40

【図12N】示された用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスにおける全CD11b+細胞の誘導を示す。

【図12O】示された用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスにおける活性化CD11b+CD80+細胞の誘導を示す。

【図12P】示された用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスにおける活性化CD11b+CD86+細胞の誘導を示す。

【図13A】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Aは、TCGAがんにわたる53個の免疫共刺激遺伝子の相対的発現を示すヒートマップを示し、全ての腫瘍型にわたる高平均発現から低平均発現に基づいて順位付けした。

50

【図13B】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Bは、全てのTCGA腫瘍タイプにわたるTNFRSF14、CD226及びLTBRの正規化された発現レベルを同じスケールでプロットして、これらの標的遺伝子の相対的なmRNA発現を互いに対して示すことを示す。

【図13C】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Cは、ナイーブCD8+T細胞(Tn)及びT幹細胞メモリーCD8+T細胞(Tscm)におけるHVEM及びDNAM-1の相対レベルを示す。磁気分離を使用して健康なドナーPBMCから単離されたヒトナイーブCD8+T細胞を、CD3/CD28ビーズ、ヒト組換えIL-2及びGSK3β阻害剤TWS119を含むAIMV培地中で9日間培養した。この時間経過後、ナイーブCD8+T細胞(Tn)及びT幹細胞メモリーCD8+T細胞(Tscm)を特徴付ける以前に同定された抗体パネルに従って、細胞を単離し、フローサイトメトリーによって評価した。HVEM及びDNAM-1の相対レベルを、Tscm及びTn細胞の両方にわたって示し、定量する。

【図13D】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Dは、ImmuneExpによるSeurat同定クラスター(上)及びSingleR免疫細胞サブタイプ(下)における均一多様体近似及び投影(UMAP)空間的構成を示す。AIMV培地中で2日間培養したヒトPBMCを単離し、単一細胞RNAシーケンシング(scRNA-seq)に供した。UMAP空間組織化を、Seuratによって同定されたクラスター(上)及びSingleRを使用して評価して、ImmuneExp(下)に従って免疫細胞サブタイプをプロットした。

【図13E】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Eは、Seuratによって同定されたクラスターにわたる53個の免疫共刺激遺伝子の相対的発現を示すヒートマップを示す。遺伝子は、全てのクラスターにわたる高平均発現から低平均発現に基づいて順位付けされる。発現の強さは、各列の最小値及び最大値に基づいて示されている。目的の3つの遺伝子、TNFRSF14(HVEM)、CD226(DNAM-1)、及びLTBR(LTβR)が強調されている。

【図13F】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Fは、Seuratによって同定されたクラスターにわたるTNFRSF14、CD226及びLTBRの正規化された発現レベルを同じスケールでプロットして、これらの標的遺伝子の相対的なmRNA発現を互いに対して示すことを示す。

【図13G】様々な末梢血細胞サブタイプにわたる、並びにヒト及びマウスTIL内での免疫共刺激受容体の発現を示す。図13Gは、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)マウスCT26野生型結腸直腸(CT26/WT)腫瘍、CPI獲得耐性を発現するように操作されたCT26腫瘍(CT26/AR)、又はB16.F10黒色腫瘍をそれぞれのレシピエントマウスに接種した場合のHVEM及びDNAM-1の相対的な細胞表面発現を示す。腫瘍を確立させ、80~110mm³(最初の接種から約10~14日後)に達したとき、腫瘍を切除し、解離させ、得られた腫瘍浸潤リンパ球(TIL)をフローサイトメトリーによって評価した。HVEM及びDNAM-1の相対的な細胞表面発現を、NK細胞(CT26腫瘍中のNKP46+細胞及びB16.F10腫瘍中のNK1.1上でゲート)及びCD8+T細胞(CD3+CD8+細胞上でゲート)において評価した。

【図14A】TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髓細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。ヒトドナーPBMCを未処理(UT)又はTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のIgG1若しくはIgG4変異体を含むAIMV培地中で培養し、TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHTキメラタンパク質又はG1及びTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質又はG4と呼ばれる。図14Aは、7日間培養したPBMC+/TIGIT-Fc

c (IgG1) - LIGHT又はTIGIT-Fc (IgG4) - LIGHTキメラタンパク質の位相差画像を示し、プレートへの細胞の付着及び紡錘様骨髄形態の形成を示す。

【図14B】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Bは、PBMC培養物の増殖／集密度をIncucyteタイムラプスイメージャーでインキュベートし、150nMのTIGIT-Fc (IgG4) - LIGHTの存在下又は非存在下で6日間の時間経過にわたって増殖／集密度を評価したことを示す。4つの視野にわたって3人のドナーのそれぞれについて20×画像を二連で撮影した。

【図14C】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Cは、Mesoscale Discovery (MSD) ELISAアッセイを使用して培養上清において評価される、TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質によって誘導されるサイトカインを示す。培養2日後、上清を除去し、MSDマルチプレックスサイトカインパネルを使用して一連のサイトカインを評価した。

【図14D】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Dは、単一細胞RNAシーケンシングによって評価した場合の示差的発現遺伝子 (DEG) の数を示す。2日目に、未処理 (UT)、TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT処理 (G1) 及びTIGIT-Fc (IgG4) - LIGHT処理 (G4) PBMC単一細胞を単離し、単一細胞RNA配列決定に供した。TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT及びTIGIT-Fc (IgG4) - LIGHTキメラタンパク質と未処理群との間で、図13D及び図13Eで同定された16個の各Seuratクラスターにわたって示差的に発現された遺伝子 (DEG) を同定した。

【図14E】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Eは、16個全てのSeuratクラスターにわたって特定されたDEGでの発現の相対差を示すヒートマップを示す。目的の遺伝子は、骨髄系細胞、NK細胞及びCD8+T細胞集団に対応するクラスターで標識される。

【図14F】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Fは、未処理、TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT及びTIGIT-Fc (IgG4) - LIGHTデータセットの均一多様体近似及び投影 (UMAP) 空間分布を示す。骨髄系細胞、NK細胞及びCD8+T細胞に対応する細胞の集団 (ImmuneExp注釈を使用して同定される) を強調し、処置群全体でそれらのゲートに入る細胞の割合を示す。

【図14G】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Gは、進化的関係 (PANTHER) によるタンパク質分析によって同定された、TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質誘導性示差的発現遺伝子 (DEG) に関連する経路を示す。DEGの数及び方向性が示されている。遺伝子オントロジー分析 (PANTHERを使用) を、上方制御遺伝子及び下方制御遺伝子のリストに対して行い、有意に濃縮された経路 (FDR p値<0.05) を示す。

【図14H】TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質が、Fc組成にかかわらず、骨髄細胞、T細胞及びNK細胞を直接活性化することを示す。図14Hは、未処置マウスと比較した、TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT及びTIGIT-Fc (IgG4) - LIGHTキメラタンパク質で処置したマウス由来のヒトPBMCから単離した骨髄細胞の倍率変化を示す。

【図15】ビヒクルのみ、抗TIGIT抗体 (クローン1G9)、抗PD-1抗体 (クローンRPM1-14)、抗TIGITと抗PD-1抗体との組み合わせ、TIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質、及びTIGIT-Fc - LIGHTキメラタンパク質と抗PD-1抗体との組み合わせで処置したマウスにおけるCT26又は抗PD-1耐性

10

20

30

40

50

CT26 (CT26 / AR) 腫瘍同種移植片の腫瘍体積を示す。

【図16】例示的なヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の構造を示すイラスト（上のパネル）、及びヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の特性決定を示すウエスタンブロット（下のパネル）を示す。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然の状態及び多量体を形成する傾向を実証する。分子量マーカーを各ブロットの第1のレーンにロードした。ヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤又は脱グリコシル化剤なしで、まだ煮沸されている）を各ブロットの第2レーンにロードした。還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した試料を、各ブロットの第3のレーンにロードした。各ブロットの第4レーンの試料を脱グリコシル化剤、還元剤で処理し、煮沸した。抗ヒトSIRPα抗体（左のブロット）、抗Fc（H+L）抗体（中央のブロット）又は抗4-1BBL抗体（右のブロット）を使用して、キメラタンパク質の個々のドメインをプローブした。

10

【図17A】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを使用して測定した、ヒトCD47、ヒト4-1BBに対するヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図17Aは、ヒトCD47-HisへのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合を示す。

【図17B】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを使用して測定した、ヒトCD47、ヒト4-1BBに対するヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図17Bは、ヒト4-1BB-HisへのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合を示す。

20

【図17C】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを使用して測定した、ヒトCD47、ヒト4-1BBに対するヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図17Cは、ヒト4-1BB-His及びCD47-HisへのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の同時期の結合を示す。

【図18A】4-1BBを発現する細胞へのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質による結合及び細胞の活性化を示す。図18Aは、フローサイトメトリーによってアッセイした場合の、4-1BBを過剰発現するHT1080細胞へのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合を示す。

【図18B】4-1BBを発現する細胞へのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質による結合及び細胞の活性化を示す。図18Bは、フローサイトメトリーによってアッセイした場合の、4-1BBを過剰発現するHT1080細胞へのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の結合を示す図の定量化を示す。

30

【図18C】4-1BBを発現する細胞へのヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質による結合及び細胞の活性化を示す。図18Cは、ヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質によって誘導される4-1BB / 4-1BBLシグナル伝達に応答したIL-8分泌を示す。

【図19】例示的なマウスSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の構造を示すイラスト（上のパネル）、及びマウスSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の特性決定を示すウエスタンブロット（下のパネル）を示す。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然の状態及び多量体を形成する傾向を実証する。分子量マーカーを各ブロットの第1のレーンにロードした。マウスSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤又は脱グリコシル化剤なしで、まだ煮沸されている）を各ブロットの第2レーンにロードした。還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した試料を、各ブロットの第3のレーンにロードした。各ブロットの第4レーンの試料を脱グリコシル化剤、還元剤で処理し、煮沸した。抗マウスSIRPα抗体（左のブロット）、抗Fc（H+L）抗体（中央のブロット）又は抗4-1BBL抗体（右のブロット）を使用して、キメラタンパク質の個々のドメインをプローブした。

40

【図20A】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを用いて測定した、マウスCD47、マウス4-1BBに対するマウスSIRPα-Fc-

50

4-1 BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図20Aは、抗マウスFc抗体へのマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の結合を示す。

【図20B】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを用いて測定した、マウスCD47、マウス4-1 BBに対するマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図20Bは、マウス4-1 BB-HisへのマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の結合を示す。

【図20C】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを用いて測定した、マウスCD47、マウス4-1 BBに対するマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図20Cは、マウスCD47-HisへのマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の結合を示す。

【図20D】Meso Scale Discovery (MSD) プラットフォームを用いて測定した、マウスCD47、マウス4-1 BBに対するマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の結合分析を示す。図20Dは、マウス4-1 BB-His及びCD47-HisへのマウスSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質の同時期の結合を示す。

【図21A】CT26同種移植モデル及び第4世代抗PD-1耐性細胞におけるSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質及び抗PD-1抗体の抗腫瘍活性の比較を示す。図21Aは、時間の関数としての平均腫瘍成長の折れ線グラフを示す。

【図21B】CT26同種移植モデル及び第4世代抗PD-1耐性細胞におけるSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質及び抗PD-1抗体の抗腫瘍活性の比較を示す。図21Bは、17日目の腫瘍体積を示す棒グラフを示す。

【図21C】CT26同種移植モデル及び第4世代抗PD-1耐性細胞におけるSIRPα-Fc-4-1 BBLキメラタンパク質及び抗PD-1抗体の抗腫瘍活性の比較を示す。図21Cは、Kaplan-Meier生存曲線を示す。

【図22A】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Aは、リンパ球の用量依存的な減少又はマージネーションを示す。

【図22B】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Bは、CD3+T細胞の減少又はマージネーションを示す。

【図22C】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Cは、投与後2時間のサイトカインシグネチャに基づく動物の主成分分析(PCA)分布を示す。

【図22D】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Dは、PCAベクタープロットにおける炎症誘発性サイトカインの用量後2時間のサイトカインシグネチャを示す。

【図22E】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Eは、Meso Scale Discovery (MSD) アッセイを用いて評価されるサイトカイン応答を示す。

【図22F】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Fは、IL-2の誘導倍数を示す。

【図22G】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Gは、IP-10の誘導倍数を示す。

【図22H】カニクイザルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の薬力学的(PD)活性を示す。図22Hは、第1、第2及び第3の投与中及び投与後のCXCL-10のレベルを示す。

【図23A】mRNA及び細胞表面発現を用いた免疫細胞表現型分析を示す。図23Aは、単離されたT幹細胞メモリー(Tscm)、Tセントラルメモリー(Tcm)、Tエフェクターメモリー(Tem)及びナイーブT細胞(Tn)に関する以前に公開されたAffymetrixマイクロアレイデータの分析を示す。データを、TNFRSF14(H

10

20

30

40

50

V E M)、C D 2 2 6 (D N A M - 1) 及び T I G I T の発現について分析した。

【図 2 3 B】mRNA 及び細胞表面発現を用いた免疫細胞表現型分析を示す。図 2 3 B は、2 つの追加の免疫遺伝子セット注釈における均一多様体近似及び投影 (U M A P) 空間構成を示す。図 1 3 D に示すヒト P B M C s c R N A - s e q データの U M A P 空間分布を評価するために、H P C A (H u m a n P r i m a r y C e l l A t l a s) 及び N o v e r s h t e r n (P h y s i c a l M o d u l e N e t w o r k s) を使用した。

【図 2 3 C】mRNA 及び細胞表面発現を用いた免疫細胞表現型分析を示す。図 2 3 C は、抗マウス C D 3 / C D 2 8 ビーズ及び I L - 2 で 2 日間刺激したマウス T 細胞、又はマウス N K 細胞 (両方とも健康な動物の脾臓から単離した) 上の T I G I T、D N A M - 1 及び H V E M の細胞表面発現を評価するために使用したフローサイトメトリー分析の結果を示す。T 細胞を N K P 4 6 上の C D 3 及び N K 細胞上でプレゲートした。

【図 2 4 A】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定を示す。図 2 4 A は、非還元、還元、及び還元 + 脱グリコシル化条件下で、各ドメインをプローブした抗体 (T I G I T、F c、及び L I G H T) を使用したウエスタンブロットによって評価される、マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質代用物 (m T I G I T - F c - L I G H T と呼ばれる) の特性決定を示す。

【図 2 4 B】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定を示す。図 2 4 B は、組換えヒト N e c t i n - 4 に対するヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の結合を、M S D を用いて評価したことを示す。

【図 2 4 C】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定を示す。図 2 4 C (左パネル) は、ヒト健康ドナー及びがん患者から採取した血清試料中の D c R 3 のレベルを示す。図 2 4 C (右パネル) は、可溶性 D c R 3 の存在下での H V E M へのヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の結合を示す。血清可溶性 D c R 3 が H V E M への T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質結合を妨害し得るかどうかを評価するために、二重効力アッセイを、各血清試料において独立して氷上で 2 0 分間ブレインキュベートした T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質を用いて行った。次いで、M S D プラットフォームを使用して二重効力アッセイを実行した。

【図 2 4 D】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定を示す。図 2 4 D は、組換え標的に対するマウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質 (m T I G I T - F c - L I G H T) の結合を E L I S A によって評価したことを示す。マウス L T β R 発現 C H O - K 1 細胞への結合を、フローサイトメトリーを使用して評価した。

【図 2 4 E】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定を示す。図 2 4 E は、フローサイトメトリーを用いて評価したときの、C T 2 6 / W T、C T 2 6 / A R 及び B 1 6 . F 1 0 腫瘍細胞への m T I G I T - F c - L I G H T の結合を示す。

【図 2 4 F】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定を示す。図 2 4 F は、切断型カスパーゼ 3 / 7 蛍光を経時的に評価した I n c u c t y e プラットフォームを用いて評価した場合の、N K 細胞又は C D 8 + T 細胞による C T 2 6 腫瘍細胞の殺傷を増強する m T I G I T - F c - L I G H T の能力 (抗マウス C D 3 / C D 2 8 ビーズで 2 日間刺激) を示す。

【図 2 4 G】マウス T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子及びヒト T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質分子のマウス代用物及び機能的活性の特性決定

10

20

30

40

50

を示す。図24Gは、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質によるCXCL8及びCCL2の遺伝子発現の誘導を示す。ヒトA375細胞を抗LTβRアゴニスト抗体又はTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と3時間インキュベートした。RNAを採取し、逆転写し、ACTB、GAPDH、CXCL8及びCCL2の遺伝子発現をqPCRを用いて評価した。

【図25A】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Aは、非還元、還元及び還元+脱グリコシル化条件下で、各ドメイン（TIGIT、Fc、及びLIGHT）をプローブした抗体を用いたウエスタンブロットによるTIGIT-Fc（IgG1）-LIGHTキメラタンパク質分子の評価を示す。

10

【図25B】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Bは、ヒトPBMC+/-TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT（それぞれ150nM）を用いて実施したAIMV増殖アッセイの結果を示す。Promega MTS増殖アッセイ（右）を使用して、培養物の増殖能力に加えて、2日目（左）に細胞形態を評価した。

【図25C】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Cは、TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHTキメラタンパク質を使用して標的受容体への結合を実証するために行われたMSD受容体結合アッセイを示す。IgG1分子はまた、エフェクターFcガンマ受容体（10μg/mLの薬物濃度）と係合することが示される。

20

【図25D】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Dは、図14A～図14Cに示される同じドナーPBMCからの2日目のAIMV PBMC培養物を使用したサイトカイン分析を示す。サイトカインを、PBMCをFcエフェクターコンピテントTIGIT抗体+/-抗PD-1（ペンブロリズマブ）（全て150nM）で処理したMSDマルチプレックスを使用して評価した。未処理のバーは、図14Cに示されているものと同一である。

30

【図25E】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Eは、未処理（UT）、TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT及びTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT処理群から生成されたヒトPBMC scRNA-seqデータセットからのTIGIT、LTBR、TNFRSF14、CD226、PVR、PVRL2、PVRL3及びNECTIN4の空間発現のUMAP図を示す。

【図25F】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Fは、scRNA-seqデータセットから単離された目的の遺伝子からの正規化された発現を示す。

40

【図25G】HVEM+及びLTβR+免疫細胞を刺激する際のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT又はTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT）活性を示す。図25Gは、TIGIT-Fc（IgG1）-LIGHT処置群とTIGIT-Fc（IgG4）-LIGHT処置群との間で示差的に発現された遺伝子の評価を示しており、とりわけ、データセットがほぼ同一であることを示している（2倍超又は2倍未満の倍率変化、及び調整されたp値<0.05）。

【図26A】TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図2

50

6 A は、図 1 2 C に示される追加の C T 2 6 / W T 処置群からのカプラン・マイヤー生存曲線を示す。

【図 2 6 B】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 B は、市販のマウス抗 L T β R 抗体の抗腫瘍活性を示す。

【図 2 6 C】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 C は、続発性腫瘍に対する記憶免疫応答の評価の結果を示す。最初の処置の 2 9 日後に入手可能であったマウスに、対向側腹部に第 2 の C T 2 6 腫瘍を接種し、その後の再処置は行わなかった。二次腫瘍の成長を、記憶免疫応答が処置動物において生じたかどうかの指標として経時的に評価した。ビヒクル処置群は、腫瘍成長の基準として C T 2 6 腫瘍を接種した新しいマウスからなる。

【図 2 6 D】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 D は、二重陽性エフェクターメモリー T 細胞 (D E P C) を示す。再チャレンジした動物において、末梢血を 3 9 日目に回収し、二重陽性エフェクター記憶 T 細胞 (D E P C) をフローサイトメトリーを用いて評価した。

【図 2 6 E】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 E は、解離した腫瘍における腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の分析を示す。処置動物のコホートでは、最初の処置の 9 日後に腫瘍を単離し、次いで解離させ、得られた細胞をフローサイトメトリーによって分析した。

【図 2 6 F】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 F は、解離した腫瘍におけるサイトカインの分析を示す。L u m i n e x マルチプレックスアレイを使用して、解離した腫瘍からの上清をサイトカイン発現について評価した。

【図 2 6 G】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 G は、図 1 2 F に示される追加の B 1 6 . F 1 0 処置群からのカプラン・マイヤー生存曲線を示す。

【図 2 6 H】T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の抗腫瘍活性を示す。図 2 6 H は、- 1 日目、1 日目及び 7 日目 (末梢血採取前) の 3 回の I P 投与後の第 7 日目の末梢血中の C D 4 / C D 8 T 細胞又は N K 細胞枯渇のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 2 7 A】C T 2 6 / A R モデルからの更なる活性及び抗腫瘍有効性データを示す。図 2 7 A は、図 1 2 J に示される更なる C T 2 6 / A R 処置群からのカプラン・マイヤー生存曲線を示す。

【図 2 7 B】C T 2 6 / A R モデルからの更なる活性及び抗腫瘍有効性データを示す。図 2 7 B は、C l u s t a l O m e g a 多重配列アラインメントを使用した、C D 2 2 6 及び H V E M の細胞質部分のアミノ酸アラインメントを示す。D N A M - 1 の P D - 1 調節に以前に関連していた残基に下線を引く。

【図 2 7 C】C T 2 6 / A R モデルからの更なる活性及び抗腫瘍有効性データを示す。図 2 7 C は、全 C D 3 + 単核細胞 (M N C) の中の抗原特異的 C D 8 + T 細胞 (C D 8 + A H 1 テトラマー+) のパーセンテージを示す、フローサイトメトリーによる T I L 分析を示す。

【図 2 7 D】C T 2 6 / A R モデルからの更なる活性及び抗腫瘍有効性データを示す。図 2 7 D は、全 C D 3 - M N C のうちの N K 細胞 (N K P 4 6 +) の割合を示すフローサイトメトリーによる T I L 分析を示す。

【図 2 8 A】非ヒト霊長類毒性研究における T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の薬力学的活性を示す。図 2 8 A は、動物の投与前 1 から単離され、C D 4 5 + C D 3 + C D 8 + T 細胞上でゲートされた末梢血上の例示的な H V E M 発現のフローサイトメトリー表現型検査を示す。

【図 2 8 B】非ヒト霊長類毒性研究における T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の薬力学的活性を示す。図 2 8 B は、各個々の動物について、全ての用量群にわたってプロットされた最大用量後サイトカイン応答を示す。シェーディングを使用して用量反応を強調した。

【図 2 8 C】非ヒト霊長類毒性研究における T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパ

10

20

30

40

50

ク質の薬力学的活性を示す。図28Cは、mTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質による処置の9日後に採取した血清に対して実施したマウス血清サイトカイン分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本開示は、一部には、抗PD-1療法に対する耐性（獲得耐性又は一次耐性）に関連する特定の機能の上方制御又は下方制御の発見、及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質又はSIRP α -Fc-4-1BBLキメラタンパク質が、抗PD-1療法に対する獲得耐性又は一次耐性を有するがんにおいて有効であることに基づく。驚くべきことに、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質とPD-1/PD-L1軸を遮断する剤との組み合わせは、抗PD-1療法に対する獲得がん又は一次耐性に対して有効である。したがって、これらの結果は、抗PD-1療法に対する獲得耐性又は一次耐性を有するがんの処置法を確立する。

10

【0042】

本開示は、一部には、40mg/kgまでのTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質が非ヒト霊長類（NHP）において安全に忍容されるという発見、並びにサイトカイン放出症候群の証拠がない、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質誘導リンパ球増殖、リンパ球マージネーション及び特定の投与後サイトカインシグネチャによるNHPの処置に基づく。

【0043】

20

実施形態では、これらの結果は、抗PD-1療法に対する獲得耐性及び一次耐性に関連するバイオマーカーを確立する。したがって、これらのバイオマーカーに基づいて、本明細書に開示される実施形態では、患者からの生物学的試料からの本明細書に開示される1又は複数の遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する遺伝子の存在、非存在、又はレベルについて試料を評価することに基づいて、患者が抗PD-1療法による処置のために選択され得る。例えば、実施形態では、本明細書に開示される様々なGO機能に関連する1又は複数の遺伝子の観察された上方制御又は下方制御が使用されて、抗PD-1療法に対する耐性（獲得耐性又は一次耐性）を診断することができる。

【0044】

本明細書に開示されるPD-1阻害性抗体に対する獲得耐性を発達させた腫瘍の単一細胞RNA配列決定は、転写的に高活性な表現型の進行性獲得を実証した。具体的には、より多くの転写物が、親PD-1抗体感受性腫瘍よりもPD-1獲得耐性腫瘍において下方制御されるよりも上方制御された。この観察結果は、理論に拘束されることを望むものではないが、獲得耐性が、特定の経路において遺伝子を上方制御する腫瘍細胞が、全体的な転写活性を上方制御しない、又は下方制御する細胞と比べて、生存優位性を獲得する能動的プロセスであることを示唆する。したがって、実施形態では、PD-1又はPD-L1ブロッキング剤を含むチェックポイント阻害剤に対する耐性を獲得した腫瘍は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質に対する増加した感受性を有し得、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRP α であり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～

30

40

50

95から選択される。

【0045】

更に、本明細書に提示されるデータは、獲得耐性腫瘍が転写亢進表現型を特徴とするが、上方制御される転写物の多くは対応するタンパク質発現の増加を伴わないことを実証している。例えば、CD274 (PD-L1)、ベータ2マクログロブリン、並びにインターフェロン感受性及び抗原提示に関連する他の転写物に関連する遺伝子は、獲得耐性腫瘍において上方制御されるが、獲得耐性腫瘍におけるPD-L1又はベータ2マクログロブリンタンパク質発現の量の対応する増加はない。まとめると、これらの知見は、とりわけ、獲得耐性腫瘍が、抗腫瘍免疫応答に対する感受性の増加を推進するであろう重要な遺伝子の多くを上方制御しようと試みているが、1つ又は複数の転写後タンパク質における獲得欠損が応答を乱していることを示唆している。例えば、PD-L1 mRNAレベルの増加は、PD-L1タンパク質のレベルの増加につながると予想される。したがって、実施形態では、タンパク質翻訳（例えば、リボソーム複合体のアセンブリ及び／又は機能、tRNAの適切な発現及び／又は機能、アミノ酸の適切な合成及び／又は取り込みなど）、翻訳後修飾（例えば、機能又は分解からの保護に重要な炭水化物による翻訳されたタンパク質の修飾）、又は輸送機構（例えば、翻訳後ペプチドプロセッシング、シグナルペプチド認識及び切断、ER／ゴルジ網を介した輸送など）を含む1又は複数のプロセスのモジュレーターは、翻訳後プロセスの欠陥を組み合わせ、PD-1又はPD-L1遮断薬に対する耐性を発達させるがん細胞集団における合成致死表現型を作成するのに役立ち得る。実施形態では、化学療法のクラスは、ネオアジュバント療法として、又はアジュバント療法として使用され得る。

10

20

【0046】

キメラタンパク質

いくつかの態様では、キメラタンパク質は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造であり、(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、I型膜タンパク質は、Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体(TIGIT)であり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を有するリンカー（限定されないが、ヒンジ-CH₂-CH₃ FcドメインはヒトIgG₄に由来する）であり、(c)は、4-1BB、GITR、TL1A及びLIGHTから選択されるII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、本明細書に記載の1又は複数の連結リンカーを含み、第1及び第2の細胞外ドメインの1つは、免疫阻害シグナルであり、第1及び第2の細胞外ドメインの1つは、免疫刺激シグナルである。例示的なキメラタンパク質は国際公開第2018157162号に開示されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。LIGHT三量体の機能的セットを有する六量体として存在する例示的なキメラタンパク質、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の分子モデルを図10Aに示す。

30

【0047】

いくつかの態様では、キメラタンパク質は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造であり、(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、I型膜タンパク質は、シグナル調節タンパク質α(SIRPα)であり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を有するリンカー（限定されないが、ヒンジ-CH₂-CH₃ FcドメインはヒトIgG₄に由来する）であり、(c)は、4-1BB、CD40L、OX40L、CD30L、及びGITRから選択されるII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、本明細書に記載の1又は複数の連結リンカーを含み、第1及び第2の細胞外ドメインの1つは、免疫阻害シグナルであり、第1及び第2の細胞外ドメインの1つは、免疫刺激シグナルである。例示的なキメラタンパク質は、国際公開第2017/059168号、国際公開第2018/157163号、国際公開第2018/157164号、国際公開第201

40

50

8 / 1 5 7 1 6 5 号、国際公開第 2 0 1 8 / 1 5 7 1 6 2 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 4 6 5 0 8 号、国際公開第 2 0 2 0 / 0 4 7 3 2 5 号、国際公開第 2 0 2 0 / 0 4 7 3 2 7 号、国際公開第 2 0 2 0 / 0 4 7 3 2 8 号、国際公開第 2 0 2 0 / 0 4 7 3 2 9 号、国際公開第 2 0 2 0 / 0 4 7 3 1 9 号、国際公開第 2 0 2 0 / 0 4 7 3 2 2 号、国際公開第 2 0 2 0 / 1 4 6 3 9 3 号、国際公開第 2 0 2 0 / 1 7 6 7 1 8 号、国際公開第 2 0 2 0 / 2 3 2 3 6 5 号に開示されており、これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 4 8 】

実施形態では、キメラタンパク質は、組換え融合タンパク質、例えば、本明細書に記載の細胞外ドメインを有する単一ポリペプチドを指す。例えば、実施形態では、キメラタンパク質は、細胞内で単一単位として翻訳される。実施形態では、キメラタンパク質は、例えばインビトロで（例えば、本明細書中に記載される 1 又は複数の合成リンカーを用いて）、単一単位を生じるように連結された複数のポリペプチド、例えば本明細書に記載の複数の細胞外ドメインの組換えタンパク質を指す。

10

【 0 0 4 9 】

実施形態では、キメラタンパク質は、1 つのポリペプチドとして化学合成されるか、又は各ドメインは、別々に化学合成され、次いで組み合わせられてもよい。実施形態では、キメラタンパク質の一部が翻訳され、一部が化学的に合成される。

【 0 0 5 0 】

実施形態では、細胞外ドメインは、細胞外環境と相互作用することができる膜貫通タンパク質の一部を指す。実施形態では、細胞外ドメインは、リガンド又は受容体に結合し、シグナルを細胞に効果的に伝達するのに十分な膜貫通タンパク質の一部を指す。実施形態では、細胞外ドメインは、細胞又は細胞膜の外部にある膜貫通タンパク質のアミノ酸配列全体である。実施形態では、細胞外ドメインは、細胞又は細胞膜の外部にあり、当技術分野で公知の方法（例えば、インビトロリガンド結合アッセイ及び／又は細胞活性化アッセイ）を使用してアッセイされ得るようなシグナル伝達及び／又はリガンド結合に必要な膜貫通タンパク質のアミノ酸配列の部分である。

20

【 0 0 5 1 】

実施形態では、免疫抑制シグナルとは、免疫応答を減弱又は排除するシグナルをいう。例えば、腫瘍学の文脈において、そのようなシグナルは、抗腫瘍免疫を減弱又は排除し得る。正常な生理学的条件下では、阻害性シグナルは、自己寛容（例えば、自己免疫の予防）の維持に有用であり、免疫系が病原性感染に応答している場合に組織を損傷から保護するのにも有用である。例えば、限定されないが、免疫阻害シグナルは、そのような阻害シグナルが遮断された場合に、細胞増殖、サイトカイン産生、細胞死滅活性又は食作用活性の増加を検出することによって同定され得る。

30

【 0 0 5 2 】

実施形態では、免疫刺激シグナルは、免疫応答を増強するシグナルを指す。例えば、腫瘍学の文脈において、そのようなシグナルは抗腫瘍免疫を増強し得る。例えば、限定されないが、免疫刺激シグナルは、白血球の増殖、サイトカイン産生、殺傷活性又は食作用活性を直接刺激することによって同定され得る。具体例は、受容体アゴニスト抗体を使用するか、又はそのような受容体（O X 4 0 L、L I G H T、4 - 1 B B L、T L 1 A）のリガンドをコードするキメラタンパク質を使用して、O X 4 0、L T β R、4 - 1 B B 又は T N F R S F 2 5 などの T N F スーパーファミリー受容体を直接刺激することを含む。これらの受容体のいずれか 1 つからの刺激は、個々の T 細胞サブセットの増殖及びサイトカイン産生を直接刺激し得る。別の例は、そのような免疫抑制細胞の活性を阻害する受容体を介した免疫阻害細胞の直接刺激を含む。これは、例えば、G I T R アゴニスト抗体又は G I T R L 含有キメラタンパク質による C D 4 + F o x P 3 + 調節性 T 細胞の刺激を含み、これは、それらの調節性 T 細胞が従来の C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞の増殖を抑制する能力を低下させ得る。別の例では、これは、C D 4 0 アゴニスト抗体又は C D 4 0 L を含有するキメラタンパク質を使用した抗原提示細胞の表面上の C D 4 0 の刺激を含み、B 7

40

50

又はTNFスーパーファミリーのものを含む適切な天然共刺激分子に関連して抗原を提示するそれらの細胞の能力の増強を含む、抗原提示細胞の活性化を引き起こす。別の例では、これは、LIGHT含有キメラタンパク質を使用してリンパ系細胞又は間質細胞の表面上のLTBRの刺激を含み、リンパ系細胞の活性化及び／又は炎症促進性サイトカイン若しくはケモカインの産生を引き起こして、任意で腫瘍内の免疫応答を更に刺激する。

【0053】

膜タンパク質は、典型的には、細胞外ドメイン、1つ又は一連の膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインからなる。理論に束縛されることを望むものではないが、膜タンパク質の細胞外ドメインは、可溶性又は膜結合受容体又はリガンドとの相互作用を担う。理論に拘束されることを望むものではないが、膜貫通ドメイン（複数可）は、原形質膜へのタンパク質の局在化を担う。理論に束縛されることを望むものではないが、膜タンパク質の細胞内ドメインは、細胞内応答を細胞外環境と調整する（又はその逆）ために細胞シグナル伝達分子との相互作用を調整する役割を果たす。シングルパス膜タンパク質は、細胞外アミノ末端及び細胞内カルボキシ末端を有するもの（I型）及び細胞外カルボキシ末端及び細胞内アミノ末端を有するもの（II型）の2種類がある。I型膜タンパク質及びII型膜タンパク質の両方は、受容体又はリガンドのいずれかであり得る。I型膜タンパク質の場合、タンパク質のアミノ末端は細胞外に面しており、したがって細胞外環境の他の結合パートナー（リガンド又は受容体のいずれか）との相互作用を担う機能ドメインを含む。II型膜タンパク質の場合、タンパク質のカルボキシ末端は細胞外に面しており、したがって細胞外環境の他の結合パートナー（リガンド又は受容体のいずれか）との相互作用を担う機能ドメインを含む。したがって、これらの2種類のタンパク質は、互いに反対の向きを有する。

【0054】

I型及びII型膜タンパク質の外向きドメインは反対であるので、分子の「外向き」ドメインもまた互いに反対の向きになるように、I型及びII型膜タンパク質の細胞外ドメインを連結することが可能である。したがって、得られた構築物は、リンカー配列を使用して分子の「右」側のII型膜タンパク質の細胞外ドメインに接続された、分子の「左」側のI型膜タンパク質の細胞外ドメインからなる。この構築物は、これらの3つの断片（I型タンパク質の細胞外ドメイン、引き続いてリンカー配列、引き続いてII型タンパク質の細胞外ドメイン）をベクター（プラスミド、ウイルス又はその他）にクローニングすることによって産生され得、完全な配列のアミノ末端はI型タンパク質を含有する分子の「左」側に対応し、完全な配列のカルボキシ末端はII型タンパク質を含有する分子の「右」側に対応した。したがって、実施形態では、本キメラタンパク質は、そのように操作される。

【0055】

実施形態では、細胞外ドメインは、その受容体のリガンドによるシグナル伝達を競合的に阻害する可溶性タンパク質を産生するために使用され得る。実施形態では、細胞外ドメインは、人工的なシグナル伝達を提供するために使用され得る。

【0056】

実施形態では、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインは、免疫阻害シグナルである。実施形態では、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインは、免疫刺激シグナルである。

【0057】

実施形態では、本キメラタンパク質は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン又はその機能性断片を含む。実施形態では、本キメラタンパク質は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン又はその機能性断片を含む。実施形態では、本キメラタンパク質は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン又はその機能的断片、及びII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン又はその機能的断片を含む。

【0058】

制御性T細胞の活性化は、共刺激シグナル及び共阻害シグナルによって決定的に影響される。共刺激分子の2つの主要なファミリーは、B7及び腫瘍壊死因子（TNF）ファミ

10

20

30

40

50

リーを含む。これらの分子は、それぞれCD28受容体ファミリー又はTNF受容体ファミリーに属するT細胞上の受容体に結合する。多くの明確に定義された共阻害剤及びそれらの受容体は、B7ファミリー及びCD28ファミリーに属する。

【0059】

実施形態では、本キメラタンパク質は、例えばTIGITを含む免疫阻害に関与する1又は複数の分子を標的とするように操作され得る。

【0060】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、例えばTIGITを含む免疫阻害剤の細胞外ドメインを含む。

【0061】

実施形態では、本キメラタンパク質は、例えばSIRP α を含む免疫阻害に関与する1又は複数の分子を標的とするように操作され得る。

【0062】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、例えばSIRP α を含む免疫阻害剤の細胞外ドメインを含む。

【0063】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、免疫阻害特性を有するI型膜タンパク質の細胞外ドメインを含む。実施形態では、キメラタンパク質は、免疫阻害シグナルの伝達を破壊、遮断、低減及び／又は阻害するように操作される。

【0064】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、LIGHT(CD258)である免疫刺激シグナルの細胞外ドメインを含む。

【0065】

実施形態では、キメラタンパク質は、その同族受容体(例えば、TIGITからCD155/PVR、ネクチン-2、ネクチン-3及び／又はネクチン-4)への阻害性シグナルリガンドの結合をシミュレートするが、免疫細胞(例えば、T細胞、マクロファージ又は他の白血球)への阻害性シグナル伝達を阻害する。

【0066】

実施形態では、キメラタンパク質は、その同族受容体(例えば、SIRP α からCD47)への阻害性シグナルリガンドの結合をシミュレートするが、免疫細胞(例えば、マクロファージ、B細胞、又は他の食細胞若しくは抗原提示細胞のためのeat me signal)への阻害性シグナル伝達を阻害する。

【0067】

実施形態では、キメラタンパク質は、限定されないが、腫瘍細胞の免疫阻害シグナルを遮蔽しながらT細胞に免疫刺激を送達することができる免疫阻害受容体細胞外ドメイン及び免疫刺激リガンド細胞外ドメインを含む。実施形態では、キメラタンパク質は、T細胞活性化の正味の結果を有するシグナルを送達する。

【0068】

実施形態では、キメラタンパク質は、免疫阻害シグナルの受容体のECDである免疫阻害シグナルを含み、これは、免疫阻害シグナルの同族リガンドを有する腫瘍細胞に作用する。実施形態では、キメラタンパク質は、免疫刺激シグナルのリガンドのECDである免疫刺激シグナルを含み、これは、免疫刺激シグナルの同族受容体を有するT細胞に作用する。実施形態では、キメラタンパク質は、(i)免疫阻害シグナルの受容体であり、免疫阻害シグナルの同族リガンドを有する腫瘍細胞に作用する免疫阻害シグナルと、(ii)免疫刺激シグナルのリガンドであり、免疫刺激シグナルの同族受容体を有するT細胞に作用する免疫刺激シグナルとの両方を含む。

【0069】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Mahoney, Nature Reviews Drug Discovery 2015:14;561-585に記載の免疫調節剤のうちの1又は複数の細胞外ドメイ

10

20

30

40

50

ンを含む。

【0070】

実施形態では、キメラタンパク質は、マウスリガンド（複数可）／受容体（複数可）に結合することができる。

【0071】

実施形態では、キメラタンパク質は、ヒトリガンド（複数可）／受容体（複数可）に結合することができる。

【0072】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、免疫刺激特性を有するⅠⅠ型膜タンパク質の細胞外ドメインを含む。実施形態では、キメラタンパク質は、免疫刺激シグナルの伝達を増強、増加及び／又は刺激するように操作される。

10

【0073】

例えば、実施形態では、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインは、TIGITに由来する。

【0074】

TIGITは、ポリオウイルス受容体（PVR）様タンパク質であり、免疫グロブリン及び免疫受容体チロシンに基づく阻害性モチーフ（ITIM）ドメインを含有するT細胞上に発現される免疫受容体である。このように、TIGITは、T細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞の両方に対して阻害性免疫チェックポイントとして作用し、免疫系の適応アーム及び自然アームの両方を標的化する機会を提供する。

20

【0075】

TIGITは、NK細胞並びに活性化、記憶及び調節性T細胞のサブセット上に発現され、特に二次リンパ器官内の濾胞性ヘルパーT細胞上のCD155／PVRは、IFN-γによって内皮細胞上で上方制御され、未熟な胸腺細胞、リンパ節樹状細胞、並びに上皮及びニューロン起源の腫瘍細胞上で高度に発現される。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、TIGIT ECDを含む）は、上記の細胞のいずれかを調節する（例えば、免疫シナプスの状況において）。

【0076】

TIGITは、CD155／PVR、ネクチン-2、ネクチン-3及びネクチン-4に結合する。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、TIGIT ECDを含む）は、CD155／PVRへのTIGITの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を低減又は妨害する）。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、TIGIT ECDを含む）は、ネクチン-2へのTIGITの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を低減又は妨害する）。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、TIGIT ECDを含む）は、ネクチン-3へのTIGITの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を低減又は妨害する）。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、TIGIT ECDを含む）は、ネクチン-4へのTIGITの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を低減又は妨害する）。

30

【0077】

実施形態では、キメラタンパク質は、N末端-（a）-（b）-（c）-C末端の一般構造であり、（a）は、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質は、TIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合（限定されないが、ヒンジ-CH2-CH3 FcドメインはヒトIgG4に由来する）を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、ⅠⅠ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は、4-1BBL、GITRL、TL1A及びLIGHTから選択され、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、本明細書に記載の1又は複数の連結リンカーを含む。

40

【0078】

実施形態では、キメラタンパク質は、免疫阻害剤TIGITの細胞外ドメインを含み、

50

以下のように免疫刺激剤と対になる：TIGIT/OX-40L；TIGIT/4-1BBL，TIGIT/LIGHT；TIGIT/GITRL；TIGIT/CD70；TIGIT/CD30L；TIGIT/CD40L；TIGIT/CD137L；TIGIT/TL1A；及びTIGIT/OX40L。実施形態では、キメラタンパク質は、TIGIT-Fc-4-1BBL、TIGIT-Fc-GITRL、TIGIT-Fc-LIGHT、TIGIT-Fc-OX40L、又はTIGIT-Fc-TL1Aキメラタンパク質であり、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーを表す。

【0079】

例えば、実施形態では、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインは、LIGHTに由来する。

【0080】

誘導性の性質を有し、ヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）／腫瘍壊死因子（TNF）関連2（tumor necrosis factor（TNF）-related 2）について単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dと競合することができる、リンホトキシンに相同な実体であるLIGHT（HVEM-L、TNFSF14又はCD258）は、TNFスーパーファミリーのメンバーである。これは、29kDaのII型膜貫通タンパク質であり、活性化T細胞及びDC上のホモ三量体として発現され、3つの受容体、すなわちHVEM、LTβ受容体（LTβR、TNFRSF3）及びデコイ受容体3（DcR3）を有する。理論に拘束されることを望むものではないが、異なる細胞発現パターンを有する3つの受容体が、活性化DC、T細胞及びB細胞、NK細胞、単球及び内皮細胞上で検出されるLIGHT：HVEM（TNFRSF14、CD270）；濾胞DC及び間質細胞上に見出され、LIGHTに結合するLTβR；並びに多発性骨髄腫及びびまん性大細胞型B細胞リンパ腫などの多様ながん細胞上で検出される可溶性実体デコイ受容体3（DcR3）と相互作用することが知られている。実施形態では、本キメラタンパク質は、LIGHTとこれら3つの受容体のうちの1又は複数との相互作用を破壊又は減少させることができる。

【0081】

LIGHTはLTBRに結合し、潜在的にHVEM並びにDcR3に結合する。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、LIGHT ECD）は、LTBRへのLIGHTの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を増加又は促進する）。LTBRは、内臓細胞、リンパ系細胞及び他の間質細胞、上皮細胞及び骨髄系細胞によって発現されるが、リンパ球によっては発現されない。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、LIGHT ECD）は、内臓細胞、リンパ系細胞及び他の間質細胞、上皮細胞及び骨髄系細胞のうちの1又は複数を調節する。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、LIGHT ECD）は、HVEMへのLIGHTの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を増加又は促進する）。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、LIGHT ECD）は、DcR3へのLIGHTの結合を調節する（例えば、結合又はシグナル伝達を増加又は促進する）。

【0082】

実施形態では、4-1BBLの部分は4-1BBLの細胞外ドメインの部分である。実施形態では、本キメラタンパク質は、免疫刺激分子4-1BBLリガンド（4-1BBL）のドメイン、例えば細胞外ドメインを更に含む。4-1BBLは、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーに属するII型膜貫通タンパク質である。

【0083】

実施形態では、第2のドメインは4-1BBLの一部である。実施形態では、第2のドメインは、4-1BBLの実質的に全ての細胞外ドメインを含む。実施形態では、第2のドメインは4-1BB（表面抗原分類137（CD137）又は腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー9（TNFSF9）としても公知）に結合し得る。実施形態では、4-1BBへの結合は、免疫刺激シグナルを増加又は活性化する。実施形態では、4-1BBへの結合は、CD4及び／又はCD8T細胞を共刺激する。4-1BBLは、表

10

20

30

40

50

面抗原分類 137 リガンド (CD137L) としても知られている。したがって、本開示を通して、4-1BB L 及び CD137L は、単独で言及される場合及び／又はキメラタンパク質の文脈で言及される場合、同義であり、したがって、例えば、SIRP α -Fc-4-1BB L は、SIRP α -Fc-CD137L と同じキメラタンパク質である。

【0084】

4-1BB リガンド (4-1BB L) は、活性化 T リンパ球及び抗原提示細胞 (APC) 上の 4-1BB 受容体に結合する。4-1BB シグナル伝達は、4-1BB + リンパ球及び 4-1BB L + 抗原提示細胞によって形成される免疫シナプスに続くと考えられている。例えば、4-1BB L 結合は、B 細胞増殖及び免疫グロブリン産生を誘導する。T 細胞は、主要な 4-1BB 発現細胞であり、それらの活性化のためにマクロファージ及び又は APC 上の 4-1BB L に係合し得る。CD8 + T 細胞は、4-1BB シグナル伝達を介して IL-13 並びに IFN- γ を放出する。

10

【0085】

実施形態では、本キメラタンパク質は、ヒト 4-1BB L のドメイン、例えば細胞外ドメインを含む。ヒト 4-1BB L は、以下のアミノ酸配列を含む：

【0086】

MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLL
LLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRRLREGPELSPD
DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVS
LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELR RVVAGEGSG
SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGF
QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFR
VTPEIPAGLPSPRSE (配列番号 102)

20

【0087】

細胞外ドメインヒト 4-1BB L (配列番号 102 のアミノ酸 50 ~ 254) のアミノ酸配列は以下の通りである。

【0088】

ACPWAVSGARASPGSAASPRRLREGPELSPDDPAGLLDLR
QGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE
DTKELVVAKAGVYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQ
PLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSA
GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGL
PSPRSE (配列番号 13)

30

【0089】

実施形態では、本キメラタンパク質は、配列番号：13 のアミノ酸配列を有するヒト 4-1BB L の細胞外ドメインを含む。実施形態では、本キメラタンパク質は、本明細書に記載の 4-1BB L の細胞外ドメイン、又はその変異体若しくは機能性断片を含み得る。例えば、キメラタンパク質は、上に提供したような 4-1BB L の細胞外ドメインの配列、又は本明細書に記載の 4-1BB L の細胞外ドメインのアミノ酸配列と、少なくとも約 60%、又は少なくとも約 61%、又は少なくとも約 62%、又は少なくとも約 63%、又は少なくとも約 64%、又は少なくとも約 65%、又は少なくとも約 66%、又は少なくとも約 67%、又は少なくとも約 68%、又は少なくとも約 69%、又は少なくとも約 70%、又は少なくとも約 71%、又は少なくとも約 72%、又は少なくとも約 73%、又は少なくとも約 74%、又は少なくとも約 75%、又は少なくとも約 76%、又は少なくとも約 77%、又は少なくとも約 78%、又は少なくとも約 79%、又は少なくとも約 80%、又は少なくとも約 81%、又は少なくとも約 82%、又は少なくとも約 83%、又は少なくとも約 84%、又は少なくとも約 85%、又は少なくとも約 86%、又は少なくとも約 87%、又は少なくとも約 88%、又は少なくとも約 89%、又は少なくとも約 90%、又は少なくとも約 91%、又は少なくとも約 92%、又は少なくとも約 93%、又は少なくとも約 94%、又は少なくとも約 95%、又は少なくとも約 96%、又は少な

40

50

くとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有するそのバリエーション若しくは機能的断片を含み得る。

【0090】

4-1BBL誘導体は、Won et al., "The structure of the trimer of human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily." J. Biol. Chem. 285:9202-9210 (2010); Gilbreth et al., "Crystal structure of the human 4-1BB/4-1BBL complex." J Biol Chem 293:9880-9891 (2018); and Bitra et al., "Crystal structures of the human 4-1BB receptor bound to its ligand 4-1BBL reveal covalent receptor dimerization as a potential signaling amplifier." J Biol Chem 293:9958-9969 (2018) によって記載されたものを含む利用可能な構造データから構築され得る。

10

【0091】

実施形態では、本キメラタンパク質は、シグナルペプチド（例えば、配列番号59で提供されるように）が代替シグナルペプチドで置き換えられている4-1BBLの変異体細胞外ドメインを含み得る。実施形態では、本キメラタンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はHEK細胞などのタンパク質産生細胞における発現のためにコード最適化されたcDNAから発現される4-1BBLの変異体細胞外ドメインを含み得る。

20

【0092】

実施形態では、4-1BBLの細胞外ドメインは、細胞外環境と相互作用することができるタンパク質の一部を指す。実施形態では、4-1BBLの細胞外ドメインは、細胞又は細胞膜の外部にあるタンパク質のアミノ酸配列全体である。実施形態では、4-1BBLの細胞外ドメインは、細胞又は細胞膜の外部にあり、当技術分野で公知の方法を使用してアッセイされ得るようなシグナル伝達及び／又はリガンド結合に必要なタンパク質のアミノ酸配列の一部である。

30

【0093】

実施形態では、4-1BBLの細胞外ドメインは、4-1BB受容体に結合することができるタンパク質の一部を指す。他のTNFスーパーファミリーメンバーと同様に、膜結合4-1BBLはホモ三量体として存在する。4-1BBLは、主に抗原提示細胞上に発現されるTNF受容体スーパーファミリーのメンバーである4-1BBに結合する。

【0094】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質はヒト4-1BBに、約1 μ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約550 nM、約530 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約55 nM、約50 nM、約45 nM、約40 nM、約35 nM、約30 nM、約25 nM、約20 nM、約15 nM、約10 nM若しくは約5 nM又は約1 nM（例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定される場合）未満のKDで結合する。実施形態では、キメラタンパク質は、約1 nM、約900 pM、約800 pM、約700 pM、約600 pM、約500 pM、約400 pM、約300 pM、約200 pM、約100 pM、約90 pM、約80 pM、約70 pM、約60 pM、約55 pM、約50 pM、約45 pM、約40 pM、約35 pM、約30 pM、約25 pM、約20 pM、約15 pM、若しくは約10 pM、又は約1 pM（例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定される場合）未満のKDでヒト4-1BBに結合する。実施形態では、キメラタンパク質は、約300 pM～約700 pMのKDでヒト4-1BBに結合する。

40

50

【0095】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、（１）配列番号５８のアミノ酸配列を含む第１のドメイン、（ｂ）配列番号１３のアミノ酸配列を含む第２のドメインを含み、及び（ｃ）リンカーが配列番号４６、配列番号４７、配列番号１１２又は配列番号１１３と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む。

【0096】

例えば、実施形態では、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインは、シグナル調節タンパク質α（SIRPα）に由来する。

【0097】

シグナル調節タンパク質α（SIRPα）は、広く発現されている膜貫通タンパク質CD47の阻害性受容体である（「don't eat me」シグナルとも呼ばれる）。SIRPαは、マクロファージ及び他の骨髄細胞によって主に発現されるSIRPファミリーからの調節性膜糖タンパク質である。

【0098】

SIRPαとCD47との相互作用は、食作用性シナプスの膜下アセンブリ部位でのミオシン蓄積を阻害するチロシンホスファターゼの活性化をもたらす、食作用の遮断をもたらす。したがって、CD47は、健康な自己細胞のための「don't eat me signal」として作用し、したがって、CD47の喪失は、加齢細胞又は損傷細胞の食作用をもたらす。CD47によって提供されるこの抗食作用シグナルを利用して、多くの種類の腫瘍がこのタンパク質を過剰発現し、それによりマクロファージによる食作用を回避し、がん細胞の生存を助ける。SIRPαはCD47に結合する。実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、SIRPαECDを含む）は、CD47（例えば、結合又はシグナル伝達を低減又は妨害する）へのSIRPαの結合を調節する。

【0099】

実施形態では、本キメラタンパク質（例えば、SIRPαECDを含む）は、上記の細胞のいずれかを調節する（例えば、免疫シナプスの状況において）。

【0100】

実施形態では、本発明の方法で使用されるキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含むヒトSIRPα（CD172a）の細胞外ドメインを含む。

【0101】

EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRC TATSLIPVGP IQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLT KRNNMDFSIRIGNITPADAGTY YCVKFRKGS PDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVL TREDEVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSR TETASTVTENKDGTYNWM SWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEH DGQPAVSKSHDLKVSAHPKEQGSNTAAENTGSNERNIY（配列番号７）

【0102】

実施形態では、本発明の方法で使用されるキメラタンパク質は、SIRPαの細胞外ドメインの変異体（CD172a）を含む。例として、変異体は、配列番号７と、少なくとも約６０％、又は少なくとも約６１％、又は少なくとも約６２％、又は少なくとも約６３％、又は少なくとも約６４％、又は少なくとも約６５％、又は少なくとも約６６％、又は少なくとも約６７％、又は少なくとも約６８％、又は少なくとも約６９％、又は少なくとも約７０％、又は少なくとも約７１％、又は少なくとも約７２％、又は少なくとも約７３％、又は少なくとも約７４％、又は少なくとも約７５％、又は少なくとも約７６％、又は少なくとも約７７％、又は少なくとも約７８％、又は少なくとも約７９％、又は少なくとも約８０％、又は少なくとも約８１％、又は少なくとも約８２％、又は少なくとも約８３％、又は少なくとも約８４％、又は少なくとも約８５％、又は少なくとも約８６％、又は

少なくとも約 87%、又は少なくとも約 88%、又は少なくとも約 89%、又は少なくとも約 90%、又は少なくとも約 91%、又は少なくとも約 92%、又は少なくとも約 93%、又は少なくとも約 94%、又は少なくとも約 95%、又は少なくとも約 96%、又は少なくとも約 97%、又は少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有する配列を有し得る。

【0103】

実施形態では、SIRPα の細胞外ドメインの変異体 (CD172a) は配列番号 7 と少なくとも約 95% の配列同一性を有する。

【0104】

当業者は、文献、例えば LEE, et al., "Novel Structural Determinants of SIRPα that Mediate Binding of CD47," The Journal of Immunology, 179, 7741-7750, 2007 and HATHERLEY, et al., "The Structure of the Macrophage Signal Regulatory Protein a (SIRPα) Inhibitory Receptor Reveals a Binding Face Reminiscent of That Used by T Cell Receptors," The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 282, No. 19, pp. 14567-14575, 2007 を調べることによって SIRPα (CD172a) の既知のアミノ酸配列の変異体を選択することができ、これらはそれぞれその全体が参照により組み込まれる。

【0105】

実施形態では、異種キメラタンパク質は、SIRPα (CD172a) の細胞外ドメインの実質的に全体を含む第 1 のドメイン、及び／又は 4-1BBL の細胞外ドメインの実質的に全体を含む第 2 のドメインを含む。実施形態では、SIRPα (CD172a) の細胞外ドメインの実質的に全体を含む第 1 のドメイン。実施形態では、4-1BBL の細胞外ドメインの実質的に全体を含む第 2 のドメイン。

【0106】

実施形態では、キメラタンパク質は、N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造であり、(a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、膜貫通タンパク質は、SIRPα であり、(b) は、ジスルフィド結合 (限定されないが、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fc ドメインはヒト IgG4 に由来する) を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は、4-1BBL、GITRL、TL1A 及び LIGHT から選択され、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、本明細書に記載の 1 又は複数の連結リンカーを含む。

【0107】

実施形態では、キメラタンパク質は、免疫阻害剤 SIRPα の細胞外ドメインを含み、以下のように免疫刺激剤と対になる：CD172a (SIRPα) / OX-40L；CD172a (SIRPα) / 4-1BBL，CD172a (SIRPα) / LIGHT；CD172a (SIRPα) / GITRL；CD172a (SIRPα) / CD70；CD172a (SIRPα) / CD30L；CD172a (SIRPα) / CD40L；CD172a (SIRPα) / CD137L；CD172a (SIRPα) / TL1A；及び CD172a (SIRPα) / OX40L。実施形態では、キメラタンパク質は、SIRPα-Fc-4-1BBL、SIRPα-Fc-GITRL、SIRPα-Fc-LIGHT、SIRPα-Fc-OX40L 又は SIRPα-Fc-TL1A であり、Fc は、抗体の Fc ドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーを表す。

【0108】

実施形態では、キメラタンパク質は、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造であり、(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質は、PD-1、CD172a(SIRPα)、及びTIGITから選択され、(b)は、ジスルフィド結合(限定されないが、ヒンジ-CH2-CH3FcドメインはヒトIgG4に由来する)を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は、LIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、本明細書に記載の1又は複数の連結リンカーを含む。

【0109】

10

実施形態では、キメラタンパク質は、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造であり、(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質は、CD172a(SIRPα)から選択され、(b)は、ジスルフィド結合(限定されないが、ヒンジ-CH2-CH3FcドメインはヒトIgG4に由来する)を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は、4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、本明細書に記載の1又は複数の連結リンカーを含む。

【0110】

実施形態では、キメラタンパク質は、免疫刺激剤LIGHTの細胞外ドメインを含み、以下のように免疫阻害剤と対になる：PD-1/LIGHT、CD172a(SIRPα)/LIGHT、及びTIGIT/LIGHT。実施形態では、キメラタンパク質は、PD-1-Fc-LIGHT、CD172a(SIRPα)-Fc-LIGHT及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質であり、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーを表す。

20

【0111】

実施形態では、キメラタンパク質は、免疫刺激剤LIGHTの細胞外ドメインを含み、以下のように免疫阻害剤と対になる：CD172a(SIRPα)/OX-40L；CD172a(SIRPα)/4-1BBL，CD172a(SIRPα)/LIGHT；CD172a(SIRPα)/GITRL；CD172a(SIRPα)/CD70；CD172a(SIRPα)/CD30L；CD172a(SIRPα)/CD40L；CD172a(SIRPα)/CD137L；CD172a(SIRPα)/TL1A；及びCD172a(SIRPα)/OX40L。実施形態では、キメラタンパク質はCD172a(SIRPα)-Fc-4-1BBL、CD172a(SIRPα)-Fc-CD40L、CD172a(SIRPα)-Fc-LIGHT、及びCD172a(SIRPα)-Fc-CD30Lであり、Fcは抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成し得る少なくとも1個のシステイン残基を含むリンカーを表す。

30

【0112】

一実施形態では、キメラタンパク質は、免疫阻害剤の細胞外ドメインを含み、免疫刺激剤と対になる。実施形態では、キメラタンパク質は、約1nM～約5nM、例えば、約1nM、約1.5nM、約2nM、約2.5nM、約3nM、約3.5nM、約4nM、約4.5nM又は約5nMのK_Dで同族受容体又はリガンドに結合する。実施形態では、キメラタンパク質は、約5nM～約15nM、例えば、約5nM、約5.5nM、約6nM、約6.5nM、約7nM、約7.5nM、約8nM、約8.5nM、約9nM、約9.5nM、約10nM、約10.5nM、約11nM、約11.5nM、約12nM、約12.5nM、約13nM、約13.5nM、約14nM、約14.5nM又は約15nMのK_Dで同族の受容体又はリガンドに結合する。

40

【0113】

実施形態では、キメラタンパク質は、増強された安定性及びタンパク質半減期を示す。

50

実施形態では、キメラタンパク質は、高親和性でFcRnに結合する。実施形態では、キメラタンパク質は、約1 nM～約80 nMの K_D でFcRnに結合し得る。例えば、キメラタンパク質は、約1 nM、約2 nM、約3 nM、約4 nM、約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約15 nM、約20 nM、約25 nM、約30 nM、約35 nM、約40 nM、約45 nM、約50 nM、約55 nM、約60 nM、約65 nM、約70 nM、約71 nM、約72 nM、約73 nM、約74 nM、約75 nM、約76 nM、約77 nM、約78 nM、約79 nM又は約80 nMの K_D でFcRnに結合し得る。一実施形態では、キメラタンパク質は、約9 nMの K_D でFcRnに結合し得る。実施形態では、キメラタンパク質は、エフェクター機能を有する他のFc受容体（すなわち、FcRn以外）に実質的に結合しない。

10

【0114】

実施形態では、CD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT、PD-1-Fc-LIGHT、CD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のうちの1又は複数を対象に投与することによってがん及び／又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を処置する方法が提供され、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1個のシステイン残基を含むリンカーを表す。実施形態では、方法は、例えば再発を予防することができる記憶応答を生成する。実施形態では、方法は、PD-1-Fc-LIGHT、CD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の1又は複数のものの持続的な治療効果を含み、例えば、細胞外ドメイン成分がそれぞれの結合パートナーに遅い速度（ K_d 又は K_{off} ）で結合して、任意に持続的な負のシグナルマスキング効果及び／又はより長い正のシグナル効果を与え、例えば、抗腫瘍効果のためにエフェクター細胞を十分に刺激することを可能にする。実施形態では、CD172a (SIRP α)-Fc-4-1BBL、CD172a (SIRP α)-Fc-CD40L、CD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT及びCD172a (SIRP α)-Fc-CD30Lキメラタンパク質のうちの1又は複数を対象に投与することによってがん及び／又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を処置する方法が提供され、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1個のシステイン残基を含むリンカーを表す。

20

30

【0115】

実施形態では、がん又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を対象に1又は複数のaを投与することによって処置する方法が提供される。実施形態では、がん及び／又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を、CD172a (SIRP α)-Fc-4-1BBL、CD172a (SIRP α)-Fc-CD40L、CD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT及びCD172a (SIRP α)-Fc-CD30Lキメラタンパク質の1又は複数を対象に投与することによって処置する方法が提供され、ここで、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1個のシステイン残基を含むリンカーを表す。Fcが、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーを表す、キメラタンパク質。実施形態では、方法は、例えば再発を予防することができる記憶応答を生成する。実施形態では、方法は、例えば、細胞外ドメイン成分がそれぞれの結合パートナーに遅いオフ速度（ K_d 又は K_{off} ）で結合することによる、TIGIT-Fc-4-1BBL、TIGIT-Fc-GITRL、TIGIT-Fc-TL1A及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の1又は複数の持続的な治療効果を含み、任意に持続的な負シグナルマスキング効果及び／又はより長い正シグナル効果を提供し、例えば、抗腫瘍効果を得るためにエフェクター細胞を十分に刺激することを可能にする。

40

【0116】

50

実施形態では、がん又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を対象に1又は複数のaを投与することによって処置する方法が提供される。実施形態では、がん及び／又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を、CD172a（SIRPα）-Fc-4-1BBL、CD172a（SIRPα）-Fc-CD40L、CD172a（SIRPα）／-Fc-LIGHT及びCD172a（SIRPα）-Fc-CD30Lキメラタンパク質の1又は複数を対象に投与することによって処置する方法が提供され、ここで、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1個のシステイン残基を含むリンカーを表す。Fcが、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーを表す、キメラタンパク質。実施形態では、方法は、例えば再発を予防することができる記憶応答を生成する。いくつかの実施形態では、方法は、1又は複数の持続治療効果を含み、実施形態では、CD172a（SIRPα）-Fc-4-1BBL、CD172a（SIRPα）-Fc-CD40L、CD172a（SIRPα）／-Fc-LIGHT及びCD172a（SIRPα）-Fc-CD30Lキメラタンパク質のうちの1又は複数を対象に投与することによってがん及び／又は炎症性疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもののいずれか1つ）を処置する方法が提供され、Fcは、抗体のFcドメインの少なくとも一部を含み、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーを表し、例えば、細胞外ドメイン成分がそれぞれの結合パートナーに遅いオフ速度（ K_d 又は K_{off} ）で結合することにより、必要に応じて持続的な負のシグナルマスキング効果及び／又はより長い正のシグナル効果を提供し、例えば、抗腫瘍効果のためにエフェクター細胞を十分に刺激することを可能にする。

10

20

30

40

【0117】

実施形態では、本キメラタンパク質は、本明細書に記載の細胞外ドメインの変異体、例えば、開示される細胞外ドメインのいずれかの既知のアミノ酸配列又は核酸配列、例えば、ヒト細胞外ドメイン、例えば、配列番号2、4、7、10、13、16、19、22、25、27、29、31、37、41又は103の1又は複数と少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を含み得る。

【0118】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質はLIGHTの細胞外ドメイン（配列番号2）を含む。

【0119】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質はPD-1の細胞外ドメイン（配列番号4）を含む。

【0120】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質はTIGITの細胞外ドメイン（配列番号10）を含む。

【0121】

50

実施形態では、本開示のキメラタンパク質はCD172a (SIRP α)の細胞外ドメイン (配列番号7) を含む。

【0122】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は4-1BBLの細胞外ドメイン (配列番号13) を含む。

【0123】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、CD172a (SIRP α)の細胞外ドメイン (配列番号7) 及び4-1BBLの細胞外ドメイン (配列番号13) を含む。

【0124】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、LIGHTの細胞外ドメイン (配列番号2) 及びPD-1の細胞外ドメイン (配列番号4) を含む。

10

【0125】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、LIGHTの細胞外ドメイン (配列番号2) 及びTIGITの細胞外ドメイン (配列番号10) を含む。

【0126】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、LIGHTの細胞外ドメイン (配列番号2) 及びCD172a (SIRP α)の細胞外ドメイン (配列番号7) を含む。

【0127】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列 (配列番号46、47又は48) 由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインを含む。

20

【0128】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列 (配列番号46、47又は48) 由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインを含み、この配列は、SKYGP P C P S C P (配列番号49)、SKYGP P C P P C P (配列番号50)、配列番号52 (任意に、SKYGP P C P S C P (配列番号49) 又はSKYGP P C P P C P (配列番号50) はN末端であり、IEGRMD配列番号52の一方はC末端である) から選択される少なくとも1つの連結リンカーに隣接している。

【0129】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG1抗体配列 (配列番号112、113) 由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインを含む。

30

【0130】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG1抗体配列 (配列番号112、113) 由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインを含み、この配列は、SKYGP P C P S C P (配列番号49)、SKYGP P C P P C P (配列番号50)、配列番号52 (任意に、SKYGP P C P S C P (配列番号49) 又はSKYGP P C P P C P (配列番号50) はN末端であり、IEGRMD配列番号52の一方はC末端である) から選択される少なくとも1つの連結リンカーに隣接している。

【0131】

実施形態では、キメラタンパク質は、モジュラーリンカーを含む。

【0132】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインをリンカーとして用いて、LIGHTの細胞外ドメインとPD-1の細胞外ドメインとを含む (このPD-1-Fc-LIGHTキメラは配列番号5である) 。

40

【0133】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインをリンカーとして用いて、LIGHTの細胞外ドメインとTIGITの細胞外ドメインとを含む (このTIGIT-Fc-LIGHTキメラは配列番号11である) 。

【0134】

50

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列由来のヒンジ－CH2－CH3ドメインをリンカーとして用いて、TIGITの細胞外ドメインとLIGHTの細胞外ドメインとを含む。実施形態では、ヒトTIGIT－Fc－LIGHTキメラは以下の配列を有する（ヒトTIGITの細胞外ドメイン（ECD）は下線で示され、変異型IgG4 CH2－CH3－Fcドメインは斜体フォントで示され、連結リンカーは太字フォントで示され、ヒトLIGHTの細胞外ドメイン（ECD）は下線付き斜体フォントで示される）。

【0135】

【化1】

MMTGTTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQ
QDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVN
DTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP
SKYGPPCPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDKQLMISRTPE
VTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTI
SNATGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGKIEGRMDLQLH
WRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAHLTGAN
SSLTGSGGGLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY
IYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVS
QQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLDE
RLVRLRDGTRSYFGAFMV (配列番号11)

10

20

【0136】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG1抗体配列由来のヒンジ－CH2－CH3ドメインをリンカーとして使用して、TIGITの細胞外ドメインとLIGHTの細胞外ドメインとを含む。このタンパク質は、本明細書ではTIGIT－Fc（IgG1）－LIGHTキメラタンパク質とも呼ばれる。実施形態では、ヒトTIGIT－Fc（IgG1）－LIGHTキメラは、以下の配列を有する（ヒトTIGITの細胞外ドメイン（ECD）は下線で示され、IgG1由来のCH2－CH3－Fcドメインは斜体フォントで示され、連結リンカーは太字フォントで示され、ヒトLIGHTの細胞外ドメイン（ECD）は下線付き斜体フォントで示される）。

30

【0137】

【化2】

MMTGTTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQ
QDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVN
DTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKIEGRMDL
QLHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAHLT
GANSSLTGSGGGLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAG
YYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELL
LVSSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV
LDERLVRLRDGTRSYFGAFMV (配列番号109)

40

【0138】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG1抗体配列由来のヒンジ－C

50

H2－CH3ドメインをリンカーとして用いて、TIGITの細胞外ドメインとLIGHTの細胞外ドメインとを含む。実施形態では、ヒトTIGIT－Fc－LIGHTキメラは以下の配列を有する（ヒトTIGITの細胞外ドメイン（ECD）は下線で示され、変異体IgG1 CH2－CH3－Fcドメイン（IgG1－LALA）は斜体フォントで示され、2つの変異を太字フォントで示し、連結リンカーは太字フォントで示され、ヒトLIGHTの細胞外ドメイン（ECD）は下線付き斜体フォントで示される）。

【0139】

【化3】

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQ
QDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVN
DTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP
EPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYASTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKIEGRMD
LQLHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHL
TGANSSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKA
GYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELE
LLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVR
VLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV (配列番号110)

10

20

【0140】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、マウスIgG1抗体配列由来のヒンジーCH2－CH3ドメインをリンカーとして用いて、マウスTIGITの細胞外ドメインとマウスLIGHTの細胞外ドメインとを含む。実施形態では、マウスTIGIT－Fc－LIGHTキメラは、以下の配列を有する（マウスTIGITの細胞外ドメイン（ECD）は下線で示され、変異体IgG1 CH2－CH3－Fcドメインは斜体フォントで示され、2つの変異を太字フォントで示し、連結リンカーは太字フォントで示され、マウスLIGHTの細胞外ドメイン（ECD）は下線付き斜体フォントで示される）。

30

【0141】

【化4】

TIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQL
LAIYSVDLGWHVASVFSDRVVPGPSLGLTFQSLTMNDTGE
YFCTYHTYPGGIYKGRIFLKVQESSDDRNGLAQFQTAPLG
VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTITLTPKVT
CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTF
RSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVE
WQWNGQPAENYKNTQPI MDTDGSYFVYSKLVN VQKSNWEAG
NTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGKIEGRMD LHQRLG
DIVAHL PDGGKGSWEKLIQDQRSHQANPAAHLTGANASLI
GIGGPLLWETRLGLAFLRGLTYHDGALVTMEPGYYYVYSK
VQLSGVGCPLQGLANGLPITHGLYKRTSRYPKELELLVSRR
SPCGRANSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVPGNRLV
RPRDGTRSYFGAFMV (配列番号111)

40

【0142】

実施形態では、本TIGIT－Fc－LIGHTキメラタンパク質は、本明細書に記載の変異体であり得、例えば、本キメラタンパク質は、配列番号11、109、及び110のうちの1つのアミノ酸配列と、少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少

50

なくとも約 62%、又は少なくとも約 63%、又は少なくとも約 64%、又は少なくとも約 65%、又は少なくとも約 66%、又は少なくとも約 67%、又は少なくとも約 68%、又は少なくとも約 69%、又は少なくとも約 70%、又は少なくとも約 71%、又は少なくとも約 72%、又は少なくとも約 73%、又は少なくとも約 74%、又は少なくとも約 75%、又は少なくとも約 76%、又は少なくとも約 77%、又は少なくとも約 78%、又は少なくとも約 79%、又は少なくとも約 80%、又は少なくとも約 81%、又は少なくとも約 82%、又は少なくとも約 83%、又は少なくとも約 84%、又は少なくとも約 85%、又は少なくとも約 86%、又は少なくとも約 87%、又は少なくとも約 88%、又は少なくとも約 89%、又は少なくとも約 90%、又は少なくとも約 91%、又は少なくとも約 92%、又は少なくとも約 93%、又は少なくとも約 94%、又は少なくとも約 95%、又は少なくとも約 96%、又は少なくとも約 97%、又は少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の配列同一性を有する配列を有し得る。

10

【0143】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト IgG4 抗体配列由来のヒンジ - CH2 - CH3 ドメインをリンカーとして用いて、SIRPα の細胞外ドメインと 4-1BBL の細胞外ドメインとを含む。実施形態では、ヒト SIRPα - Fc - 4-1BBL キメラは、以下の配列を有する (SIRPα の細胞外ドメイン (ECD) は下線で示され、変異型 IgG4 CH2 - CH3 - Fc ドメインは斜体フォントで示され、連結リンカーは太字フォントで示され、4-1BBL の細胞外ドメイン (ECD) は下線付き斜体フォントで示される)。

20

【0144】

【化5】

EEELQV IQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFR
GAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGN
ITPADAGTYCYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSA
PVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNE
LSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTREDVHSQV ICEV
AHVT LQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTTQQPVRAENQVN
VTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDGTY
NWMSWL LVNVSAHRDDVKLTCCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYSKYGP PCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLS
GKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNH
YTQKSLSLSLGKIEGRMDACPWAVSGARASPGSAASPRL
REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY
SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR
RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS
EARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ
GATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE (配列番号103)。

30

40

【0145】

実施形態では、マウス SIRPα - Fc - 4-1BBL キメラは、以下の配列を有する (SIRPα の細胞外ドメイン (ECD) は下線で示され、マウス IgG1 CH2 - CH3 - Fc ドメインは斜体フォントで示され、連結リンカーは太字フォントで示され、4-1BBL の細胞外ドメイン (ECD) は下線付き斜体フォントで示される)。

【0146】

50

【化 6】

KELKVTQPEKSVSVAAGDSTVLNCTLTSLLPVGPICKWYRG
VGQSRLLIYSFTGEHFPRVTNVSDATKRNNMDFSIRISNV
TPEDAGTYCYCVKFQKGPSEPDEIQSGGGTEVYVLAKPSP
PEVSGPADRGIPDQKVNFTCKSHGFSPRNITLKWFKDQGE
LHHLETTVNPSGKNVSYNISSTVRVVLNSMDVHSKVICEV
AHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQVN
LTCRAERFYPEDLQLIWLENGNVSRRNDTPKNLTKNTDGTY
NYTSLFLVNSSAHREDVVFTCQVKHDQQPAITRNHTVLGL
AHSSDQGSMTFPGNNATHNWNVPRDCGCKPCICTVPEVS
SVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWF
VDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE
FKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQM
AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIM
DTDGSYFVYSKLVNQQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTE
KSLSHSPGIIIEGRMDRTEPRPALTTTSPNLGTRENNAD
QVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWH
SQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKL
PTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCS
MENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDW
ELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWE (配列番号108)

10

20

【0147】

実施形態では、本SIRP α -Fc-4-1BBLキメラタンパク質は、本明細書に記載の変異体であり得、例えば、本キメラタンパク質は、配列番号103のアミノ酸配列と、少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を有し得る。

30

【0148】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3ドメインをリンカーとして用いて、LIGHTの細胞外ドメインとCD172a (SIRP α)の細胞外ドメインとを含む(このCD172a (SIRP α)-Fc-LIGHTキメラは配列番号8である)。

40

【0149】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質はTIGITの細胞外ドメイン(配列番号10)を含む。

【0150】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は4-1BBLの細胞外ドメイン(配列番号13)を含む。

【0151】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質はGITRLの細胞外ドメイン(配列番号16)を含む。

50

【0152】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は T L 1 A の細胞外ドメイン（配列番号 1 9）を含む。

【0153】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は L I G H T の細胞外ドメイン（配列番号 2）を含む。

【0154】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は O X 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号 2 2）を含む。

【0155】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、T I G I T の細胞外ドメイン（配列番号 1 0）及び 4 - 1 B B L の細胞外ドメイン（配列番号 1 3）を含む。

【0156】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、T I G I T の細胞外ドメイン（配列番号 1 0）及び G I T R L の細胞外ドメイン（配列番号 1 6）を含む。

【0157】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、T I G I T の細胞外ドメイン（配列番号 1 0）及び T L 1 A の細胞外ドメイン（配列番号 1 9）を含む。

【0158】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、T I G I T の細胞外ドメイン（配列番号 1 0）及び L I G H T の細胞外ドメイン（配列番号 2）を含む。

【0159】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、T I G I T の細胞外ドメイン（配列番号 1 0）及び O X 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号 2 2）を含む。

【0160】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、C D 1 7 2 a (S I R P α) の細胞外ドメイン（配列番号 7）及び 4 - 1 B B L の細胞外ドメイン（配列番号 1 3）を含む。

【0161】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、C D 1 7 2 a (S I R P α) の細胞外ドメイン（配列番号 7）及び G I T R L の細胞外ドメイン（配列番号 1 6）を含む。

【0162】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、C D 1 7 2 a (S I R P α) の細胞外ドメイン（配列番号 7）及び T L 1 A の細胞外ドメイン（配列番号 1 9）を含む。

【0163】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、C D 1 7 2 a (S I R P α) の細胞外ドメイン（配列番号 7）及び L I G H T の細胞外ドメイン（配列番号 2）を含む。

【0164】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、C D 1 7 2 a (S I R P α) の細胞外ドメイン（配列番号 7）及び O X 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号 2 2）を含む。

【0165】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列（配列番号 4 6、4 7 又は 4 8）由来のヒンジ - C H 2 - C H 3 ドメインを含む。

【0166】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 1 抗体配列（配列番号 1 1 2 又は 1 1 3）由来のヒンジ - C H 2 - C H 3 ドメインを含む。

【0167】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列（配列番号 4 6、4 7 又は 4 8）由来のヒンジ - C H 2 - C H 3 ドメインを含み、この配列は、S K Y G P P C P S C P（配列番号 4 9）、S K Y G P P C P P C P（配列番号 5 0）、配列番号 5 2（任意に、S K Y G P P C P S C P（配列番号 4 9）又は S K Y G P P C P P C P（配

10

20

30

40

50

列番号 50) は N 末端であり、I E G R M D 配列番号 52 の一方は C 末端である) から選択される少なくとも 1 つの連結リンカーに隣接している。

【0168】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 1 抗体配列 (配列番号 112 又は 113) 由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインを含み、この配列は、S K Y G P P C P S C P (配列番号 49)、S K Y G P P C P P C P (配列番号 50)、配列番号 52 (任意に、S K Y G P P C P S C P (配列番号 49) 又は S K Y G P P C P P C P (配列番号 50) は N 末端であり、I E G R M D 配列番号 52 の一方は C 末端である) から選択される少なくとも 1 つの連結リンカーに隣接している。

【0169】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインをリンカーとして用いて、T I G I T の細胞外ドメインと 4-1 B B L の細胞外ドメインとを含む (この T I G I T-Fc-4-1 B B L キメラは配列番号 14 である)。

【0170】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインをリンカーとして用いて、T I G I T の細胞外ドメインと G I T R L の細胞外ドメインとを含む (この T I G I T-Fc-G I T R L キメラは配列番号 17 である)。

【0171】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインをリンカーとして用いて、T I G I T の細胞外ドメインと T L 1 A の細胞外ドメインとを含む (この T I G I T-Fc-T L 1 A キメラは配列番号 20 である)。

【0172】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインをリンカーとして用いて、T I G I T の細胞外ドメインと L I G H T の細胞外ドメインとを含む (この T I G I T-Fc-L I G H T キメラは配列番号 11 である)。

【0173】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインをリンカーとして用いて、T I G I T の細胞外ドメインと O X 4 0 L の細胞外ドメインとを含む (この T I G I T-Fc-O X 4 0 L キメラは配列番号 23 である)。

【0174】

実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、ヒト I g G 4 抗体配列由来のヒンジ-CH2-CH3 ドメインをリンカーとして用いて、C D 1 7 2 a (S I R P α) の細胞外ドメインと 4-1 B B L の細胞外ドメインとを含む (この C D 1 7 2 a (S I R P α-Fc-4-1 B B L キメラは配列番号 103 である)。

【0175】

実施形態では、キメラタンパク質は、本明細書で同定された配列由来の細胞外ドメインを、本明細書で同定された別の配列由来の細胞外ドメインと組み合わせて含み得る。例えば、T I G I T-Fc-T L 1 A キメラタンパク質の配列は、配列番号 10 に上に開示される T I G I T の細胞外ドメインと、配列番号 19 に上に開示される T L 1 A の細胞外ドメインと、を含み得る。

【0176】

実施形態では、更なるキメラタンパク質及び更なるキメラタンパク質を使用する方法 (例えば、がんの処置及び／又は炎症性疾患の処置において) : T I G I T-Fc-4-1 B B L、T I G I T-Fc-C D 3 0 L、T I G I T-Fc-F a s L、T I G I T-Fc-G I T R L、T I G I T-Fc-T L 1 A、及び T I G I T-Fc-T R A I L。4

10

20

30

40

50

－1 B B L、C D 3 0 L、F a s L、G I T R L、T L 1 A 及び T R A I L のアミノ酸配列はそれぞれ、配列番号 1 2、2 6、3 0、1 5、1 8 及び 4 0 を含む。4－1 B B L、C D 3 0 L、F a s L、G I T R L、T L 1 A 及び T R A I L の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 3、2 7、3 1、1 6、1 9 及び 4 1 である。

【0177】

実施形態では、本キメラタンパク質は、本明細書に記載の変異体であり得、例えば、本キメラタンパク質は、本キメラタンパク質のアミノ酸配列、例えば、配列番号 5、8、11、14、17、20、23、42、43、44、45、又は 103 のうちの 1 又は複数と、少なくとも約 60%、又は少なくとも約 61%、又は少なくとも約 62%、又は少なくとも約 63%、又は少なくとも約 64%、又は少なくとも約 65%、又は少なくとも約 66%、又は少なくとも約 67%、又は少なくとも約 68%、又は少なくとも約 69%、又は少なくとも約 70%、又は少なくとも約 71%、又は少なくとも約 72%、又は少なくとも約 73%、又は少なくとも約 74%、又は少なくとも約 75%、又は少なくとも約 76%、又は少なくとも約 77%、又は少なくとも約 78%、又は少なくとも約 79%、又は少なくとも約 80%、又は少なくとも約 81%、又は少なくとも約 82%、又は少なくとも約 83%、又は少なくとも約 84%、又は少なくとも約 85%、又は少なくとも約 86%、又は少なくとも約 87%、又は少なくとも約 88%、又は少なくとも約 89%、又は少なくとも約 90%、又は少なくとも約 91%、又は少なくとも約 92%、又は少なくとも約 93%、又は少なくとも約 94%、又は少なくとも約 95%、又は少なくとも約 96%、又は少なくとも約 97%、又は少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有する配列を有し得る。

10

20

【0178】

実施形態では、キメラタンパク質は、本明細書に記載のタンパク質配列のいずれかと比較して 1 又は複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含み得る。実施形態では、1 又は複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失及び切断から独立して選択され得る。

【0179】

実施形態では、アミノ酸変異はアミノ酸置換であり、保存的置換及び／又は非保存的置換を含み得る。

【0180】

「保存的置換」は、例えば、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、溶解度、疎水性、親水性、及び／又は両親媒性の性質における類似性に基づいて行われ得る。20 個の天然アミノ酸は、以下の 6 つの標準アミノ酸群に分類され得る。(1) 疎水性：M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；(2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；(3) 酸性：A s p、G l u；(4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；(5) 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o；及び(6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

30

【0181】

本明細書で使用される場合、「保存的置換」は、上に示される 6 つの標準アミノ酸基の同じ群内に列挙される別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。例えば、G l u による A s p の交換は、そのように修飾されたポリペプチド中に 1 つの負の電荷を保持する。更に、グリシン及びプロリンは、 α ヘリックスを破壊する能力に基づいて互いに置換され得る。

40

【0182】

本明細書で使用される場合、「非保存的置換」は、上に示される 6 つの標準アミノ酸群(1)～(6)の異なる群に列挙される別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。

【0183】

実施形態では、置換は、非古典的アミノ酸(例えば、セレノシステイン、ピロリジン、N－ホルミルメチオニン β －アラニン、G A B A 及び δ －アミノレブリン酸、4－アミノ安息香酸(P A B A)、共通アミノ酸のD－異性体、2，4－ジアミノ酪酸、 α －アミノ

50

イソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコスム、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロ-アミノ酸、設計アミノ酸、例えば、 β -メチルアミノ酸、 $C\alpha$ -メチルアミノ酸、 $N\alpha$ -メチルアミノ酸、及び一般的なアミノ酸類似体)も含み得る。

【0184】

コドン縮重を考慮することを含めて、遺伝暗号を参照することによってキメラタンパク質のヌクレオチド配列に突然変異も行われ得る。

【0185】

実施形態では、キメラタンパク質は、リンカーを含む。実施形態では、リンカーは、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含む。本明細書の他の箇所に記載されるように、ジスルフィド結合を形成することができるそのような少なくとも1つのシステイン残基は、理論に拘束されることを望まないが、キメラタンパク質の適切な多量体状態を維持し、効率的な産生を可能にする役割を果たす。

【0186】

実施形態では、リンカーは、天然に存在するマルチドメインタンパク質に由来してもよく、又は例えばChichili et al., (2013), Protein Sci. 22(2):153-167, Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369に記載されているような経験的リンカーであり、これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、リンカーは、Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369及びCrasto et al., (2000), Protein Eng. 13(5):309-312に記載されているものなどのリンカー設計データベース及びコンピュータプログラムを使用して設計され得、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0187】

実施形態では、リンカーは、PEGなどの合成リンカーである。

【0188】

実施形態では、リンカーは、ポリペプチドである。実施形態では、リンカーは、約500アミノ酸長、約450アミノ酸長、約400アミノ酸長、約350アミノ酸長、約300アミノ酸長、約250アミノ酸長、約200アミノ酸長、約150アミノ酸長、又は約100アミノ酸長未満である。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3又は約2アミノ酸長未満であり得る。実施形態では、リンカーは可撓性である。別の実施形態では、リンカーは剛性である。

【0189】

実施形態では、リンカーは、グリシン残基及びセリン残基(例えば、約30%、又は約40%、又は約50%、又は約60%、又は約70%、又は約80%、又は約90%、又は約95%、又は約97%、又は約98%、又は約99%、又は約100%のグリシン及びセリン)を実質的に含む。

【0190】

実施形態では、リンカーは、抗体のヒンジ領域(例えば、IgG、IgA、IgD、及びIgEであり、サブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、並びにIgA1及びIgA2)を含む。IgG、IgA、IgD及びIgEクラスの抗体に見られるヒンジ領域は、フレキシブルスパーサーとして作用し、Fab部分が空間内で自由に動くことを可能にする。定常領域とは対照的に、ヒンジドメインは構造的に多様で

10

20

30

40

50

あり、免疫グロブリンクラス及びサブクラスの間で配列及び長さの両方が異なる。例えば、ヒンジ領域の長さ及び可撓性は、IgGサブクラス間で異なる。IgG1のヒンジ領域はアミノ酸216～231を包含し、それは自由に柔軟であるので、Fab断片はそれらの対称軸の周りを回転し、2つの重鎖間ジスルフィド架橋のうちの最初の重鎖間ジスルフィド架橋を中心とする球内を移動することができる。IgG2は、IgG1よりも短いヒンジを有し、12アミノ酸残基及び4つのジスルフィド架橋を有する。IgG2のヒンジ領域はグリシン残基を欠き、比較的短く、余分な重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化された堅固なポリプロリン二重らせんを含む。これらの特性は、IgG2分子の柔軟性を制限する。IgG3は、62個のアミノ酸（21個のプロリン及び11個のシステインを含む）を含有し、柔軟性のないポリプロリン二重らせんを形成するその固有の伸長ヒンジ領域（IgG1ヒンジの約4倍の長さ）によって他のサブクラスとは異なる。IgG3では、Fab断片はFc断片から比較的遠く離れており、分子により大きな柔軟性を与える。IgG3中の細長いヒンジもまた、他のサブクラスと比較してそのより高い分子量の原因である。IgG4のヒンジ領域はIgG1のヒンジ領域よりも短く、その柔軟性はIgG1とIgG2との中間である。ヒンジ領域の可撓性は、IgG3>IgG1>IgG4>IgG2の順序で減少すると報告されている。実施形態では、リンカーは、ヒトIgG4に由来し得、二量体化（S228Pを含む）又はFcRn結合を増強するための1又は複数の突然変異を含み得る。

10

【0191】

結晶学的研究によれば、免疫グロブリンヒンジ領域は、3つの領域：上部ヒンジ領域、コア領域、及び下部ヒンジ領域に機能的に更に細分され得る。Shin et al., 1992 Immunological Reviews 130:87を参照されたい。上部ヒンジ領域は、CH1のカルボキシル末端から、動きを制限するヒンジ内の第1の残基、一般に2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合を形成する第1のシステイン残基までのアミノ酸を含む。上部ヒンジ領域の長さは、抗体のセグメント柔軟性と相関する。コアヒンジ領域は重鎖間ジスルフィド架橋を含み、下部ヒンジ領域はCH2ドメインのアミノ末端を結合し、CH2中の残基を含む。Id. 野生型ヒトIgG1のコアヒンジ領域は、ジスルフィド結合形成によって二量体化されると、ピボットとして作用すると考えられる環状オクタペプチドをもたらし、したがって柔軟性を付与する配列Cys-Pro-Pro-Cysを含む。実施形態では、本リンカーは、任意の抗体（例えば、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、並びにIgA1及びIgA2）を含むIgG、IgA、IgD、及びIgE）の、上部ヒンジ領域、コア領域及び下部ヒンジ領域のうちの1つ、又は2つ、又は3つを含む。ヒンジ領域はまた、炭水化物結合のための多数の構造的に異なるタイプの部位を含む1又は複数のグリコシル化部位を含み得る。例えば、IgA1は、ヒンジ領域の17アミノ酸セグメント内に5つのグリコシル化部位を含み、分泌免疫グロブリンにとって有利な特性と考えられる腸プロテアーゼに対するヒンジ領域ポリペプチドの耐性を付与する。実施形態では、本開示のリンカーは、1又は複数のグリコシル化部位を含む。

20

30

【0192】

実施形態では、リンカーは、抗体（例えば、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、並びにIgA1及びIgA2）を含むIgG、IgA、IgD、及びIgE）のFcドメインを含む。実施形態では、リンカーは、ヒトIgG4抗体に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。実施形態では、リンカーは、ヒトIgG1抗体に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。実施形態では、Fcドメインは、新生児型Fc受容体（FcRn）に対する親和性の増加及び結合の増強を示す。実施形態では、Fcドメインは、親和性を増加させ、FcRnへの結合を増強する1又は複数の変異を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、親和性の増加及びFcRnへの結合の増強は、本発明のキメラタンパク質のインビボ半減期を増加させると考えられる。

40

【0193】

50

実施形態では、Fcドメインリンカーはアミノ酸残基250、252、254、256、308、309、311、416、428、433若しくは434（参照により本明細書に明確に組み込まれる、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)にあるように、Kabatナンバリングに従う）又はその等価物における1又は複数のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、アミノ酸残基250におけるアミノ酸置換は、グルタミンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基252におけるアミノ酸置換は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン又はトレオニンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基254におけるアミノ酸置換は、トレオニンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基256におけるアミノ酸置換は、セリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はトレオニンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基308におけるアミノ酸置換は、トレオニンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基309におけるアミノ酸置換はプロリンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基311におけるアミノ酸置換は、セリンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基385におけるアミノ酸置換は、アルギニン、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、ヒスチジン、リジン、アラニン又はグリシンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基386におけるアミノ酸置換は、トレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リジン、アルギニン、イソロイシン又はメチオニンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基387におけるアミノ酸置換は、アルギニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、トレオニン又はアラニンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基389におけるアミノ酸置換は、プロリン、セリン又はアスパラギンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基416におけるアミノ酸置換は、ロイシンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基428におけるアミノ酸置換は、セリンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基433におけるアミノ酸置換は、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、又はグルタミンによる置換である。一実施形態では、アミノ酸残基434におけるアミノ酸置換は、ヒスチジン、フェニルアラニン、又はチロシンによる置換である。

10

20

30

40

50

【0194】

実施形態では、Fcドメインリンカー（例えば、IgG定常領域を含む）が1又は複数の変異、例えばアミノ酸残基252、254、256、433、434又は436（参照により本明細書に明示的に組み込まれる、Kabat, et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)にあるように、Kabatナンバリングに従う）における置換を含む。一実施形態では、IgG定常領域は、三重M252Y/S254T/T256E変異又はYTE変異を含む。別の実施形態では、IgG定常領域は、三重H433K/N434F/Y436H突然変異又はKFH突然変異を含む。更なる実施形態では、IgG定常領域は、YTE突然変異及びKFH突然変異を組み合わせる含む。

【0195】

実施形態では、本発明の改変ヒト化抗体は、アミノ酸残基250、253、307、310、380、416、428、433、434及び435に1又は複数の変異を含有するIgG定常領域を含む。例示的な変異は、T250Q、M428L、T307A、E380A、I253A、H310A、R416S、M428L、H433K、N434A、N434F、N434S及びH435Aを含む。一実施形態では、IgG定常領域は、M428L/N434S変異又はLS変異を含む。別の実施形態では、IgG定常領域は、T250Q/M428L変異又はQL変異を含む。別の実施形態では、IgG定常領域は、N434A変異を含む。別の実施形態では、IgG定常領域は、T307A/E380

A / N 4 3 4 A 変異又は A A A 変異を含む。別の実施形態では、I g G 定常領域は、I 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A 変異又は I H H 変異を含む。別の実施形態では、I g G 定常領域は H 4 3 3 K / N 4 3 4 F 変異を含む。別の実施形態では、I g G 定常領域は、M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E 変異及び H 4 3 3 K / N 4 3 4 F 変異を組み合わせる。含む。

【0196】

I g G 定常領域における更なる例示的な変異は、例えば、Robbie, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2013), 57 (12): 6147-6153, Dall'Acqua et al., JBC (2006), 281 (33): 23514-24, Dall'Acqua et al., Journal of Immunology (2002), 169: 5171-80, Ko et al. Nature (2014) 514: 642-645, Greys et al. Journal of Immunology. (2015), 194 (11): 5497-508, and U.S. Patent No. 7,083,784 に記載されており、これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0197】

実施形態では、リンカーは、配列番号 46 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性を含む。実施形態では、安定性及び／又は半減期を増加させるために、配列番号 46 に変異が行われる。例えば、実施形態では、リンカーは、配列番号 47 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性を有する。実施形態では、リンカーは、配列番号 48 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性を含む。

20

【0198】

実施形態では、リンカーは、配列番号 113 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性を含む。実施形態では、安定性及び／又は半減期を増加させるために、配列番号 113 に変異が行われる。例えば、実施形態では、リンカーは、配列番号 47 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性を有する。実施形態では、リンカーは、配列番号 48 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性を含む。

30

【0199】

理論に拘束されることを望むものではないが、キメラタンパク質中に F c ドメインの少なくとも一部を含むリンカーを含むことは、不溶性であり、おそらく非機能性のタンパク質コンカテマー及び／又は凝集体の形成を回避するのに役立つ。これは、キメラタンパク質間にジスルフィド結合を形成することができる F c ドメイン中のシステインの存在に部分的に起因する。

【0200】

例示的な F c 安定化変異体は S 2 2 8 P である。例示的な F c 半減期延長変異体は、T 2 5 0 Q、M 4 2 8 L、V 3 0 8 T、L 3 0 9 P 及び Q 3 1 1 S であり、本発明のリンカーは、これらの変異体の 1 つ又は 2 つ又は 3 つ又は 4 つ又は 5 つを含み得る。

40

【0201】

更に、1 又は複数の連結リンカーが使用されて、リンカー中の F c ドメイン（例えば、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 112 若しくは配列番号 113 のうちの 1 つ、又はそれらと少なくとも 90 %、又は 93 %、又は 95 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % の同一性）と細胞外ドメインとが連結され得る。例えば、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、又はそれらの変異体のいずれか 1 つは、本明細書に記載の細胞外ドメインと本明細書に記載の

50

リンカーとを連結し得る。任意に、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、又はそれらの変異体のいずれか 1 つは、本明細書に記載の細胞外ドメインと本明細書に記載のリンカーとの間で置換される。任意に、配列番号 49～95 のいずれか 1 つ又はその変異体は、本明細書に記載の細胞外ドメインと本明細書に記載の Fc ドメインとの間に位置する。実施形態では、キメラタンパク質は、Fc ドメインに先行する 1 つの連結リンカーと、Fc ドメインに後続する第 2 の連結リンカーとを含み、したがって、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る。

【0202】

EC D1－連結リンカー 1－Fc ドメイン－連結リンカー 2－EC D2。

【0203】

実施形態では、第 1 の連結リンカー及び第 2 の連結リンカーは異なってもよく、又は同じであってもよい。

【0204】

例示的なリンカーのアミノ酸配列を以下の表 1 に提供する。

【0205】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1：例示的リンカー（Fc ドメインリンカー及び連結リンカー）

配列番号	配列
4 6	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK
4 7	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVT CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTTTPHSDWLSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSSSWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKS LSLSLGK
4 8	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVT CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKS LSLSLGK
1 1 2	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
1 1 3	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4 9	SKYGPPCPSCP
5 0	SKYGPPCPPCP
5 1	SKYGPP
5 2	IEGRMD
5 3	GGGVPRDCG
5 4	IEGRMDGGGGAGGGG

10

20

30

40

【0 2 0 6】

【表 1 - 2】

55	GGGSGGGS
56	GGGSGGGGSGGG
57	EGKSSGSGSESKST
58	GGSG
59	GGSGGGSGGGSG
60	EAAAKEEAAAKEAAK
61	EAAAREEAAAREEAAAREAAAR
62	GGGGSGGGGSGGGGSAS
63	GGGGAGGGG
64	GS又はGGG又はLE
65	GSGSGS
66	GSGSGSGSGS
67	GGGGSAS
68	APAPAPAPAPAPAPAPAP
69	CPPC
70	GGGGS
71	GGGGS
72	GGGGS
73	GGGGS
74	GGGGS
75	GGGGS
76	GGGGS
77	GGGGS
78	GGGGS
79	GGGGS
80	GGGGS
81	EAAAK
82	EAAAKEEAAK
83	EAAAKEEAAAKEEAAK
84	AEAAAKEEAAKA
85	AEAAAKEEAAAKEEAAKA
86	AEAAAKEEAAAKEEAAAKEEAAKA
87	AEAAAKEEAAAKEEAAAKEEAAAKEEAAKA
88	AEAAAKEEAAAKEEAAAKEEAAAKEEAAKA EAAAKEEAAAKEEAAKA
89	PAPAP
90	KESGVSSEQLAQFRSLD
91	GSAGSAAGSGEF
92	GGGSE
93	GSESG
94	GSEGS
95	GEGGSGEGSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGG SEGGG

10

20

30

40

【0207】

更なる例示的な連結リンカーは、限定されないが、配列 LE、GGGGS（配列番号 70）、 $(GGGGS)_n$ ($n=1-4$)（配列番号 70-73）、 $(Gly)_8$ （配列番号 79）、 $(Gly)_6$ （配列番号 80）、 $(EAAAK)_n$ ($n=1-3$)（配列番号 81-83）、 $A(EAAAK)_nA$ ($n=2-5$)（配列番号 84-87）、 $AEAAAKEEAAKA$ （配列番号 84）、 $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ （配列番号 88）、PAPAP（配列番号 89）、KESGVSSEQLAQFRSLD（配列番号 90）、EGKSSGSGSESKST（配列番号 57）、GSAGSAAGSGEF（配列番号 91）、及び $(XP)_n$ を有するリンカーを含み、X は任意のアミノ

50

酸、例えばA l a、L y s、又はG l uを示す。

【0208】

実施形態では、連結リンカーは、グリシン残基及びセリン残基（例えば、約30%、又は約40%、又は約50%、又は約60%、又は約70%、又は約80%、又は約90%、又は約95%、又は約97%、又は約98%、又は約99%、又は約100%のグリシン及びセリン）を実質的に含む。例えば、実施形態では、連結リンカーは、(G l y₄ S e r)_nであり、ここで、nは、約1～約8、例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8（それぞれ配列番号70～配列番号77）である。実施形態では、連結リンカー配列は、G G S G G S G G G G S G G G G S（配列番号78）である。更なる例示的な連結リンカーは、限定されないが、配列L E、(G l y)₈（配列番号79）、(G l y)₆（配列番号80）、(E A A A K)_n（n=1-3）（配列番号81-配列番号83）、A (E A A A K)_n A（n=2-5）（配列番号84-配列番号87）、A (E A A A K)₄ A L E A (E A A A K)₄ A（配列番号88）、P A P A P（配列番号89）、K E S G S V S S E Q L A Q F R S L D（配列番号90）、G S A G S A A G S G E F（配列番号91）及び(X P)_nを有するリンカーを含み、Xは任意のアミノ酸、例えばA l a、L y s又はG l uを示す。実施形態では、連結リンカーは、G G Sである。

10

【0209】

実施形態では、連結リンカーは、G G G S E（配列番号92）、G S E S G（配列番号93）、G S E G S（配列番号94）、G E G G S G E G S S G E G S S S E G G G S E G G G S E G G G S E G G S（配列番号95）のうちの1又は複数並びに4アミノ酸間隔ごとにランダムに配置されたG、S及びEの連結リンカーである。

20

【0210】

実施形態では、キメラタンパク質は、モジュラーリンカーを含む。

【0211】

実施形態では、リンカーは可撓性であり得、これには高度に可撓性が含まれるが、これに限定されない。実施形態では、リンカーは、剛性アルファヘリックスを含むがこれに限定されない剛性であり得る。

【0212】

実施形態では、リンカーは機能的であり得る。例えば、限定されないが、リンカーは、本発明のキメラタンパク質の折り畳み及び／又は安定性を改善し、発現を改善し、薬物動態を改善し、及び／又は生物活性を改善するように機能し得る。別の例では、リンカーは、キメラタンパク質を特定の細胞型又は位置に標的化するように機能し得る。

30

【0213】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫活性化（例えば、腫瘍に対して）を促進することができ、それを含む方法で使用され得る。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫阻害（例えば、腫瘍が生存することを可能にする）を抑制することができ、それを含む方法で使用され得る。実施形態では、本キメラタンパク質は、構築物のキメラ性によって提供されるシグナル伝達の近接に起因して、免疫活性化の改善及び／又は免疫阻害の抑制の改善を提供する。

【0214】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫応答の振幅を調節すること、例えばエフェクター出力のレベルを調節することができるか、又はそれを含む方法で使用され得る。実施形態では、例えば、がんの処置に使用される場合、本発明のキメラタンパク質は、免疫阻害と比較して免疫刺激の程度を変化させてT細胞応答の振幅を増加させ、それはサイトカイン産生、増殖又は標的殺傷能の増加レベルの刺激を含むが、これらに限定されない。

40

【0215】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、実施形態では、腫瘍細胞の表面上の阻害性リガンドをマスキングし、その免疫阻害性リガンドを免疫刺激性リガンドで置き換えることができるか、又はそれを含む方法に使用を見出す。したがって、本発明のキメラタン

50

パク質は、実施形態では、阻害性免疫シグナルを低減若しくは排除すること、及び／又は免疫刺激シグナルを増大若しくは活性化することができるか、又はそれを含む方法において使用を見出す。例えば、阻害性シグナルを有する（したがって、免疫応答を回避する）腫瘍細胞は、その後腫瘍細胞を攻撃することができるT細胞上の陽性シグナル結合の代わりに使用され得る。したがって、実施形態では、阻害性免疫シグナルは、本発明の構築物によってマスクされ、刺激性免疫シグナルは活性化される。このような有益な特性は、本発明のキメラタンパク質の単一構築物アプローチによって増強される。例えば、シグナル置換はほぼ同時に行われ得、シグナル置換は臨床的に重要な部位（例えば、腫瘍微小環境）で局所的になるように調整される。更なる実施形態は、他のキメラタンパク質構築物、例えば、とりわけ、(i) TIGITの細胞外ドメイン及び(ii) 4-1BBLの細胞外ドメイン；(i) TIGITの細胞外ドメイン及び(ii) GITRLの細胞外ドメイン；(i) TIGITの細胞外ドメイン及び(ii) TL1Aの細胞外ドメイン；(i) TIGITの細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；並びに(i) PD-1の細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；並びに(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；並びに(i) TIGITの細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) 4-1BBLの細胞外ドメイン；(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) GITRLの細胞外ドメイン；(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) TL1Aの細胞外ドメイン；(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；並びに(i) PD-1の細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；並びに(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメイン；並びに(i) CD172a (SIRPα)の細胞外ドメイン及び(ii) LIGHTの細胞外ドメインに同じ原理を適用する。

10

20

30

40

50

【0216】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫刺激受容体／リガンド対の結合を刺激又は増強することが可能であるか、又はそれを含む方法で使用を見出す。例示的なT細胞共刺激受容体及びそれらのリガンドは、OX-40：OX40-L、CD27：CD70、CD30：CD30-L、CD40：CD40-L；CD137：CD137-L、HVEM：LIGHT、GITR：GITR-L、TNFRSF25：TL1A、DR5：TRAIL及びBTLA：HVEMを含む。実施形態では、本キメラタンパク質は、免疫抑制性受容体／リガンド対の結合を阻害するか、又は低下させることができるか、あるいはそれを含む方法において使用を見出す。例示的なT細胞共阻害受容体及びそれらのリガンドは、例えば、とりわけ、CTLA-4：CD80／CD86、PD-1：PD-L1／PD-L2、BTLA：HVEM、TIM-3：ガレクチン-9／ホスファチジルセリン、TIGIT／CD155又はCD112、CD172a (SIRPα)／CD47、B7H3R／B7H3、B7H4R／B7H4、CD244／CD48、TMIGD2／HHLA2を含む。

【0217】

実施形態では、本キメラタンパク質は、PD-1及びPD-L1若しくはPD-L2並びに／又はPD-1とPD-L1若しくはPD-L2との結合をブロック、低減及び／又は阻害する。実施形態では、本キメラタンパク質は、CTLA-4の活性並びに／又はCTLA-4とAP2M1、CD80、CD86、SHP-2及びPPP2R5Aのうち1又は複数との結合を遮断、低減及び／又は阻害する。実施形態では、本キメラタンパク質は、GITR及び／又はGITRと1又は複数のGITRリガンドとの結合を増加及び／又は刺激する。実施形態では、本キメラタンパク質は、OX40及び／又はOX40と1又は複数のOX40リガンドとの結合を増加及び／又は刺激する。

【0218】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫調節を増強、回復、促進及び／又は刺激することができるか、又はそれを含む方法で使用を見出す。実施形態では、本明細書

に記載の本キメラタンパク質は、限定するものではないが、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M1マクロファージ）、B細胞、及び樹状細胞を含む腫瘍細胞に対する1又は複数の免疫細胞の活性又は活性化を回復、促進及び／又は刺激する。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、T細胞の活性及び／又は活性化を増強、回復、促進及び／又は刺激し、これは、非限定的な例として、生存促進シグナル、自己分泌又は傍分泌増殖シグナル；p38 MAPK媒介シグナル、ERK媒介シグナル、STAT媒介シグナル、JAK媒介シグナル、AKT媒介シグナル又はPI3K媒介シグナル；抗アポトーシスシグナル；及び／又は炎症誘発性サイトカイン産生若しくはT細胞遊走若しくはT細胞腫瘍浸潤の1又は複数を促進する及び／又はそれらに必要なシグナルを含む1又は複数のT細胞固有シグナルを活性化及び／又は刺激することを含む。

10

【0219】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、T細胞（限定されないが、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞を含む）、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、樹状細胞、単球及びマクロファージ（例えば、M1及びM2のうちの1又は複数）のうちの1又は複数の腫瘍又は腫瘍微小環境への増加を引き起こすことができるか、又はそれを含む方法で見出す。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、腫瘍及び／又は腫瘍微小環境（TME）への免疫抑制細胞（例えば、骨髄由来抑制細胞（MDSC）、制御性T細胞（Treg）、腫瘍関連好中球（TAN）、M2マクロファージ、及び腫瘍関連マクロファージ（TAM）の動員の減少を阻害する、及び／又は引き起こす方法において使用可能であるか、又はそれを含む方法において使用を見出す。実施形態では、本療法は、腫瘍部位及び／又はTMEにおけるM1マクロファージ対M2マクロファージの比を変化させて、M1マクロファージを優先し得る。

20

【0220】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、有効量の本明細書に記載のキメラタンパク質を対象に投与することを含む、腫瘍に対するT細胞不活性化及び／又は免疫寛容を阻害及び／又は低減することができ、それを含む方法で使用され得る。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-17F及びIL-22のうちの1又は複数を含むがこれらに限定されない様々なサイトカインの血清レベルを上昇させることができる。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、処置された対象の血清中のIL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-22、TNF α 又はIFN γ を増強することができる。実施形態では、本キメラタンパク質の投与は、TNF α 分泌を増強することができる。特定の実施形態では、本キメラタンパク質の投与は、白血球による超抗原媒介TNF α 分泌を増強することができる。そのようなサイトカイン応答の検出は、示されたキメラタンパク質のための最適な投薬レジメンを決定するための方法を提供し得る。

30

【0221】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、抗腫瘍CD8+及び／又はCD4+T細胞の細胞死を阻害、遮断及び／又は減少させるか、あるいは腫瘍形成促進性T細胞の細胞死を刺激し、誘導し、及び／又は増加させる。T細胞疲弊は、増殖機能及びエフェクター機能の進行性喪失を特徴とし、クローン欠失に至るT細胞機能不全の状態である。したがって、腫瘍促進性T細胞は、多くの慢性感染症及びがんの間に生じるT細胞機能不全の状態を指す。この機能不全は、不十分な増殖及び／又はエフェクター機能、阻害性受容体の持続的発現、及び機能的エフェクター又はメモリーT細胞の転写状態とは異なる転写状態によって定義される。疲弊は、感染及び腫瘍の最適な制御を妨げる。更に、抗腫瘍CD8+及び／又はCD4+T細胞は、腫瘍に対する免疫応答を開始することができるT細胞を指す。例示的な腫瘍形成促進性T細胞は、1又は複数のチェックポイント阻害受容体を発現するTreg、CD4+及び／又はCD8+T細胞、Th2細胞及びTh17細胞を含

40

50

むが、これらに限定されない。チェックポイント阻害性受容体は、制御されていない免疫応答を防止又は阻害する免疫細胞上に発現される受容体を指す。

【0222】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、制御性T細胞に対するエフェクターT細胞の比を増加させることができ、それを含む方法で使用され得る。例示的なエフェクターT細胞は、ICOS⁺エフェクターT細胞；細胞傷害性T細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD8⁺、CD45RO⁺）；CD4⁺エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、CCR7⁺、CD62L^{hi}、IL-7R/CD127⁺）；CD8⁺エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD8⁺、CCR7⁺、CD62L^{hi}、IL-7R/CD127⁺）；エフェクターメモリーT細胞（例えば、CD62L^{low}、CD44⁺、TCR、CD3⁺、IL-7R/CD127⁺、IL-15R⁺、CCR7^{low}）；セントラルメモリーT細胞（例えば、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺；又はCCR7^{hi}、CD44⁺、CD62L^{hi}、TCR、CD3⁺、IL-7R/CD127⁺、IL-15R⁺）；CD62L⁺エフェクターT細胞；初期エフェクターメモリーT細胞（CD27⁺CD62L⁻）及び後期エフェクターメモリーT細胞（CD27⁻CD62L⁻）を含むCD8⁺エフェクターメモリーT細胞（TEM）（それぞれTemE及びTemL）；CD127⁽⁺⁾CD25^(低/-)エフェクターT細胞；CD127⁽⁻⁾CD25⁽⁻⁾エフェクターT細胞；CD8⁺幹細胞メモリーエフェクター細胞（TSCM）（例えば、CD44^(低)CD62L^(高)CD122^(高)sc α ⁽⁺⁾）；TH1エフェクターT細胞（例えば、CXCR3⁺、CXCR6⁺及びCCR5⁺；又は $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、IL-12R⁺、IFN γ R⁺、CXCR3⁺）；TH2エフェクターT細胞（例えば、CCR3⁺、CCR4⁺及びCCR8⁺；又は $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、IL-4R⁺、IL-33R⁺、CCR4⁺、IL-17RB⁺、CRTH2⁺）；TH9エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺）；TH17エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、IL-23R⁺、CCR6⁺、IL-1R⁺）；CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺エフェクターT細胞、CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁽⁻⁾エフェクターT細胞；並びにIL-2、IL-4及び／又はIFN- γ を分泌するエフェクターT細胞を含む。例示的な制御性T細胞は、ICOS⁺制御性T細胞、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺制御性T細胞、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞、CD4⁺CD25⁻制御性T細胞、CD4⁺CD25^高制御性T細胞、TIM-3⁺PD-1⁺制御性T細胞、リンパ球活性化遺伝子-3（LAG-3）⁺制御性T細胞、CTLA-4/CD152⁺制御性T細胞、ニューロピリン-1（Nr p -1）⁺制御性T細胞、CCR4⁺CCR8⁺制御性T細胞、CD62L（L-セレクトイン）⁺制御性T細胞、CD45RB^低制御性T細胞、CD127^低制御性T細胞、LRRC32/GARP⁺制御性T細胞、CD39⁺制御性T細胞、GITR⁺制御性T細胞、LAP⁺制御性T細胞、1B1⁺制御性T細胞、BTLA⁺制御性T細胞、1型制御性T細胞（Tr1細胞）、Tヘルパー3型（Th3）細胞、ナチュラルキラーT細胞表現型の制御性細胞（NKTr eg ）、CD8⁺制御性T細胞、CD8⁺CD28⁻制御性T細胞及び／又はIL-10、IL-35、TGF- β 、TNF- α 、ガレクチン-1、IFN- γ 及び／又はMCP1を分泌する制御性T細胞を含む。

【0223】

実施形態では、キメラタンパク質は、例えば、再発を防止することができるか、又は動物を再チャレンジから保護することができる記憶応答を生成する。したがって、キメラタンパク質で処置された動物は、その後、キメラタンパク質での初期処置後に再チャレンジされたときに、腫瘍細胞を攻撃し、及び／又は腫瘍の発生を予防することができる。したがって、本開示のキメラタンパク質は、活発な腫瘍破壊及びまた腫瘍抗原の免疫認識の両方を刺激し、これらは再発を予防することができる記憶応答をプログラムするのに不可欠である。

【0224】

10

20

30

40

50

実施形態では、本キメラタンパク質は、約 12 時間、約 24 時間、約 48 時間、約 72 時間若しくは約 96 時間、又は約 1 週間若しくは約 2 週間以下にわたってエフェクター T 細胞を一過性に刺激することができ、それを含む方法で使用され得る。実施形態では、本キメラタンパク質は、約 12 時間、約 24 時間、約 48 時間、約 72 時間若しくは約 96 時間、又は約 1 週間若しくは約 2 週間以下にわたって、制御性 T 細胞を一過性に枯渇又は阻害することができ、それを含む方法において使用され得る。実施形態では、エフェクター T 細胞の一過性刺激及び／又は制御性 T 細胞の一過性の枯渇若しくは阻害は、実質的に患者の血流中、又は例えば骨髄、リンパ節、脾臓、胸腺、粘膜関連リンパ組織 (MALT) などのリンパ組織、非リンパ組織若しくは腫瘍微小環境を含む特定の組織／場所で起こる。

10

【0225】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、限定されないが、使用の容易さ及び製造の容易さを含む利点を提供する。これは、2つの異なる免疫療法剤が単一の製品に組み合わされ、2つの独立した製造プロセスの代わりに単一の製造プロセスを可能にするためである。更に、2つの別個の剤の代わりに単一の剤を投与することにより、より容易な投与及びより大きな患者コンプライアンスが可能になる。更に、例えば、多数のジスルフィド結合及びグリコシル化などの翻訳後修飾を含む大きな多量体タンパク質であるモノクローナル抗体とは対照的に、本発明のキメラタンパク質は、製造がより容易で費用効果が高い。

20

【0226】

実施形態では、本キメラタンパク質は、哺乳動物宿主細胞中で分泌可能かつ完全に機能性の一本鎖ポリペプチド鎖として産生可能である。

【0227】

実施形態では、本キメラタンパク質は、予想外にも、細胞外ドメイン成分のそれぞれの結合パートナーへの結合を遅いオフ速度 (K_d 又は K_{off}) で提供する。実施形態では、これは、受容体とリガンドとの予想外に長い相互作用を提供し、逆もまた同様である。そのような効果は、持続的な負のシグナルマスキング効果を可能にする。更に、実施形態では、これは、例えば、エフェクター細胞が抗腫瘍効果のために適切に刺激されることを可能にするために、より長い正のシグナル効果を送達する。例えば、本キメラタンパク質は、例えば、長いオフ速度の結合を介して、T 細胞増殖を提供し、抗腫瘍攻撃を可能にするのに十分なシグナル伝達を可能にする。更なる例として、本キメラタンパク質は、例えば長いオフレート結合を介して、例えばサイトカインなどの刺激シグナルの放出を提供するのに十分なシグナル伝達を可能にする。

30

【0228】

本発明の剤 (例えば、負のシグナルを有する腫瘍細胞及び腫瘍を攻撃することができる T 細胞) によって促進される細胞の安定なシナプスは、腫瘍減少を促進するための空間的配向を提供し、例えば、腫瘍細胞を攻撃するように T 細胞を配置し、及び／又は本発明のキメラタンパク質によってマスクされたものを超える負シグナルを含む負シグナルを腫瘍細胞が送達するのを立体的に防止する。

【0229】

実施形態では、これは、キメラタンパク質の血清 $t_{1/2}$ と比較して、より長いオンターゲット (例えば、腫瘍内) 半減期 ($t_{1/2}$) を提供する。そのような特性は、キメラタンパク質の全身分布に関連し得るオフターゲット毒性を減少させるという複合的な利点を有し得る。

40

【0230】

実施形態では、本剤は、TIGIT を介してシグナルを遮断することによって、NK 細胞及び／又は活性化 T 細胞、記憶 T 細胞及び／又は調節性 T 細胞及び／又はヘルパー T 細胞のサブセットの阻害を予防及び／又は破壊することによって、例えば抗腫瘍であるように特定の免疫細胞が作用することを可能にし、任意に、4-1BB^L、及び／又は GITR^L、及び／又は TL1A^L、及び／又は LIGHT ベースの刺激シグナル伝達を介

50

して更なる免疫応答を生成する。

【0231】

実施形態では、本発明の剤は、特定の免疫細胞が、例えば、内臓細胞及び／又はリンパ系細胞及び／又は他の間質細胞及び／又は上皮細胞及び／又は骨髄細胞に対して、刺激性のL I G H Tに基づくシグナル伝達を刺激及び／又は増加させることによって、例えば、抗腫瘍であるように作用することを可能にし、任意に、P D - 1 - 及び／又はC D 1 7 2 a (S I R P α) - 及び／又はT I G I Tに基づく阻害性シグナル伝達の遮断又は低減を介して更なる免疫応答を作り出す。

【0232】

更に、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、2つの免疫療法剤の部位特異的相互作用の改善を可能にするので、相乗的な治療効果を提供する。

10

【0233】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、オフサイト及び／又は全身毒性を軽減する可能性を提供する。

【0234】

実施形態では、本キメラタンパク質は、現在の免疫療法、例えば本明細書に記載のチェックポイント分子に対する抗体と比較して、副作用、例えばG I合併症の減少を提供する。例示的なG I合併症は、腹痛、食欲不振、自己免疫作用、便秘、痙攣、脱水、下痢、摂食障害、疲労、鼓腸、腹部中の体液又は腹水、胃腸（G I）ディスバイオシス、G I粘膜炎、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群（I B S - D 及びI B S - C）、悪心、疼痛、便又は尿の変化、潰瘍性大腸炎、嘔吐、体液を保持することによる体重増加、及び／又は脱力感を含む。

20

【0235】

実施形態では、リンカーは、フレキシブルアミノ酸配列、I g Gヒンジ領域又は抗体配列から選択されるポリペプチドである。実施形態では、リンカーは、I g G 1又はI g G 4に由来するヒンジ- C H 2 - C H 3 F cドメインを含む。実施形態では、ヒンジ- C H 2 - C H 3 F cドメインはヒトI g G 1に由来する。実施形態では、ヒンジ- C H 2 - C H 3 F cドメインはヒトI g G 4に由来する。実施形態では、リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、リンカーは、配列番号49~95から独立して選択される2つ以上の連結リンカーを含み、ここで、1つの連結リンカーは、ヒンジ- C H 2 - C H 3 F cドメインに対してN末端側にあり、別の連結リンカーは、ヒンジ- C H 2 - C H 3 F cドメインに対してC末端側にある。

30

【0236】

実施形態では、第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、第1のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、組換え融合タンパク質である。

40

【0237】

処置方法

一態様では、本開示は、がんの処置を必要とする対象のがんを処置する方法に関し、前記方法は、N末端- (a) - (b) - (c) - C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a) は、I gドメイン及びI T I Mドメインを有するヒトT細胞免疫受容体（T I G I T）の細胞外ドメインを含む第1のドメ

50

インであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカーであり、(c)は、ヒトLIGHT (リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。いくつかの実施形態では、投与されるキメラタンパク質の用量は、約0.0001mg/kg~約50.0mg/kgであり、任意に、約1mg/kg、約3mg/kg、約6mg/kg又は約10mg/kg、約12mg/kg、約15mg/kg、約18mg/kg、約20mg/kg、約22mg/kg、約25mg/kg、約27mg/kg、約30mg/kg、約33mg/kg、約35mg/kg、約37mg/kg、約40mg/kg、約42mg/kg、約45mg/kg、約48mg/kg及び約50mg/kgから選択される。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトであり、任意で、成体ヒトである。

10

【0238】

実施形態では、キメラタンパク質は、少なくともおよそ1週間に1回投与される。実施形態では、キメラタンパク質は、少なくともおよそ1ヶ月に1回投与される。実施形態では、キメラタンパク質は、少なくともおよそ1ヶ月に2回投与される。実施形態では、キメラタンパク質は、少なくともおよそ1ヶ月に3回投与される。

【0239】

実施形態では、がんは、固形腫瘍(局所及び/又は転移性)又はリンパ腫を含む。実施形態では、がんは、進行がんである。実施形態では、がんは、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)を含む)；小リンパ球性(SL)NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度のびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病(CLL)；急性リンパ性白血病(ALL)；毛状細胞白血病；又は慢性骨髄芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん(胃腸がんを含む)；神経膠芽腫；肝がん；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん(例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん)；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔がん(唇、舌、口、及び咽頭)；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)を含む)；小リンパ球性(SL)NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病(CLL)；急性リンパ芽球性白血病(ALL)；毛状細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害(PTLD)、並びに母斑症、浮腫(例えば、脳腫瘍に関連するもの)、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される。

20

30

40

【0240】

一態様では、本開示は、リンパ球の増殖の誘導を必要とする対象においてリンパ球の増殖を誘導するための方法に関し、前記方法は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a)は、Igドメイン及びITIドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリン

50

カーであり、(c)は、ヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。

【0241】

一態様では、本開示は、リンパ球のマージネーションの誘導を必要とする対象においてリンパ球のマージネーションを誘導するための方法に関し、前記方法は、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a)は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体（TIGIT）の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジCH2－CH3Fcドメインを含むリンカーであり、(c)は、ヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。

【0242】

実施形態では、対象は、約3日ごと～約10日ごと、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、約2週間ごと～約4週間ごと、約3週間ごと～約5週間ごと、約4週間ごと～約6週間ごと、約5週間ごと～約7週間ごと、約6週間ごと～約8週間ごと、及び約6週間ごと～約2ヶ月ごとから選択される投薬レジメンで投与される。

【0243】

実施形態では、第1のドメインは、TIGITリガンドを結合することができる。実施形態では、第1のドメインは、TIGITの細胞外ドメインの実質的に全てを含む。実施形態では、第2のドメインは、LIGHT受容体を結合することができる。実施形態では、第2のドメインは、LIGHTの細胞外ドメインの実質的に全てを含む。

【0244】

実施形態では、リンカーは、フレキシブルアミノ酸配列、IgGヒンジ領域及び／又は抗体配列から選択されるポリペプチドである。実施形態では、リンカーは、IgG1又はIgG4に由来するヒンジCH2－CH3Fcドメインを含む。実施形態では、ヒンジCH2－CH3FcドメインはヒトIgG1又はヒトIgG4に由来する。実施形態では、リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、リンカーは、配列番号49～95から独立して選択される1又は複数の連結リンカーを含む。実施形態では、リンカーは、配列番号49～95から独立して選択される2つ以上の連結リンカーを含み、ここで、1つの連結リンカーは、ヒンジCH2－CH3Fcドメインに対してN末端側にあり、別の連結リンカーは、ヒンジCH2－CH3Fcドメインに対してC末端側にある。

【0245】

実施形態では、第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、第2のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0246】

実施形態では、(a)第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、(b)第2のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、(c)リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。実施形態では、(a)第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配

列を含み、(b)第2のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含み、(c)リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。

【0247】

実施形態では、キメラタンパク質は、SKYGPPCPSCP (配列番号49)、SKYGPPCPPCP (配列番号50)、IEGRMD (配列番号52) から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの連結リンカーを更に含む。実施形態では、キメラタンパク質は、IEGRMD (配列番号52) のアミノ酸配列を含む連結リンカーを含む。実施形態では、IEGRMDのアミノ酸配列は、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列のC末端に位置する。

10

【0248】

実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.2%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.4%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.6%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.8%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は配列番号11のアミノ酸配列を含む。

20

【0249】

実施形態では、処置は、IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1 β (CCL4) TARC (CCL17)、IFN γ 、IL-8、IL-12、及びSDF1a (CXCL12) から選択される1又は複数のサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を誘導する。実施形態では、処置は、サイトカイン放出症候群を誘導しない。実施形態では、処置は、特定の抗CD40抗体又は抗PD-1剤などの他の免疫療法剤と比較して、IL-6の増加がより小さい。

30

【0250】

実施形態では、対象は標準治療を受けたことがある、標準治療に対して耐性がある (been tolerant to)、若しくは標準治療に不適格である、及び／又は前記がんには標準治療と見なされている承認された治療がない。実施形態では、対象は、併用化学療法、免疫療法、生物学的療法又はホルモン療法を受けていない。

40

【0251】

患者のがん処置を決定する方法；がん処置のために患者を選択する方法

【0252】

一態様では、本開示は、がん処置の有効性を、それを必要とする対象において評価する方法に関し、前記方法は、(i)一般構造：N末端-(a)-(b)-(c)-C末端を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、式中、(a)はIgドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体 (TIGIT) の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、(c)はヒトLIGH

50

T（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、ここで、用量は、約0.03mg/kg～約50mg/kgである、工程と、(ii)対象から生物学的試料を得る工程と、(iii)生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1α（CXCL12）から選択されるサイトカインのレベル及び／又は活性を決定する工程と、(iv)対象が、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1α（CXCL12）から選択される少なくとも1つのサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を有する場合、投薬を継続する工程と、を含む。

10

【0253】

一態様では、本開示は、がんの療法による処置のための対象を選択する方法に関し、前記方法は、(i)一般構造：N末端－(a)－(b)－(c)－C末端を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、式中、(a)はIgドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体（TIGIT）の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ－CH2－CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、(c)はヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、ここで、用量は、約0.03mg/kg～約50mg/kgである、工程と、(ii)対象から生物学的試料を得る工程と、(iii)生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1α（CXCL12）から選択されるサイトカインのレベル及び／又は活性を決定する工程と、(iv)対象が、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1α（CXCL12）から選択される少なくとも1つのサイトカインのレベル及び／又は活性の増加を有する場合、がん療法による処置に対して対象を選択する工程と、を含む。

20

30

【0254】

実施形態では、生物学的試料は、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である。実施形態では、生物学的試料は生検試料である。実施形態では、生検試料は、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される。実施形態では、生物学的試料は、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む。

40

【0255】

実施形態では、生物学的試料は、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔（cavities）の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、少なくとも1つの腫瘍細胞を含む。

50

【0256】

実施形態では、腫瘍は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度のびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髓芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝がん；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される。

10

20

【0257】

実施形態では、アッセイは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる。

【0258】

実施形態では、アッセイは、試料を、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a（CXCL12）から選択される少なくとも1つのサイトカインに特異的に結合する1又は複数の剤と接触させることによって行われる。実施形態では、少なくとも1つのサイトカインに特異的に結合する剤は、1又は複数の抗体、抗体様分子又はその断片に結合する。

30

【0259】

実施形態では、アッセイは、試料を、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1β（CCL4）TARC（CCL17）、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a（CXCL12）から選択されるサイトカインをコードする少なくとも1つの核酸に特異的に結合する1又は複数の剤と接触させることによって行われる。実施形態では、少なくとも1つの核酸に特異的に結合する剤は核酸プライマー又はプローブである。

40

【0260】

TIGITリガンドを結合することができる。実施形態では、第1のドメインは、TIGITの細胞外ドメインの実質的に全てを含む。実施形態では、第2のドメインは、LIGHT受容体を結合することができる。実施形態では、第2のドメインは、LIGHTの細胞外ドメインの実質的に全てを含む。

【0261】

実施形態では、リンカーは、フレキシブルアミノ酸配列、IgGヒンジ領域及び／又は

50

抗体配列から選択されるポリペプチドである。実施形態では、リンカーは、IgG1又はIgG4に由来するヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。実施形態では、ヒンジ-CH₂-CH₃ FcドメインはヒトIgG1又はヒトIgG4に由来する。実施形態では、リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、リンカーは、配列番号49～95から独立して選択される1又は複数の連結リンカーを含む。実施形態では、リンカーは、配列番号49～95から独立して選択される2つ以上の連結リンカーを含み、ここで、1つの連結リンカーは、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインに対してN末端側にあり、別の連結リンカーは、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインに対してC末端側にある。

10

【0262】

実施形態では、第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、第2のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0263】

実施形態では、(a)第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、(b)第2のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、(c)リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。実施形態では、(a)第1のドメインは、配列番号10のアミノ酸配列を含み、(b)第2のドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含み、(c)リンカーは、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。

20

【0264】

実施形態では、キメラタンパク質は、SKYGPPCPSCP (配列番号49)、SKYGPPCPPCP (配列番号50)、IEGRMD (配列番号52)から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの連結リンカーを更に含む。実施形態では、キメラタンパク質は、IEGRMD (配列番号52)のアミノ酸配列を含む連結リンカーを含む。実施形態では、IEGRMDのアミノ酸配列は、配列番号46、配列番号47、配列番号112又は配列番号113のアミノ酸配列のC末端に位置する。

30

【0265】

実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、前キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.2%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.4%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.6%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99.8%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は、配列番号11、配列番号109及び配列番号110から選択

40

50

されるアミノ酸配列を含む。実施形態では、キメラタンパク質は配列番号 11 のアミノ酸配列を含む。

【0266】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、(a) 対象から生物学的試料を得ることと、(b) (i) 細胞周期プロセスの正の調節、G1/S 転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示；並びに／あるいは(ii) リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイトミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の存在、非存在、又はレベルについて試料を評価することと、(c) 工程(b)の評価に基づいて、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を選択することと、を含む。

10

【0267】

一態様では、本開示は、がん処置のために患者を選択する方法に関し、前記方法は、(a) 対象から生物学的試料を得ることと、(b) (i) 細胞周期プロセスの正の調節、G1/S転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示；並びに／あるいは(ii) リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイトミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の存在、非存在、又はレベルについて試料を評価することと、(c) PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を選択することと、を含む。

20

30

【0268】

一態様では、本開示は、がん処置の方法に関し、前記方法は、(I) 対象から生物学的試料を得ることと、(II) 試料を、(i) 細胞周期プロセスの正の調節、G1/S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示；並びに／あるいは(ii) リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイトミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の存在、非存在又はレベルについて評価することと、(III) N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含むがん療法を選択することであって、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質

40

50

はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、(IV)任意に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することと、を含む。

10

【0269】

非限定的な実施形態では、細胞周期プロセスの正の調節、G1/S転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及び抗原プロセッシング、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択されるGO経路に関連する遺伝子の上方制御が観察されない場合、並びに／又はリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイトミクロンアセンブリ、形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニット集合、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセスから選択されるGO経路に関連する遺伝子の下方制御が観察されない場合、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することが継続される。

20

【0270】

非限定的な実施形態では、細胞周期プロセスの正の調節、G1/S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示から選択されるGO経路に関連する遺伝子の上方制御が観察される場合；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイトミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択されるGO経路に関連する遺伝子の下方制御が観察される場合、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することが継続され、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含むがん療法の投与の補充は、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

30

40

50

【0271】

非限定的な実施形態では、細胞周期プロセスの正の調節、G1/S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示から選択されるGO経路に関連する遺伝子の上方制御が観察される場合；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択されるGO経路に関連する遺伝子の下方制御が観察される場合、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することが継続されず、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含むがん療法の投与は、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGITであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

【0272】

実施形態では、健康な組織と比較して、(i)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較して、(i)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、(i)に記載のGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。

【0273】

実施形態では、健康な組織と比較した、(i)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する応答を示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した、(i)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する応答を示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、(i)に記載のGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん

療法に対する応答を示す。

【0274】

実施形態では、健康な組織と比較して、(ii)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較して、(ii)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、(ii)に記載のGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されていることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性が発生していること、応答が欠如すること又は不応性であることを示す。

10

【0275】

実施形態では、健康な組織と比較した、(ii)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した、(ii)に列挙されるGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、(ii)に記載のGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0276】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較したGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示し、GO経路は、(a) IFN γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c) I型IFNシグナル伝達経路、(d) I κ Bキナーゼ/NF κ Bシグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに(e) MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択される。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較したGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示し、GO経路は、(a) IFN γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c) I型IFNシグナル伝達経路、(d) I κ Bキナーゼ/NF κ Bシグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに(e) MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択される。実施形態では、標準と比較したGO経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示し、GO経路は、(a) IFN γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c) I型IFNシグナル伝達経路、(d) I κ Bキナーゼ/NF κ Bシグナル伝達及び抗原プロセッシングの正の調節、並びに(e) MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択される。

30

40

【0277】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較してGO経路に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示し、GO経路は、(a) IFN γ に対する細胞応答、

50

(b) 抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c) I 型 I F N シグナル伝達経路、(d) I κ B キナーゼ / N F κ B シグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに (e) M H C クラス I を介した内因性ペプチドの提示から選択される。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較して G O 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示し、G O 経路は、(a) I F N γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c) I 型 I F N シグナル伝達経路、(d) I κ B キナーゼ / N F κ B シグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに (e) M H C クラス I を介した内因性ペプチドの提示から選択される。実施形態では、標準と比較して G O 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示し、G O 経路は、(a) I F N γ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c) I 型 I F N シグナル伝達経路、(d) I κ B キナーゼ / N F κ B シグナル伝達及び抗原プロセッシングの正の調節、並びに (e) M H C クラス I を介した内因性ペプチドの提示から選択される。

10

【0278】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、I F N γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較した、I F N γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、I F N γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0279】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、I F N γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較して、I F N γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、I F N γ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

30

40

【0280】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、I 型 I F N シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較して、I 型 I F N シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 の機能及び / 又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、I 型 I F N シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、

50

P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【 0 2 8 1 】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、I 型 I F N シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較した、I 型 I F N シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、I 型 I F N シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

10

【 0 2 8 2 】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、細胞周期プロセスの正の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較して、細胞周期プロセスの正の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、細胞周期プロセスの正の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

20

【 0 2 8 3 】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、細胞周期プロセスの正の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較した、細胞周期プロセスの正の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、細胞周期プロセスの正の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

30

【 0 2 8 4 】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、G 1 / S 転移の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者と比較して、G 1 / S 転移の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、G 1 / S 転移の調節に関連する 1 又は複数の遺伝子が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

40

50

【0285】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、G1/S転移の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、G1/S転移の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、G1/S転移の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

10

【0286】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、細胞分裂の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、細胞分裂の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、細胞分裂の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

20

【0287】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、細胞分裂の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、細胞分裂の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、細胞分裂の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

30

【0288】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、細胞増殖の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、細胞増殖の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、細胞増殖の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

40

【0289】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、細胞増殖の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、細胞増殖の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／

50

又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、細胞増殖の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

【0290】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、IKBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、IKBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、IKBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

10

【0291】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、IKBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、IKBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較して、IKBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0292】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、自然免疫応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、自然免疫応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、自然免疫応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

30

40

【0293】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、自然免疫応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、自然免疫応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、自然免疫応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

50

【0294】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、抗原プロセッシング／提示の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、抗原プロセッシング／提示の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、抗原プロセッシング／提示の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方

10

【0295】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、抗原プロセッシング／提示の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、抗原プロセッシング／提示の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、抗原プロセッシング／提示の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0296】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

30

【0297】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、MHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

50

【0298】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

10

【0299】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0300】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

30

【0301】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

【0302】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法

50

に感受性であることが知られている患者と比較して、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0303】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

10

【0304】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

20

30

【0305】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

【0306】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能

50

力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0307】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の

10

【0308】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、線維素溶解の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、線維素溶解の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、線維素溶解の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

20

【0309】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、線維素溶解の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、線維素溶解の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、線維素溶解の負の調節に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

30

【0310】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、カイトミクロンアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、カイトミクロンアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、カイトミクロンアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

40

【0311】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、カイトミクロンアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを

50

示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、カイロミクロンアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、カイロミクロンアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

【0312】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、原形質膜修復に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、原形質膜修復に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、原形質膜修復に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0313】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、原形質膜修復に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、原形質膜修復に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、原形質膜修復に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

【0314】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0315】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

準と比較した、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

【0316】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、リボソーム小サブユニットアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、リボソーム小サブユニットアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、リボソーム小サブユニットアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

10

【0317】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、リボソーム小サブユニットアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、リボソーム小サブユニットアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、リボソーム小サブユニットアセンブリに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0318】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

30

【0319】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、リン脂質排出に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

【0320】

50

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、翻訳の調節に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、翻訳の調節に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、翻訳の調節に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

10

【0321】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、翻訳の調節に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、翻訳の調節に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、翻訳の調節に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

20

【0322】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

30

【0323】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

【0324】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、ミトコンドリア翻訳伸長に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法

50

に感受性であることが知られている患者と比較して、ミトコンドリア翻訳伸長に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、ミトコンドリア翻訳伸長に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0325】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、ミトコンドリア翻訳伸長に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、ミトコンドリア翻訳伸長に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、ミトコンドリア翻訳伸長に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

10

【0326】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、DNA依存性DNA複製に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、DNA依存性DNA複製に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、DNA依存性DNA複製に関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

20

30

【0327】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、DNA依存性DNA複製に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、DNA依存性DNA複製に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、DNA依存性DNA複製に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

【0328】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較して、ATP生合成プロセスに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較して、ATP生合成プロセスに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。実施形態では、標準と比較して、ATP生合

50

成プロセスに関連する1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して耐性であること、応答が欠如すること、又は不応性であることを示す。

【0329】

実施形態では、対象からの以前の生物学的試料と比較した、ATP生合成プロセスに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者と比較した、ATP生合成プロセスに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、標準と比較した、ATP生合成プロセスに関連する1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

10

【0330】

実施形態では、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法は、例えば、Rpl41、Rps15及びRps8の1又は複数の発現が高く、並びに／あるいはCd274、B2M、Tap1、Tap2、Casp1及びGasta3の1又は複数の発現が低い場合に示され得る。実施形態では、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法は、例えば、Rpl41、Rps15及びRps8の1又は複数の発現が低く、並びに／あるいはCd274、B2M、Tap1、Tap2、Casp1及びGasta3の1又は複数の発現が高い場合に示され得ない。実施形態では、Rpl41、Rps15及びRps8の1又は複数の低発現並びに／あるいはCd274、B2M、Tap1、Tap2、Casp1及びGasta3の1又は複数の高発現を特徴とする患者は、PD-1非応答性細胞を排除するアジュバント療法又はネオアジュバント療法から利益を得る可能性が高い。

20

【0331】

実施形態では、生物学的試料は、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である。実施形態では、生物学的試料は生検試料である。実施形態では、生検試料は、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される。

30

【0332】

実施形態では、生物学的試料は、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、胸腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む。実施形態では、生物学的試料は、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる。

40

【0333】

実施形態では、生物学的試料は、少なくとも1つの腫瘍細胞を含む。実施形態では、腫瘍は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AI

50

D S 関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髓芽球性白血病から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝がん；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS 関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん；結腸直腸がん；及び副腎がんである。

10

20

【0334】

実施形態では、評価することは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる。

【0335】

実施形態では、評価することは、試料を、（i）細胞周期プロセスの正の調節、G1／S転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示；並びに／あるいは（ii）リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

30

【0336】

実施形態では、評価することは、試料を、（a）IFNγに対する細胞応答、（b）抗原プロセッシング及び提示の負の調節、（c）I型IFNシグナル伝達経路、（d）IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに（e）MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFNα産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に

40

50

結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、炎症応答の調節に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

【0337】

実施形態では、評価することは、試料を、(i)細胞周期プロセスの正の調節、G1/S転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IKKキナーゼ/NF κ Bシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFN γ に対する細胞応答、IFN α 産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFN β 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング及び提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング、提示；並びに／あるいは(ii)リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の核酸の1又は複数に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

【0338】

実施形態では、評価することは、試料を、(a)IFN γ に対する細胞応答、(b)抗原プロセッシング及び提示の負の調節、(c)I型IFNシグナル伝達経路、(d)IKKキナーゼ/NF κ Bシグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに(e)MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択される遺伝子オントロジー(GO)経路に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFN γ に対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFN α 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、防御応答の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFN β 産生の正の調節に関連する1又は複数の遺伝子の1又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、核酸の1又は複数に特異的に結合する剤は、核酸プライマー又はプローブである。

【0339】

実施形態では、評価することは、患者を高リスク群又は低リスク群に分類する情報を与える。実施形態では、高リスク分類には、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが高いことが含まれる。実施形態では、低リスク分類には、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが低いことが含まれる。

【0340】

実施形態では、低リスク又は高リスク分類は、ネオアジュバント療法を保留することを

指示する。実施形態では、低リスク又は高リスク分類は、アジュバント療法を保留することを指示する。実施形態では、評価することは、がん処置に対するポジティブな反応及び／又はがん処置からのポジティブ利益を予測させる。実施形態では、評価することは、がん処置に対するネガティブな反応又は中立的反応並びに／あるいはがん処置からのネガティブな利益又は中立的利益を予測させる。実施形態では、評価することは、ネオアジュバント化学療法に対するポジティブな反応及び／又はネオアジュバント化学療法からのポジティブな利益、あるいはネオアジュバント化学療法に対する非反応性及び／又はネオアジュバント化学療法からの利益の欠如を予測させる。実施形態では、評価することは、アジュバント化学療法に対するポジティブな反応及び／又はアジュバント化学療法からの利益、あるいはアジュバント化学療法に対する非反応性及び／又はアジュバント化学療法からの利益の欠如を予測させる。実施形態では、評価することは、ネオアジュバント化学療法に対するネガティブな反応又は中立的反応及び／又はネオアジュバント化学療法からのネガティブな利益又は中立的利益、あるいはネオアジュバント化学療法に対する非反応性及び／又はネオアジュバント化学療法からの利益の欠如を予測させる。実施形態では、評価することは、アジュバント化学療法に対するネガティブな反応又は中立的反応及び／又はアジュバント化学療法からのネガティブな利益又は中立的利益、あるいはアジュバント化学療法に対する非反応性及び／又はアジュバント化学療法からの利益の欠如を予測させる。実施形態では、評価することは、ネオアジュバント療法の実施を知らせる。実施形態では、評価することは、アジュバント療法の実施を知らせる。実施形態では、評価することは、ネオアジュバント療法の保留を知らせる。実施形態では、評価することは、アジュバント療法の保留を知らせる。実施形態では、ネオアジュバント療法及び／又はアジュバント療法は、化学療法剤である。実施形態では、ネオアジュバント療法及び／又はアジュバント療法は、細胞障害剤である。実施形態では、ネオアジュバント療法及び／又はアジュバント療法は、チェックポイント阻害剤である。

10

20

30

40

50

【0341】

実施形態では、ネオアジュバント療法及び／又はアジュバント療法は、タンパク質翻訳阻害剤（例えば、シルベストロール及びオマセタキシン）リボソーム生合成阻害剤（例えば、ジアザボリン、ラモトリギン及びリボジノインドール）、rRNA及び／又はtRNA合成の阻害剤（例えば、カルフロキシシン（CX-3543）及びCX-5461）、アミノ酸合成の阻害剤（例えば、GLUD1阻害剤R162、BCAT1阻害剤ガバペンチン、グルタミナーゼ阻害剤ビス-2-（5-フェニルアセトアミド-1,2,4-チアジアゾール-2-イル）エチルスルフィド（BPTEs）、PAGDH阻害剤NCT-503）、アミノ酸の取り込みの阻害剤（例えば、SLC7A11阻害剤のスルファサラジン、エラスチン又はソラフェニブ）、翻訳後修飾の調節剤（例えば、グリコシル化阻害剤ツニカマイシン、ppGalNAc-T3）、タンパク質分解の調節剤、及びタンパク質輸送の調節剤（例えば、シクロスポリンA、フェンジリン、パルベンダゾール、パロキセチン、パルテノリド、キナクリン、セルトラリン、スピペロン、チメロサル、アステミゾール、ペルヘキシリン、HUN-7293、CAM741、CK147及びコトランシン）から選択される。

【0342】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、（i）対象から生物学的試料を得ることと、（ii）試料を、細胞周期プロセスの正の調節、G1/S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IKBキナーゼ/NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコン

ドリア呼吸鎖複合体Ⅰ、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御について評価することと、（iii）工程（b）の評価に基づいてがん処置を選択することであって、がん処置が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、Ⅱ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は（B）（a）は、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、Ⅱ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

10

【0343】

一態様では、本開示は、がん処置のための患者を選択するための方法に関し、前記方法は、（i）対象から生物学的試料を得ることと、（ii）試料を、細胞周期プロセスの正の調節、G1／S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IKKキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、Ⅰ型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスⅡを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅰ、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御；について評価することと、（iii）がん療法を選択することであって、がん療法が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（A）（a）は、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、Ⅱ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され；又は（B）（a）は、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、Ⅱ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

20

30

40

【0344】

一態様では、本開示は、がん処置の方法に関し、前記方法は、（i）対象から生物学的試料を得ることと、（ii）試料を、細胞周期プロセスの正の調節、G1／S移行の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IKKキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、Ⅰ型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、

50

防御応答の正の調節、IFN β 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の上方制御；並びに／あるいはリン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイクロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子の下方制御；について評価することと、（iii）がん療法を選択することであって、がん療法が、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、（a）は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

10

【0345】

実施形態では、上方制御は、健康な組織と比較したものである。実施形態では、上方制御は、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較したものである。実施形態では、上方制御は、対象から得られた以前の生物学的試料と比較したものである。実施形態では、下方制御は、健康な組織と比較したものである。実施形態では、下方制御は、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較したものである。実施形態では、下方制御は、対象から得られた以前の生物学的試料と比較したものである。

20

【0346】

実施形態では、生物学的試料は、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である。実施形態では、生物学的試料は生検試料である。実施形態では、生検試料は、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される。実施形態では、生物学的試料は、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む。実施形態では、生物学的試料は、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科器具の使用によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、少なくとも1つの腫瘍細胞を含む。

30

40

【0347】

実施形態では、腫瘍は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度のびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；

50

又は慢性骨髓芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝がん；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される。

10

【0348】

実施形態では、評価することは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、（i）細胞周期プロセスの正の調節、G1／S転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生の正の調節、防御応答の正の調節、IFNβ産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示；並びに／あるいは（ii）リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

20

30

【0349】

実施形態では、評価することは、試料を、（a）IFNγに対する細胞応答、（b）抗原プロセッシング／提示の負の調節、（c）I型IFNシグナル伝達経路、（d）IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに（e）MHCクラスIを介した内因性ペプチドの提示から選択される遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、IFNγに対する細胞応答に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、I型IFNシグナル伝達経路に関連する1又は複数の遺伝子によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。

40

【0350】

実施形態では、評価することは、試料を、（i）細胞周期プロセスの正の調節、G1／S転移の調節、細胞分裂の調節、細胞増殖の調節、IκBキナーゼ／NFκBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFNγに対する細胞応答、IFNα産生

50

の正の調節、防御応答の正の調節、 $IFN\beta$ 産生の正の調節、炎症応答の調節、自然免疫応答の調節、抗原プロセッシング／提示の負の調節、及び MHC クラス I を介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング／提示；並びに／あるいは (ii) リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイクロミクロンアセンブリ、原形質膜修復、膜への SRP 依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の調節、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA 依存性 DNA 複製、及び ATP 生合成プロセスから選択される遺伝子オントロジー (GO) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の核酸の 1 又は複数に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、(a) $IFN\gamma$ に対する細胞応答、(b) 抗原プロセッシング／提示の負の調節、(c) I 型 IFN シグナル伝達経路、(d) IKB キナーゼ／ $NF\kappa B$ シグナル伝達の正の調節、及び抗原プロセッシング、並びに (e) MHC クラス I を介した内因性ペプチドの提示から選択される遺伝子オントロジー (GO) 経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、 $IFN\gamma$ に対する細胞応答に関連する 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、I 型 IFN シグナル伝達経路に関連する 1 又は複数の遺伝子の 1 又は複数の核酸に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、核酸の 1 又は複数に特異的に結合する剤は、核酸プライマー又はプローブである。

10

20

【0351】

実施形態では、評価することは、患者を高リスク群又は低リスク群に分類する情報を与える。実施形態では、高リスク分類には、PD-1、PD-L1 及び／又は PD-L2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが高いことが含まれる。実施形態では、低リスク分類には、PD-1、PD-L1 及び／又は PD-L2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する耐性を有する腫瘍細胞の含有のレベルが低いことが含まれる。実施形態では、低リスク分類は、がん療法を保留することを指示する。実施形態では、高リスク分類は、がん療法を実施することを指示する。

【0352】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、(a) 対象から生物学的試料を得ることと、(b) 生物学的試料を、(i) CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6 及び KRT1 から選択される遺伝子；及び／又は (ii) RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7 及び LRG1 から選択される遺伝子の発現について評価することと、(c) 工程 (b) の評価に基づいてがん療法を選択することと、を含む。

30

【0353】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、(I) 対象から生物学的試料を得ることと、(II) 生物学的試料を、(i) CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6 及び KRT1 から選択される遺伝子；並びに／あるいは (ii) RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7 及び LRG1 から選択される遺伝子の発現について評価することと、(III) 工程 (II) の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、膜貫通タンパク質は TIGIT であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む

40

50

第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

【0354】

一態様では、本開示は、がん処置のために患者を選択する方法に関し、前記方法は、(a)対象から生物学的試料を得ることと、(b)生物学的試料を、(i)CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；及び／又は(ii)RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子の発現について評価することと、(c)工程(b)の評価に基づいてがん療法を選択することと、を含む。

【0355】

一態様では、本開示は、がん処置のために患者を選択する方法に関し、前記方法は、(I)対象から生物学的試料を得ることと、(II)生物学的試料を、(i)CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／あるいは(ii)RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子の発現について評価することと、(III)工程(II)の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

【0356】

一態様では、本開示は、がんを処置する方法に関し、前記方法は、(I)対象から生物学的試料を得ることと、(II)生物学的試料を、(i)CD274、B2M、STAT1、STAT2、TRIM7、IRF1、TAP1、TAP2、CASP1、IRF、LTBR、PVR、GASTA3、LRG1、SPRY2、ARG1、TRIM8、TRIM2、MAPK8IP1、TRIM6及びKRT1から選択される遺伝子；並びに／あるいは(ii)RPL41、RPS15、RPS8、TRIM7及びLRG1から選択される遺伝子の発現について評価することと、(III)がん療法が、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はT

10

20

30

40

50

I G I Tであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、I I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はL I G H Tであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はS I R P αであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、I I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1 B B Lであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、(I V)任意に選択すること、並びに／又はネオアジュバント療法及び／若しくはアジュバント療法；(V)任意に、ネオアジュバント療法及び／又はアジュバント療法を実施することと、(V I) P D-1、P D-L 1及び／又はP D-L 2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置を投与することと、を含む。

10

【0357】

非限定的な実施形態では、C D 2 7 4、B 2 M、S T A T 1、S T A T 2、T R I M 7、I R F 1、T A P 1、T A P 2、C A S P 1、I R F、L T B R、P V R、G A S T A 3、L R G 1、S P R Y 2、A R G 1、T R I M 8、T R I M 2、M A P K 8 I P 1、T R I M 6及びK R T 1から選択される遺伝子の過剰発現の上方制御が観察されず、及び／又はR P L 4 1、R P S 1 5、R P S 8、T R I M 7及びL R G 1から選択される遺伝子の下方制御が観察されない場合、P D-1、P D-L 1及び／又はP D-L 2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置の投与が継続される。

20

【0358】

非限定的な実施形態では、C D 2 7 4、B 2 M、S T A T 1、S T A T 2、T R I M 7、I R F 1、T A P 1、T A P 2、C A S P 1、I R F、L T B R、P V R、G A S T A 3、L R G 1、S P R Y 2、A R G 1、T R I M 8、T R I M 2、M A P K 8 I P 1、T R I M 6及びK R T 1から選択される遺伝子の過剰発現の上方制御が観察され、及び／又はR P L 4 1、R P S 1 5、R P S 8、T R I M 7及びL R G 1から選択される遺伝子の下方制御が観察される場合、P D-1、P D-L 1及び／又はP D-L 2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置の投与が継続され、ここで、がん療法の投与の補充は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はT I G I Tであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、I I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はL I G H Tであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はS I R P αであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、I I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1 B B Lであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

30

40

【0359】

非限定的な実施形態では、C D 2 7 4、B 2 M、S T A T 1、S T A T 2、T R I M 7、I R F 1、T A P 1、T A P 2、C A S P 1、I R F、L T B R、P V R、G A S T A 3、L R G 1、S P R Y 2、A R G 1、T R I M 8、T R I M 2、M A P K 8 I P 1、T R I M 6及びK R T 1から選択される遺伝子の過剰発現の上方制御が観察され、及び／又

50

は R P L 4 1、R P S 1 5、R P S 8、T R I M 7 及び L R G 1 から選択される遺伝子の
下方制御が観察される場合 P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は
活性を阻害する能力を用いるがん処置の投与が継続されず、ここで、がん療法の投与は、
N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、
(A) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、
膜貫通タンパク質は T I G I T であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することがで
きる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タ
ンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は L I G H T
であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数
の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 4 9 ~ 9 5 から選択され、ある
いは (B) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであ
り、膜貫通タンパク質は S I R P α であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成すること
ができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫
通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は 4 - 1
B B L であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又
は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 4 9 ~ 9 5 から選択され
る。

10

【 0 3 6 0 】

実施形態では、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻
害する能力を用いるがん処置が、生物学的試料が少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含む場合に
選択され、C D 2 7 4、B 2 M、S T A T 1、S T A T 2、T R I M 7、I R F 1、T A
P 1、T A P 2、C A S P 1、I R F、L T B R、P V R、G A S T A 3、L R G 1、S
P R Y 2、A R G 1、T R I M 8、T R I M 2、M A P K 8 I P 1、T R I M 6、及び K
R T 1 から選択される遺伝子が、健康な組織、対象から得られた以前の生物学的試料、又
は抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較
して、少なくとも 1 つの腫瘍細胞において上方制御されておらず、並びに／あるいは R P
L 4 1、R P S 1 5、R P S 8、T R I M 7 及び L R G 1 から選択される遺伝子は、健康
な組織、対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗 P D - 1 療法に感受性であること
が知られている患者からの別の生物学的試料と比較して、少なくとも 1 つの腫瘍細胞にお
いて下方制御されていない。

20

30

【 0 3 6 1 】

実施形態では、生物学的試料が少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含む場合、C D 2 7 4、B
2 M、S T A T 1、S T A T 2、T R I M 7、I R F 1、T A P 1、T A P 2、C A S P
1、I R F、L T B R、P V R、G A S T A 3、L R G 1、S P R Y 2、A R G 1、T R
I M 8、T R I M 2、M A P K 8 I P 1、T R I M 6、及び K R T 1 から選択される遺伝
子が、健康な組織、対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗 P D - 1 療法に感受性
であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較して、少なくとも 1 つの腫
瘍細胞において上方制御され、並びに／あるいは R P L 4 1、R P S 1 5、R P S 8、T
R I M 7 及び L R G 1 から選択される遺伝子が、健康な組織、対象から得られた以前の生
物学的試料、又は抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物
学的試料と比較して、少なくとも 1 つの腫瘍細胞において下方制御されており、がん療法
は、N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式
中、A (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、
膜貫通タンパク質は T I G I T であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することがで
きる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タ
ンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は L I G H T
であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数
の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 4 9 ~ 9 5 から選択され、ある
いは (B) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであ
り、膜貫通タンパク質は S I R P α であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成すること

40

50

ができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1 BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

【0362】

実施形態では、健康な組織と比較して、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、健康な組織と比較して、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。

10

【0363】

実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較して、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較して、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。

20

【0364】

実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する応答の欠如、耐性又は不応性が生じることを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子が下方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置に対する応答の欠如、耐性又は不応性が生じることを示す。

30

【0365】

実施形態では、健康な組織と比較した、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、健康な組織と比較した、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

【0366】

実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した、(b)(ii)に列挙される1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。

40

【0367】

実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、(b)(i)に列挙される1又は複数の遺伝子の上方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する応答の欠如が生じる

50

ことを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、(b) (i i) に列挙される1又は複数の遺伝子の下方制御の欠如は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対する応答の欠如が生じることを示す。

【0368】

実施形態では、生物学的試料は、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である。実施形態では、生物学的試料は生検試料である。実施形態では、生検試料は、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（CT）支援生検、磁気共鳴画像法（MRI）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される。実施形態では、生物学的試料は、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む。実施形態では、生物学的試料は、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる。

【0369】

実施形態では、生物学的試料は、少なくとも1つの腫瘍細胞を含む。実施形態では、腫瘍は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度のびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髄芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝がん；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される。

【0370】

実施形態では、評価することは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELI

10

20

30

40

50

S A 及び蛍光活性化細胞選別 (FACS) 又はそれらの組み合わせによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、(b) (i) 及び／又は (b) (ii) に列挙される 1 又は複数の遺伝子によってコードされる 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤は、抗体、抗体様分子又はその断片を含む。実施形態では、評価することは、試料を、(b) (i) 及び／又は (b) (ii) に列挙される遺伝子に関連する 1 又は複数の遺伝子の核酸の 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、核酸の 1 又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤は、核酸プライマー又はプローブである。

【0371】

一態様では、本開示は、患者のがん処置を決定する方法に関し、前記方法は、(I) 対象から生物学的試料を得ることと、(II) Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1 及び Ras から選択される経路の活性化について生物学的試料を評価することと、(III) 工程 (II) の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、膜貫通タンパク質は TIGIT であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は LIGHT であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49 ~ 95 から選択され、あるいは (B) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、膜貫通タンパク質は SIRPα であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は 4-1BBL であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49 ~ 95 から選択される。

【0372】

一態様では、本開示は、がん処置のために患者を選択する方法に関し、前記方法は、(I) 対象から生物学的試料を得ることと、(II) Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1 及び Ras から選択される経路の活性化について生物学的試料を評価することと、(III) 工程 (II) の評価に基づいてがん療法を選択する工程であって、がん療法が、N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、膜貫通タンパク質は TIGIT であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は LIGHT であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49 ~ 95 から選択され、あるいは (B) (a) は、I 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、膜貫通タンパク質は SIRPα であり、(b) は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも 1 つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c) は、II 型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインであり、膜貫通タンパク質は 4-1BBL であり、リンカーは、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを連結し、任意に、1 又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号 49 ~ 95 から選択される。

【0373】

一態様では、本開示は、がんを処置する方法に関し、前記方法は、(I) 対象から生物学的試料を得ることと、(II) Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、

10

20

30

40

50

Arg1、Rap1及びRasから選択される経路の活性化について生物学的試料を評価することと、(II)がん療法が、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される、ことと、(IV)任意に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法を実施することと、を含む。

10

【0374】

実施形態では、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置は、生物学的試料が少なくとも1つの腫瘍細胞を含む場合に選択され、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路は、健康な組織、対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、少なくとも1つの腫瘍細胞において上方制御されない。

20

【0375】

実施形態では、生物学的試料が少なくとも1つの腫瘍細胞を含む場合、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路は、健康な組織、対象から得られた以前の生物学的試料、又は抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者からの別の生物学的試料と比較した場合、少なくとも1つの腫瘍細胞において上方制御され、がん療法は、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択される。

30

40

【0376】

実施形態では、健康な組織と比較して、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路が上方制御されることは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、抗PD-1療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較して、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Ra

50

p 1 及び R a s から選択される経路が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較して、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路が上方制御されることは、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることの発症を示す。

【0377】

実施形態では、健康な組織と比較した、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、抗 P D - 1 療法に感受性であることが知られている患者由来の別の生物学的試料と比較した、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答することを示す。実施形態では、対象から得られた以前の生物学的試料と比較した、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、E l k 1、L r g 1、A r g 1、R a p 1 及び R a s から選択される経路の上方制御の欠如は、P D - 1、P D - L 1 及び／又は P D - L 2 の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん処置に対する応答の欠如が生じることを示す。

【0378】

実施形態では、生物学的試料は、新鮮組織試料、凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、又はホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体である。実施形態では、生物学的試料は生検試料である。実施形態では、生検試料は、内視鏡生検、骨髄生検、内視鏡生検（例えば、膀胱鏡検査、気管支鏡検査及び結腸鏡検査）、針生検（例えば、細針吸引、コア針生検、真空支援生検、X線支援生検、コンピュータ断層撮影（C T）支援生検、磁気共鳴画像法（M R I）支援生検及び超音波支援生検）、皮膚生検（例えば、シェービング生検、パンチ生検、及び切開生検）及び外科生検から選択される。実施形態では、生物学的試料は、血液、血漿、血清、涙液、涙、骨髄、血液、血球、腹水、組織又は細針生検試料、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄液、腹腔液、胸水、糞便、リンパ、婦人科液、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、例えば管洗浄液又は気管支肺胞洗浄液のような洗浄液又は灌流液、吸引物、搔取物、骨髄検体、組織生検検体、外科検体、糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物から選択される体液、並びに／又はそれらからの細胞を含む。実施形態では、生物学的試料は、搔取り、スワブ、及び生検から選択される技術によって得られる。実施形態では、生物学的試料は、ブラシ、（綿）スワブ、スパチュラ、すすぎ液／洗浄液、パンチ生検装置、針による腔の穿刺又は外科用器具の使用によって得られる。

【0379】

実施形態では、生物学的試料は、少なくとも1つの腫瘍細胞を含む。実施形態では、腫瘍は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（N H L）を含む）；小リンパ球性（S L）N H L；中悪性度／濾胞性N H L；中悪性度のびまん性N H L；高悪性度免疫芽球性N H L；高悪性度リンパ芽球性N H L；高悪性度の小型非切断細胞N H L；巨大病変N H L；マントル細胞リンパ腫；A I D S 関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（C L L）；急性リンパ性白血病（A L L）；毛状細胞白血病；又は慢性骨髄芽球性白血病、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん；骨がん；脳及び中枢神経系がん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝がん；肝細胞がん；上皮内新生物；腎又は腎臓がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺

10

20

30

40

50

がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、及び肺扁平上皮がん）；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔がん（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮又は子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛状細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；並びに他のがん腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、及びMeigs症候群がんに関連する異常な血管増殖；腎がん；結腸直腸がん；及び副腎がんから選択される。

10

【0380】

実施形態では、評価することは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる。実施形態では、評価することは、試料を、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤は、抗体、抗体様分子又はその断片を含む。実施形態では、評価することは、試料を、Mapk8ip1、Trim7、Elk1、Lrg1、Arg1、Rap1及びRasから選択される経路に関連する1又は複数の遺伝子の核酸の1又は複数に特異的に結合する剤と接触させることによって行われる。実施形態では、核酸の1又は複数に特異的に結合する剤は、核酸プライマー又はプローブである。

20

【0381】

Trim7は、およそ80個の異なる三者モチーフタンパク質（三者モチーフ含有（TRIM））を含む大きなファミリーのメンバーである。タンパク質ファミリーは、ヒトにおいて80個のTRIMタンパク質メンバーを含む。実施形態では、Trimファミリー活性化は、IFN応答性遺伝子（すなわち、IRF1／IRF3／IRF7、JAK／STAT及びNFB）の制御による自然免疫応答の調節によってアッセイされ得る。実施形態では、Trimファミリーメンバーは、C末端SPRYドメイン（例えば、Trim6及びTrim7において）を有し、実施形態では、Trim7は、増殖の誘導、EMT、及び化学耐性表現型の獲得に基づいてアッセイされる。

30

【0382】

実施形態では、Trim7経路活性化は、E3ユビキチンリガーゼ活性を用いてアッセイされ得る。実施形態では、Trim7経路の活性化は、Ras-Raf-MEK-ERKシグナル伝達によるc-Jun/AP1活性化によってアッセイされ得る。実施形態では、Trim7経路活性化は、タンパク質ユビキチン化をアッセイすることによってアッセイされ得る。

40

【0383】

実施形態では、Trim7経路活性化は、AP1コアクチベーターRACO-1のユビキチン化及び安定化並びに／あるいはAP1媒介性遺伝子発現の増加を用いてアッセイされ得る。AP1媒介遺伝子発現シグネチャは当技術分野で周知である。

【0384】

実施形態では、Trim7経路活性化は、細胞増殖及び自然免疫応答に関与するタンパク質などの標的タンパク質のK63結合ユビキチン化に基づいてアッセイされ得る。実施形態では、Trim7経路活性化は、RACO-1として公知のAP-1共活性化因子の

50

Trim7リン酸化、K63結合ユビキチン化及び／又はタンパク質レベルに基づいてアッセイされ得る。実施形態では、Trim7経路活性化は、STING（インターフェロン遺伝子、MITA、ERIS、MPYS、TMEM173の刺激因子）のレベル又は活性に基づいてアッセイされ得る。実施形態では、Trim7経路活性化は、STINGのK48結合ユビキチン化を介してアッセイされ得る。実施形態では、Trim7経路活性化は、IFNb、IP-10及びRantesの上方制御をアッセイすることができる。実施形態では、Trim7経路活性化は、図6Cに示されるタンパク質の活性化に基づいてアッセイされ得る。

【0385】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ8相互作用タンパク質1（Mapk8ip1）は、c-Jun-アミノ末端キナーゼ相互作用タンパク質1としても知られている。実施形態では、Mapk8ip1経路活性化は、RAC1又はRAC2、MAP3K11／MLK3又はMAP3K7／TAK1、MAP2K7／MKK7、MAPK8／JNK1及び／又はMAPK9／JNK2を含む、JNK経路の異なる成分中の機能的なタンパク質複合体のアッセイに基づいてアッセイされ得る。実施形態では、Mapk8ip1経路活性化は、アポトーシスによるプログラム細胞死のレベル及び／又は感受性に基づいてアッセイされ得る。

【0386】

実施形態では、ETS様-1タンパク質（Elk1）経路活性化は、当技術分野で周知のRas-Raf-MEK-ERKシグナル伝達の活性化に基づいてアッセイされ得る。実施形態では、Elk1経路活性化は、Elk1リン酸化に基づいてアッセイされ得る。実施形態では、Elk1経路活性化は、当技術分野で周知のElk1標的遺伝子の活性化に基づいてアッセイされ得る（例えば、Odrowaz and Sharrocks, ELK1 Uses Different DNA Binding Modes to Regulate Functionally Distinct Classes of Target Genes, PLOS Genetics 8(5):e1002694(2012)を参照）。

【0387】

実施形態では、ロイシンリッチα2-糖タンパク質1（Lrg1）経路活性化は、TGFβ及び／又はSMAD1／5／8シグナル伝達の誘導に基づいてアッセイされ得る。

【0388】

実施形態では、Ras経路活性化は、図8Cに示されるタンパク質の活性化に基づいてアッセイされ得る。

【0389】

実施形態では、Rap1経路の活性化は、図8Dに示されるタンパク質の活性化に基づいてアッセイされ得る。

【0390】

実施形態では、アルギナーゼ1（Arg1）経路活性化は、アルギニンからオルニチン及び尿素へのアッセイ加水分解に基づいてアッセイされ得る。実施形態では、アルギナーゼ1（Arg1）経路活性化は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の抑制に基づいてアッセイされ得る。実施形態では、アルギナーゼ1（Arg1）経路活性化は、ポリアミンのレベル又は合成（L-オルニチンを介する）に基づいてアッセイされ得る。

【0391】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法であって、がん療法を実施することを含み、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメイン

10

20

30

40

50

とを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、対象は、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置を受けたか、又は受けており、対象は、PD-1、PD-L1、及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法に対して応答が欠如すること、耐性であること又は不応性であることを発症している。

10

【0392】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法に関し、前記方法は、(a)PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置を投与することと、(b)対象における腫瘍サイズ減少をモニターすることによって、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置による抗腫瘍応答を評価することと、(c)腫瘍サイズ減少の欠如が観察される場合、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質を投与することであって、式中(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択されるか；又は(B)(a)はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択される、ことと、(d)対象における腫瘍減少をモニターすることによって、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置による抗腫瘍応答を再評価することと、(e)腫瘍サイズの縮小が観察されない場合、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造のキメラタンパク質の投与を中止することであって、(A)(a)はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択されるか、又は(B)(a)はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

20

30

40

【0393】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法に関し、前

50

記方法は、(a) PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置を投与することと、(b) PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置による抗腫瘍応答を、(i) 対象から生物学的試料を得る工程；(ii) TRIM7の過剰発現及び／又は活性化について生物学的試料を評価する工程を使用して評価することと、(c) N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質を投与することであって、式中(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択されるか；又は(B)(a)はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択される、ことと、(d) PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置による抗腫瘍応答を、(i) 対象から生物学的試料を得る工程；(ii) TRIM7の過剰発現及び／又は活性化について生物学的試料を評価する工程を使用して再評価することと、(e) TRIM7の過剰発現及び／又は活性化が観察されない場合、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質の投与を中止することであって、(A)(a)はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択されるか、又は(B)(a)はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRPαであり、(b)はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

10

20

30

40

50

【0394】

一態様では、本開示は、それを必要とする対象においてがんを処置する方法に関し、前記方法は、(a) PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いる抗がん処置を投与することと、(b) TRIM7の過剰発現及び／又は活性化を、(i) 対象から生物学的試料を得る工程；及び(ii) TRIM7の過剰発現及び／又は活性化について生物学的試料を評価する工程を使用して評価することと、(c) TRIM7の過剰発現及び／又は活性化が観察される場合、N末端－(a)－(b)－(c)－C末端の一般構造のキメラタンパク質を投与することであって、式中(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択されるか；又は(B

）（a）はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRP α であり、（b）はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択される、ことと、（d）TRIM7の過剰発現及び／又は活性化を、（i）対象から生物学的試料を得る工程；（ii）TRIM7の過剰発現及び／又は活性化について生物学的試料を評価する工程を使用して再評価することと、（e）TRIM7の過剰発現及び／又は活性化が観察されない場合、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端の一般構造のキメラタンパク質の投与を中止することであって、（A）（a）はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、（b）はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGITであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択されるか、又は（B）（a）はI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRP α であり、（b）はジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、（c）はII型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは配列番号49～95から選択される、ことと、を含む。

10

20

【0395】

実施形態では、TRIM7の過剰発現及び／又は活性化は、生物学的試料をTrim7モジュレーターで処理することによって観察される。実施形態では、Trim7モジュレーターはTrim7阻害剤である。実施形態では、Trim7モジュレーターは、低分子干渉RNA（siRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスRNA、ガイドRNA（gRNA）、小分子、抗体、ペプチド及びペプチド模倣体から選択される。実施形態では、低分子干渉RNA（siRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスRNA、又はガイドRNA（gRNA）は、Trim7タンパク質の産生を阻害する。実施形態では、ペプチド模倣体は、Trim7の標的を模倣し、それによりTrim7の活性を阻害する。実施形態では、Trim7阻害剤は、MAAVGPRTGPGTGAEALALAAEL（配列番号104）、AATRAPPFPLPCP（配列番号105）、HGSQAARAAARCG（配列番号106）及びNVSLKTFVLKGMKKFKEDLRGELEKEEKV（配列番号107）から選択される1又は複数のTrim7タンパク質セグメントによって括弧で囲まれた領域を標的とする小分子又はペプチド阻害剤である。実施形態では、Trim7調節因子は、マイトジェン活性化及びストレス活性化キナーゼ1（MSK1）阻害剤であり、ここで、MSK1阻害剤は、MSK1の阻害の下流効果を介してTrim7を調節する。実施形態では、MSK1阻害剤は、Ro31-8220、SB-747651A及びH89から選択される。実施形態では、MSK1阻害剤は、SB-747651Aである。

30

40

【0396】

実施形態では、評価することは、DNA配列決定、RNA配列決定、免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング、in cell western、免疫蛍光染色、ELISA及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又はそれらの組み合わせによって行われる。実施形態では、評価することは、Trim7経路によってコードされる1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤と試料を接触させることによって行われる。実施形態では、1又は複数のタンパク質に特異的に結合する剤は、抗体、抗体様分子又はその断片を含む。

50

実施形態では、評価することは、Trim7経路に関連する1又は複数の遺伝子の核酸の1又は複数に特異的に結合する剤と試料を接触させることによって行われる。実施形態では、核酸の1又は複数に特異的に結合する剤は、核酸プライマー又はプローブである。

【0397】

実施形態では、評価することは、E3ユビキチンリガーゼ活性をアッセイすることによって行われる。実施形態では、評価することは、インターフェロン遺伝子刺激因子(STING)及び／又はAP-1共活性化因子RACO-1のタンパク質ユビキチン化及び／又はK48結合ユビキチン化をアッセイすることによって行われる。実施形態では、評価することは、Ras-Raf-MEK-ERKシグナル伝達によるc-Jun/AP1活性化及び／又はAP1媒介性遺伝子発現の増加をアッセイすることによって行われる。実施形態では、評価することは、AP1共活性化因子RACO-1のユビキチン化及び安定化をアッセイすることによって行われる。実施形態では、評価は、細胞増殖及び自然免疫応答に関与するタンパク質などの標的タンパク質のK63結合ユビキチン化をアッセイすることによって行われる。実施形態では、評価することは、AP-1コアクチベーターRACO-1のTrim7リン酸化、K63結合ユビキチン化及び／又はタンパク質レベルをアッセイすることによって行われる。実施形態では、評価することは、IFN β 、IP-10及び／又はRantesの上方制御をアッセイすることによって行われる。

【0398】

一態様では、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてがんを処置するための方法に関し、有効量の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、医薬組成物が、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端を含むキメラタンパク質を含み、式中、(A)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はTIGITであり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質はLIGHTであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、あるいは(B)(a)は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、膜貫通タンパク質はSIRP α であり、(b)は、ジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのシステイン残基を含むリンカーであり、(c)は、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、膜貫通タンパク質は4-1BBLであり、リンカーは、第1のドメインと第2のドメインとを連結し、任意に、1又は複数の連結リンカーを含み、かかる連結リンカーは、配列番号49～95から選択され、ここで、がんは、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を有する抗チェックポイント剤に耐性であるか、耐性であると考えられる。

【0399】

実施形態では、抗チェックポイント剤は、ニボルマブ(OPDIVO)、ペンブロリズマブ(KEYTRUDA)、ピジリズマブ(CT-011、CURETECH)、MK-3475(MERCK)、BMS936559、MPDL3280A(ROCHE)、センプリマブ(LIBTAYO)、アテゾリズマブ(TECENTRIQ)、アベルマブ(BAVENCIO)、及びデュルバルマブ(imfinzi)から選択される抗体である。

【0400】

実施形態では、方法は、抗チェックポイント剤の投与を更に含む。実施形態では、抗チェックポイント剤は、ニボルマブ(OPDIVO)、ペンブロリズマブ(KEYTRUDA)、ピジリズマブ(CT-011、CURETECH)、MK-3475(MERCK)、BMS936559、MPDL3280A(ROCHE)、センプリマブ(LIBTAYO)、アテゾリズマブ(TECENTRIQ)、アベルマブ(BAVENCIO)、及びデュルバルマブ(imfinzi)から選択される抗体である。実施形態では、キ

メラタンパク質を含む医薬組成物及び抗チェックポイント剤は、同時に又は同時期に投与される。実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、抗チェックポイント剤が投与された後に投与される。実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物は、抗チェックポイント剤が投与される前に投与される。

【0401】

実施形態では、キメラタンパク質を含む医薬組成物の用量は、抗チェックポイント剤による処置を受けたことがない又は受けていない対象に投与されるキメラタンパク質を含む医薬組成物の用量よりも少ない。実施形態では、投与される抗チェックポイント剤の用量は、キメラタンパク質を含む医薬組成物による処置を受けたことがない又は受けていない対象に投与される抗チェックポイント剤の用量よりも少ない。実施形態では、対象は、キメラタンパク質を含む医薬組成物による処置を受けただけの対象又は受けているだけの対象と比較した場合、胃腸炎症及び体重減少を伴わずに生存する可能性が高く、及び／又は腫瘍サイズ若しくはがん有病率が低減している。実施形態では、対象は、抗チェックポイント剤による処置のみを受けた又は受けている対象と比較した場合、胃腸炎症及び体重減少を伴わずに生存する可能性が高く、及び／又は腫瘍サイズ若しくはがん有病率が低減している。

10

【0402】

製剤

本明細書に記載のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、無機若しくは有機酸と反応することができる十分に塩基性の官能基、又は無機若しくは有機塩基と反応して薬学的に許容される塩を形成することができるカルボキシル基を有し得る。薬学的に許容される酸付加塩は、当技術分野で周知のように、薬学的に許容される酸から形成される。そのような塩は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、*Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) and *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002 に列挙されている薬学的に許容される塩を含む。

20

【0403】

実施形態では、本明細書に記載の組成物は、薬学的に許容される塩の形態である。

30

【0404】

更に、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、薬学的に許容される担体又はビヒクルを含む組成物の成分として対象に投与され得る。そのような組成物は、任意に、適切な投与のための形態を提供するように、適切な量の薬学的に許容される賦形剤を含み得る。医薬賦形剤は、液体、例えば水及び油、例えば石油、動物、植物又は合成起源のもの、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などであり得る。医薬賦形剤は、例えば、生理食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであり得る。更に、補助剤、安定剤、増粘剤、潤滑剤及び着色剤が使用され得る。一実施形態では、薬学的に許容され得る賦形剤は、対象に投与されるとき、無菌である。水は、本明細書に記載の任意の剤が静脈内投与される場合、有用な賦形剤である。生理食塩水並びにデキストロース水溶液及びグリセロール水溶液もまた、液体賦形剤として、特に注射可能な溶液のために使用され得る。適切な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなども含む。本明細書に記載の任意の剤は、所望であれば、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤も含み得る。

40

【0405】

実施形態では、本明細書に記載の組成物は生理食塩水緩衝液（TBS、PBSなどを含むが、これらに限定されない）に再懸濁される。

50

【0406】

実施形態では、キメラタンパク質は、半減期を延長するために、又はそうでなければ薬力学的及び薬物動態学的特性を改善するために、別の剤とコンジュゲート及び／又は融合され得る。実施形態では、キメラタンパク質は、PEG、XTEN（例えば、rPEGとして）、ポリシアル酸（POLYXEN）、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン又はHAS）、エラスチン様タンパク質（ELP）、PAS、HAP、GLK、CTP、トランスフェリンなどのうちの1又は複数と融合又はコンジュゲートされ得る。実施形態では、個々のキメラタンパク質のそれぞれは、BioDrugs（2015）29：215－239に記載されている剤のうちの1又は複数に融合され、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0407】

投与、投薬及び処置レジメン

本開示は、様々な製剤中の記載されたキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）を含む。本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、溶液、懸濁液、エマルジョン、液滴、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル、液体を含有するカプセル、粉末、徐放性製剤、坐剤、エマルジョン、エアロゾル、スプレー、懸濁液、又は使用に適した任意の他の形態をとることができる。タンパク質配列をコードするDNA構築物又はRNA構築物も使用され得る。一実施形態では、組成物はカプセルの形態である（例えば、米国特許第5,698,155号明細書を参照されたい）。適切な医薬賦形剤の他の例は、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences 1447－1676（Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995）に記載されている。

20

【0408】

必要に応じて、キメラタンパク質（及び／又は追加の剤）を含む製剤は、可溶化剤も含むことができる。また、剤は、当技術分野で公知の適切なビヒクル又は送達装置を用いて送達され得る。本明細書に概説される併用療法は、単一の送達ビヒクル又は送達装置で共送達され得る。投与のための組成物は、任意に、注射部位の痛みを軽減するために、例えば、リグノカインなどの局所麻酔薬を含み得る。

【0409】

本開示のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）を含む製剤は、単位剤形で好都合に提供され得、薬学の分野で周知の方法のいずれかによって調製され得る。そのような方法は、一般に、治療薬を、1又は複数の補助成分を構成する担体と会合させる工程を含む。典型的には、製剤は、治療薬を液体担体、微粉化固体担体又はその両方と均一かつ密接に会合させ、次いで、必要に応じて、生成物を所望の製剤の剤形に成形することによって調製される（例えば、湿式又は乾式造粒、粉末ブレンドなどの後、当技術分野で公知の従来する方法を使用して打錠する）。

30

【0410】

一実施形態では、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、本明細書に記載の投与様式に適合した組成物として日常的な手順に従って製剤化される。

40

【0411】

投与経路は、例えば：皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、経口、舌下、鼻腔内、脳内、膈内、経皮、直腸内、吸入による、又は局所的に、特に耳、鼻、目、又は皮膚への投与を含む。いくつかの実施形態では、投与は、経口又は非経口注射によって行われる。ほとんどの場合、投与は、本明細書に記載の任意の剤の血流中への放出をもたらす。

【0412】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、経口投与され得る。そのようなキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）はまた、任意の他の好都合な経路によって、例えば、静脈内注入又はボーラス注射によって、上皮又は皮膚粘膜ライニン

50

グ（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与され得、別の生物学的に活性な剤と一緒に投与され得る。投与は全身的又は局所的であり得る。様々な送達系が知られており、例えば、リボソーム、微粒子、マイクロカプセル、カプセルなどへの封入が知られており、投与に使用され得る。

【0413】

特定の実施形態では、処置を必要とする領域に局所投与することが望ましい場合がある。一実施形態では、例えばがんの処置において、キメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、腫瘍微小環境（例えば、腫瘍血管系を含む、腫瘍細胞を取り囲み及び／又は供給する細胞、分子、細胞外マトリックス及び／又は血管；腫瘍浸潤リンパ球；線維芽細胞網状細胞；内皮前駆細胞（EPC）；がん関連線維芽細胞；周皮細胞；他の間質細胞；細胞外マトリックス（ECM）の成分；樹状細胞；抗原提示細胞；T細胞；制御性T細胞；マクロファージ；好中球；及び腫瘍の近位に位置する他の免疫細胞）又はリンパ節に投与され、並びに／あるいは腫瘍微小環境又はリンパ節を標的とする。実施形態では、例えばがんの処置において、キメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は腫瘍内投与される。

【0414】

様々な実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、従来の免疫療法（例えば、OPDIVO、KEYTRUDA、YERVOY、及びTECENTRIQのうちの1又は複数による処置）で見られるよりも少ない副作用を提供する二重の効果を可能にする。例えば、本発明のキメラタンパク質は、下垂体炎、大腸炎、肝炎、肺臓炎、発疹及びリウマチ性疾患など、皮膚、胃腸管、腎臓、末梢神経系及び中枢神経系、肝臓、リンパ節、眼、脾臓、及び内分泌系を含む様々な組織及び器官に影響を及ぼす一般的に観察される免疫関連有害事象を低減又は防止する。更に、本局所投与、例えば腫瘍内投与は、従来の免疫療法（例えば、OPDIVO、KEYTRUDA、YERVOY、及びTECENTRIQのうちの1又は複数による処置）で使用されるように、標準的な全身投与、例えばIV注入で見られる有害事象を回避する。

【0415】

非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下及び関節内の注射及び注入）に適した剤形は、例えば、溶液、懸濁液、分散液、エマルジョンなどを含む。それらはまた、滅菌固体組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造されてもよく、使用直前に滅菌注射用媒体に溶解又は懸濁され得る。それらは、例えば、当技術分野で公知の懸濁化剤又は分散剤を含有し得る。

【0416】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）の投与量並びに投与スケジュールは、処置される疾患、対象の全般的な健康状態、及び投与する医師の裁量を含むがこれらに限定されない様々なパラメータに依存し得る。本明細書に記載される任意のキメラタンパク質は、追加の剤の投与の前に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前）、追加の剤の投与と同時に、又は追加の剤の投与に続いて（例えば、5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、8週間後、又は12週間後）、それを必要とする対象に投与され得る。実施形態では、本明細書に記載される任意のキメラタンパク質及び追加の剤は、1分間隔、10分間隔、30分間隔、1時間未満間隔、1時間間隔、1時間～2時間間隔、2時間～3時間間隔、3時間～4時間間隔、4時間～5時間間隔、5時間～6時間間隔、6時間～7時間間隔、7時間～8時間間隔、8時間～9時間間隔、9時間～10時間間隔、10時間～11時間間隔、11時間～12時間間隔、1日間隔、2日間隔、3日間隔、4日間隔、5日間隔、6日間隔、1週間間隔、2週間間隔、3週間間隔、又は4週間間隔で投与される。

【0417】

実施形態では、本開示は、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質と、適応免疫応答を誘導する別のキメラ二量体タンパク質との同時投与に関する。そのような実施形態では、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質は、適応免疫応答を誘導するキメラタンパク質の投与前、投与と同時、又は投与後に投与され得る。例えば、キメラタンパク質は、1分間隔、10分間隔、30分間隔、1時間未満間隔、1時間間隔、1時間～2時間間隔、2時間～3時間間隔、3時間～4時間間隔、4時間～5時間間隔、5時間～6時間間隔、6時間～7時間間隔、7時間～8時間間隔、8時間～9時間間隔、9時間～10時間間隔、10時間～11時間間隔、11時間～12時間間隔、1日間隔、2日間隔、3日間隔、4日間隔、5日間隔、6日間隔、1週間間隔、2週間間隔、3週間間隔、又は4週間間隔で投与され得る。例示的な実施形態では、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質及び適応応答を誘導するキメラタンパク質は、1週間間隔で投与されるか、又は隔週で投与される（すなわち、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質の投与は、1週間後に、適応免疫応答を誘導するキメラタンパク質の投与などが続く）。

10

20

30

40

50

【0418】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）の投与量は、症状の重症度、症状が治療又は予防されるかどうか、並びに処置される対象の年齢、体重及び健康状態を含むいくつかの因子に依存し得る。更に、特定の対象に関する薬理ゲノミクス（治療薬の薬物動態、薬力学又は有効性プロファイルに対する遺伝子型の効果）情報は、使用される投与量に影響を及ぼし得る。更に、正確な個々の投与量は、投与される剤の特定の組み合わせ、投与時間、投与経路、製剤の性質、排泄速度、処置される特定の疾患、障害の重症度、及び障害の解剖学的位置を含む様々な要因に応じていくらか調整され得る。投与量のいくつかの変動が予想され得る。

【0419】

非経口注射による本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）の投与の場合、投与量は、約0.1mg～約250mg／日、約1mg～約20mg／日、又は約3mg～約5mg／日であり得る。一般に、経口投与又は非経口投与される場合、本明細書に記載される任意の剤の投与量は、約0.1mg～約1500mg／日、又は約0.5mg～約10mg／日、又は約0.5mg～約5mg／日、又は約200～約1,200mg／日（例えば、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1,000mg、約1,100mg、約1,200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、約2,000mg、約2,100mg、約2,200mg、約2300mg、約2400mg、約2500mg、約2600mg、約2700mg、約2800mg、約2900mg、約3,000mg、約3,100mg、約3,200mg、約3300mg、約3400mg、約3500mg、約3600mg、約3700mg、約3800mg、約3900mg、約4,000mg、約4,100mg、約4,200mg、約4300mg、約4400mg、約4500mg、約4600mg、約4700mg、約4800mg、約4900mg、約5,000mg／日又は／週）であり得る。

【0420】

実施形態では、本明細書に記載のキメラタンパク質（及び／又は更なる剤）の投与は、約0.1mg～約1500mg／処置、又は約0.5mg～約10mg／処置、又は約0.5mg～約5mg／処置、又は約200～約1,200mg／処置（例えば、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1,000mg、約1,100mg、約1,200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、約2,000mg、約2,100mg、約2,200mg、約2300mg、約2400mg、約2500mg、約2600mg、約2700mg、約2800mg、約2900mg、約3,000mg、約3,100mg、約3,200mg、約3300mg、約3400mg、約3500mg、約3600mg、約37

00mg、約3800mg、約3900mg、約4,000mg、約4,100mg、約4,200mg、約4300mg、約4400mg、約4500mg、約4600mg、約4700mg、約4800mg、約4900mg、約5000mg／処置)の用量での非経口注射又は注入によるものである。

【0421】

実施形態では、キメラタンパク質（及び／又は更なる剤）の適切な投与量は、対象の、約0.01mg/kg～約100mg/kg体重、又は約0.01mg/kg～約10mg/kg体重、例えば、又は約0.01mg/kg、又は約0.02mg/kg、又は約0.03mg/kg、又は約0.04mg/kg、又は約0.05mg/kg、又は約0.06mg/kg、又は約0.07mg/kg、又は約0.08mg/kg、又は約0.09mg/kg、又は約0.1mg/kg、又は約0.2mg/kg、又は約0.3mg/kg、又は約0.4mg/kg、又は約0.5mg/kg、又は約0.6mg/kg、又は約0.7mg/kg、又は約0.8mg/kg、又は約0.9mg/kg、又は約1mg/kg、又は約1.1mg/kg、又は約1.2mg/kg、又は約1.3mg/kg、又は約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kg、又は約1.6mg/kg、又は約1.7mg/kg、又は約1.8mg/kg、1.9mg/kg、又は約2mg/kg、又は約3mg/kg、又は約4mg/kg、又は約5mg/kg、又は約6mg/kg、又は約7mg/kg、又は約8mg/kg、又は約9mg/kg、又は約10mg/kg、又は約11mg/kg、又は約12mg/kg、又は約13mg/kg、又は約14mg/kg、又は約15mg/kg、又は約16mg/kg、又は約17mg/kg、又は約18mg/kg、又は約19mg/kg、又は約20mg/kg、又は約21mg/kg、又は約22mg/kg、又は約23mg/kg、又は約24mg/kg、又は約25mg/kg、又は約26mg/kg、又は約27mg/kg、又は約28mg/kg、又は約29mg/kg、又は約30mg/kg、又は約31mg/kg、又は約32mg/kg、又は約33mg/kg、又は約34mg/kg、又は約35mg/kg、又は約36mg/kg、又は約37mg/kg、又は約38mg/kg、又は約39mg/kg、又は約40mg/kg、又は約41mg/kg、又は約42mg/kg、又は約43mg/kg、又は約44mg/kg、又は約45mg/kg、又は約46mg/kg、又は約47mg/kg、又は約48mg/kg、又は約49mg/kg、又は約50mg/kg、又は約75mg/kg（これらの間の全ての値及び範囲を含む）の範囲内である。

10

20

30

【0422】

別の実施形態では、送達は小胞、特にリポソーム中であり得る（Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)を参照されたい）。

【0423】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の剤）は、制御放出手段若しくは徐放手段によって、又は当業者に周知の送達装置によって投与され得る。例としては、米国特許第3,845,770号、第3,916,899号、第3,536,809号、第3,598,123号、第4,008,719号、第5,674,533号、第5,059,595号、第5,591,767号、第5,120,548号、第5,073,543号、第5,639,476、第5,354,556号及び5,733,556を含み、これらに限定されないが、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような剤形は、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧系、多層コーティング、微粒子、リポソーム、ミクロスフェア、又はそれらの組み合わせを使用して1又は複数の活性成分の制御放出又は持続放出を提供して、所望の放出プロファイルを様々な割合で提供するのに有用であり得る。活性成分の制御放出又は持続放出は、pHの変化、温度の変化、適切な波長の光によ

40

50

る刺激、酵素の濃度若しくは利用可能性、水の濃度若しくは利用可能性、又は他の生理学的条件若しくは化合物を含むがこれらに限定されない様々な条件によって刺激され得る。

【0424】

別の実施形態では、ポリマー材料が使用され得る (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105を参照されたい)。

10

【0425】

別の実施形態では、制御放出システムは、処置される標的領域の近くに配置され得、したがって、全身用量の一部のみを必要とする (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。Langer, 1990, Science 249:1527-1533による総説で論じられている他の制御放出系を使用してもよい。

20

【0426】

本明細書中に記載される任意のキメラタンパク質 (及び／又は更なる剤) の投与は、独立して、1日に1～4回、又は1ヶ月に1～4回、又は1年に1～6回、又は2年、3年、4年又は5年に1回であり得る。投与は、1日又は1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年の期間であってもよく、対象の生涯であってもよい。

【0427】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質 (及び／又は追加の剤) を利用する投与レジメンは、対象の種類、種、年齢、体重、性別及び医学的状態；処置される状態の重症度；投与経路；対象の腎機能又は肝機能；個体の薬理ゲノム構成；及び使用される本発明の特定の化合物を含む様々な因子に従って選択され得る。本明細書に記載される任意のキメラタンパク質 (及び／又は追加の剤) は、1日1回の用量で投与され得、又は1日の総投与量は、1日2回、3回又は4回の分割用量で投与され得る。更に、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質 (及び／又は追加の剤) は、投与レジメン全体にわたって断続的ではなく連続的に投与され得る。

30

【0428】

処置、リンパ球のマージネーションの誘導、有効性の評価及び患者の選択の方法

一態様では、本開示は、がんの処置を必要とする対象においてがんを処置するための方法に関し、前記方法は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a)は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体 (TIGIT) の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカーであり、(c)は、ヒトLIGHT (リンホトキシン様のものであり、誘導性発現を示し、ヘルペスウイルス侵入メディエーター (HVEM) (CD258又はTNFSF14としても知られるTリンパ球によって発現される受容体) についてHSV糖タンパク質Dと競合する) の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、投与レジメンは、約3日ごと～約10日ごと、約1週間ごと～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、約2週間ごと～約4週間ごと、約3週間ごと～約5週間ごと、約4週間ごと～約6週間ごと、約5週間ごと～約7週間ごと、約6週間ごと～約8週間ごと、約6週間ごと～約2ヶ月ごとから選択される。い

40

50

くつかの実施形態では、投与レジメンは、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、又は約2週間ごと～約4週間ごとである。

【0429】

いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫調節を増強、回復、促進及び／又は刺激することができるか、又はそれを含む方法で見出す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の本キメラタンパク質は、限定するものではないが、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK T）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M1マクロファージ）、B細胞、及び樹状細胞を含む腫瘍細胞に対する1又は複数の免疫細胞の活性又は活性化を回復、促進及び／又は刺激する。いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、T細胞の活性及び／又は活性化を増強、回復、促進及び／又は刺激し、これは、非限定的な例として、生存促進シグナル、自己分泌又は傍分泌増殖シグナル；p38 MAPK媒介シグナル、ERK媒介シグナル、STAT媒介シグナル、JAK媒介シグナル、AKT媒介シグナル又はPI3K媒介シグナル；抗アポトーシスシグナル；及び／又は炎症誘発性サイトカイン産生若しくはT細胞遊走若しくはT細胞腫瘍浸潤の1又は複数を促進する及び／又はそれらに必要なシグナルを含む1又は複数のT細胞固有シグナルを活性化及び／又は刺激することを含む。

10

【0430】

いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、T細胞（限定されないが、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラーT（NK T）細胞を含む）、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK T）細胞、樹状細胞、単球及びマクロファージ（例えば、M1及びM2のうちの1又は複数）のうちの1又は複数の腫瘍又は腫瘍微小環境への増加を引き起こすことができるか、又はそれを含む方法で見出す。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、CD8+T細胞、特に腫瘍微小環境に浸潤したT細胞による腫瘍抗原の認識を増強する。いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、CD19発現を誘導し、及び／又はCD19陽性細胞の数を増加させる（例えば、CD19陽性B細胞）。いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、IL-15R α 発現を誘導し、及び／又はIL-15R α 陽性細胞（例えば、IL-15R α 陽性樹状細胞）の数を増加させる。

20

【0431】

いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、免疫抑制細胞（例えば、骨髄由来サブレッサー細胞（MDSC）、制御性T細胞（Treg）、腫瘍関連好中球（TAN）、M2マクロファージ及び腫瘍関連マクロファージ（TAM））の減少を、特に腫瘍及び／又は腫瘍微小環境（TME）内で、伴うことができ、阻害することができ、及び／又は引き起こすことができるか、あるいはそれらにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、本療法は、腫瘍部位及び／又はTMEにおけるM1マクロファージ対M2マクロファージの比を変化させて、M1マクロファージを優先し得る。

30

【0432】

いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、IL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1 β （CCL4）TARC（CCL17）、IFN γ 、IL-8、IL-12及びSDF1 α （CXCL12）のうちの1又は複数を含むがこれらに限定されない様々なサイトカインの血清レベルを上昇させることができる。いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、処置された対象の血清中のIL-2、IL-10、IP-10（CXCL10）、MCP-1、MIP-1 β （CCL4）TARC（CCL17）、IFN γ 、IL-8、IL-12及びSDF1 α （CXCL12）を増強することができる。

40

【0433】

一態様では、本開示は、がんの処置を必要とする対象のがんを処置する方法に関し、前記方法は、N末端-（a）-（b）-（c）-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、（a）は、Igドメイン及びITIMド

50

メインを有するヒトT細胞免疫受容体（TIGIT）の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、（b）は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジャーCH2-CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、（c）は、ヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、CD258又はTNFSF14としても知られる、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。いくつかの実施形態では、対象は、約3日ごと～約10日ごと、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、約2週間ごと～約4週間ごと、約3週間ごと～約5週間ごと、約4週間ごと～約6週間ごと、約5週間ごと～約7週間ごと、約6週間ごと～約8週間ごと、及び約6週間ごと～約2ヶ月ごとから選択される投薬レジメンで投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、又は約2週間ごと～約4週間ごとである。いくつかの実施形態では、初期用量は、約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約12mg/kg、約15mg/kg、約18mg/kg、約21mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約27mg/kg、約30mg/kg、約33mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約40mg/kg、約42mg/kg、約45mg/kg、約48mg/kg及び約50mg/kgから選択される。いくつかの実施形態では、用量は、約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約12mg/kg、約15mg/kg、約18mg/kg、約21mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約27mg/kg、約30mg/kg、約33mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約40mg/kg、約42mg/kg、約45mg/kg、約48mg/kg及び約50mg/kgから選択される。実施形態では、用量は、1週間に1回又は2週間に1回のスケジュールで投与される。実施形態では、方法は、プライミング用量を対象に投与することを更に含む。

10

20

30

40

50

【0434】

一態様では、本開示は、リンパ球の増殖の誘導を必要とする対象においてリンパ球の増殖を誘導するための方法に関し、前記方法は、N末端-（a）-（b）-（c）-C末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、（a）は、Igドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体（TIGIT）の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、（b）は、第1のドメイン及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジャーCH2-CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、（c）は、ヒトLIGHT（リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、CD258又はTNFSF14としても知られる、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）についてHSV糖タンパク質Dと競合する）の細胞外ドメインを含む第2のドメインである。いくつかの実施形態では、対象は、約3日ごと～約10日ごと、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、約2週間ごと～約4週間ごと、約3週間ごと～約5週間ごと、約4週間ごと～約6週間ごと、約5週間ごと～約7週間ごと、約6週間ごと～約8週間ごと、及び約6週間ごと～約2ヶ月ごとから選択される投薬レジメンで投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、約毎週～約2週間ごと、約10日ごと～約3週間ごと、又は約2週間ごと～約4週間ごとである。いくつかの実施形態では、初期用量は、約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約12mg/kg、約15mg/kg、約18mg/kg、約21mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約27mg/kg、約30mg/kg、約33mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、

約 40 mg/kg、約 42 mg/kg、約 45 mg/kg、約 48 mg/kg 及び約 50 mg/kg から選択される。いくつかの実施形態では、用量は、約 0.03 mg/kg、約 0.1 mg/kg、約 0.3 mg/kg、約 1 mg/kg、約 2 mg/kg、約 3 mg/kg、約 4 mg/kg、約 5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 7 mg/kg、約 8 mg/kg、約 9 mg/kg、約 10 mg/kg、約 12 mg/kg、約 15 mg/kg、約 18 mg/kg、約 21 mg/kg、約 24 mg/kg、約 25 mg/kg、約 27 mg/kg、約 30 mg/kg、約 33 mg/kg、約 35 mg/kg、約 36 mg/kg、約 40 mg/kg、約 42 mg/kg、約 45 mg/kg、約 48 mg/kg 及び約 50 mg/kg から選択される。実施形態では、用量は、1 週間に 1 回又は 2 週間に 1 回のスケジュールで投与される。実施形態では、方法は、プライミング用量を対象に投与することを更に含む。

10

【0435】

一態様では、本開示は、リンパ球の増殖の誘導を必要とする対象においてリンパ球マージネーションを誘導するための方法に関し、前記方法は、N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端の一般構造を有する有効量のキメラタンパク質を対象に投与する工程を含み、式中、(a) は、Ig ドメイン及び ITIM ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体 (TIGIT) の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、(b) は、第 1 のドメイン及び第 2 のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH2-CH3 Fc ドメインを含むリンカーであり、(c) は、ヒト LIGHT (リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、CD258 又は TNFSF14 としても知られる、T リンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター (HVEM) について HSV 糖タンパク質 D と競合する) の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインである。いくつかの実施形態では、対象は、約 3 日ごと～約 10 日ごと、約毎週～約 2 週間ごと、約 10 日ごと～約 3 週間ごと、約 2 週間ごと～約 4 週間ごと、約 3 週間ごと～約 5 週間ごと、約 4 週間ごと～約 6 週間ごと、約 5 週間ごと～約 7 週間ごと、約 6 週間ごと～約 8 週間ごと、及び約 6 週間ごと～約 2 ヶ月ごとから選択される投薬レジメンで投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、約毎週～約 2 週間ごと、約 10 日ごと～約 3 週間ごと、又は約 2 週間ごと～約 4 週間ごとである。いくつかの実施形態では、初期用量は、約 0.03 mg/kg、約 0.1 mg/kg、約 0.3 mg/kg、約 1 mg/kg、約 2 mg/kg、約 3 mg/kg、約 4 mg/kg、約 5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 7 mg/kg、約 8 mg/kg、約 9 mg/kg、約 10 mg/kg、約 12 mg/kg、約 15 mg/kg、約 18 mg/kg、約 21 mg/kg、約 24 mg/kg、約 25 mg/kg、約 27 mg/kg、約 30 mg/kg、約 33 mg/kg、約 35 mg/kg、約 36 mg/kg、約 40 mg/kg、約 42 mg/kg、約 45 mg/kg、約 48 mg/kg 及び約 50 mg/kg から選択される。いくつかの実施形態では、用量は、約 0.03 mg/kg、約 0.1 mg/kg、約 0.3 mg/kg、約 1 mg/kg、約 2 mg/kg、約 3 mg/kg、約 4 mg/kg、約 5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 7 mg/kg、約 8 mg/kg、約 9 mg/kg、約 10 mg/kg、約 12 mg/kg、約 15 mg/kg、約 18 mg/kg、約 21 mg/kg、約 24 mg/kg、約 25 mg/kg、約 27 mg/kg、約 30 mg/kg、約 33 mg/kg、約 35 mg/kg、約 36 mg/kg、約 40 mg/kg、約 42 mg/kg、約 45 mg/kg、約 48 mg/kg 及び約 50 mg/kg から選択される。実施形態では、用量は、1 週間に 1 回又は 2 週間に 1 回のスケジュールで投与される。実施形態では、方法は、プライミング用量を対象に投与することを更に含む。

20

30

40

【0436】

一態様では、本開示は、がん処置の有効性を、それを必要とする対象において評価する方法に関し、前記方法は、一般構造：N 末端 - (a) - (b) - (c) - C 末端を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、式中、(a) は Ig ドメイン及び ITIM ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体 (TIGIT) の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、(b) は第 1 及び第 2 のドメインに隣接するリンカーであって、ヒン

50

ジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカーであり、(c)はヒトLIGHT (リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、CD258又はTNFSF14としても知られる、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、ここで、用量は、約0.03mg/kg~約50mg/kgである、工程と、対象から生物学的試料を得る工程と、生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択されるサイトカインのレベル及び/又は活性を決定する工程と、対象が、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択される少なくとも1つのサイトカインのレベル及び/又は活性の増加を有する場合、投薬を継続する工程と、を含む。

10

【0437】

一態様では、本開示は、がんの療法による処置のための対象を選択する方法に関し、前記方法は、一般構造：N末端-(a)-(b)-(c)-C末端を有するキメラタンパク質の用量を投与する工程であって、式中、(a)はIgドメイン及びITIMドメインを有するヒトT細胞免疫受容体(TIGIT)の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであって、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカーであり、(c)ヒトLIGHT (リンホトキシン様であり、誘導性発現を示し、CD258又はTNFSF14としても知られる、Tリンパ球によって発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)についてHSV糖タンパク質Dと競合する)の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり、ここで、用量は、約0.03mg/kg~約50mg/kgである、工程と、対象から生物学的試料を得る工程と、生物学的試料に対してアッセイを実施して、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択されるサイトカインのレベル及び/又は活性を決定する工程と、対象が、IL-2、IL-10、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1β(CCL4)TARC(CCL17)、IFNγ、IL-8、IL-12及びSDF1a(CXCL12)から選択される少なくとも1つのサイトカインのレベル及び/又は活性の増加を有する場合、がん療法による処置に対して対象を選択する工程と、を含む。

20

30

【実施例】

【0438】

本明細書の実施例は、本開示の利点及び利益を例示するため、並びに抗PD-1、抗PD-L1及び/又は抗PD-L2療法に耐性の細胞の調製又は使用に関して当業者を更に支援するために提供される。本明細書の実施例はまた、本開示の好ましい態様をより完全に説明するために提示される。実施例は、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を限定するものとして決して解釈されるべきではない。実施例は、上述した本開示の変形、態様又は実施形態のいずれかを含むか、又は組み込むことができる。上述の変形、態様又は実施形態はそれぞれ、本開示の任意の又は全ての他の変形、態様又は実施形態の変形を更に含むか又は組み込むこともできる。

40

【0439】

実施例1：抗PD-1耐性CT26腫瘍の生成

マウス結腸がんCT26細胞を、抗PD-1処置を生き延びて抗PD-1抗体耐性CT26細胞を生成するための選択に供した。抗PD-1耐性CT26腫瘍細胞の生成に使用した方法を図1Aに示す。簡単に説明すると、BALB/CマウスをJackson Laboratoryから入手し、数日間の順化後、マウスの後側腹部に500,000個のマウス結腸がんCT26細胞を接種した。平均腫瘍体積が80~100mm³に達したら(0日目を示す)、マウスに、0、3及び6日目に100μgの抗PD-1(クローン

50

RMP1-14; BioXcell)の一連の腹腔内注射を行った。最初の処置のおよそ10~14日後に、抗PD-1療法に应答しなかったマウスから腫瘍を切除した。コラゲナーゼ(StemCell Technologies)を用いて腫瘍を解離させ、1×PBSで洗浄し、10%ウシ胎児血清、1%GLUTIMAX及び1%抗生物質-抗真菌剤(全てGIBCO)を補充したIMDM培養培地に播種した。細胞を少なくとも5回継代し、次いで、上記のように新しいレシピエントマウスに接種した(ラウンド2)。再び、腫瘍が80~100mm³に達したら、抗PD-1の別の処置過程を開始した:100µgの抗PD-1(クローンRMP1-14; BioXcell)の腹腔内注射を0日目、3日目、及び6日目に投与した。このプロセスを合計4ラウンド繰り返し、その時点で、処置マウスのいずれも抗PD-1療法に应答しなかった。2回の抗PD-1選択後に作製された細胞株は、本開示全体を通して「第2ラウンド」、「第2世代」又は「F2世代」と呼ばれる。4ラウンドの抗PD-1選択後に作製された細胞株は、「第4ラウンド」、「第4世代」又は「F4世代」と呼ばれる。

10

【0440】

CT26細胞又は抗PD-1抗体耐性CT26細胞同種移植片における抗PD-1抗体の有効性を比較した。簡潔には、BALB/Cマウスに、CT26親細胞及びPD-1耐性第4世代細胞を後側腹部に接種した。出発腫瘍体積(STV)が80~100mm³に達したら、マウスを以下の2つの処置群に無作為に分けた:(1)ビヒクル(PBS)、及び(2)抗PD-1抗体。マウスに、0、3及び6日目にビヒクル又は100µgの抗PD-1(クローンRMP1-14; BioXcell)の一連の腹腔内注射を行った。腫瘍体積を示された日に測定し、時間の関数としてプロットした。図1Bに示すように、CT26親細胞腫瘍の成長は、ビヒクルのみの対照と比較して、抗PD-1抗体で処置した場合に有意に遅延した(図1Bにおいて灰色の実線を黒色の実線と比較する)。対照的に、PD-1耐性細胞は、存在するとしても、腫瘍の遅延をほとんど示さなかった。これらの結果は、とりわけ、抗PD-1耐性細胞の抗PD-1耐性が、免疫適格マウスにおいて処置後に発生した(獲得耐性)ことを実証する。

20

【0441】

したがって、抗PD-1抗体耐性細胞が開発された。また、抗PD-1耐性細胞を有する細胞のマウスモデルを開発した。したがって、本明細書中に開示されるマウスモデルは、抗PD-1抗体耐性CT26細胞同種移植片を有するマウスに抗がん薬候補を投与し、抗がん薬候補ががん成長の遅延又は阻害に有効であるかどうかを評価することによって、抗がん薬候補を試験するために有用である。がん成長を遅らせるか又は阻害するのに有効な抗がん薬又は候補は、ヒト患者への投与のために製剤化され得る。

30

【0442】

実施例2:RNA-seqを使用した抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリング

親CT26細胞の3つの別個のバイアル(ATCC; “experimental replicates”)、「第2ラウンド」マウスからの2つの独立して単離された腫瘍、「第4ラウンド」マウスからの4つの独立して単離された腫瘍(両方とも「生物学的複製物」)を、20ng/mLのマウスIFNγ(Biolegend)を有する場合及び有さない場合で、37°C/5%CO₂で24時間培養した。翌日、QIASHREDDER均質化及びオンカラムDNase I消化を含む製造者の指示に従って、Qiagen RNeasy試薬を使用して細胞からRNAを単離した。単離したRNAをRNA-seq及びデータ解析に供した。手短に言えば、配列決定ライブラリーを作製し、ILLUMINA HISEQ(2×150対のエンドリード)で配列決定し、試料当たり20×10⁶個を超えるリードを標的とした。TRIMMOMATIC v.0.36を使用して配列をトリミングし、STAR ALIGNER v.2.5.2bを使用してハツカネズミ(Mus musculus)GRCm38参照ゲノムにマッピングした。ユニーク遺伝子ヒットカウントは、SUBREADパッケージv.1.5.2からのFEATURECOUNTSを使用することによって計算した。エクソン領域内に入るユニークリード

40

50

のみをカウントした。示差的遺伝子発現を $DESeq2$ を使用して決定し、 $Wald$ 検定を使用して p 値及び $\log_2$ 倍数変化を生成した。 $\log_2$ 倍数変化 > 1 及び調整された p 値 < 0.05 を有意性のカットオフとする。

【0443】

図2A（上のパネル）に示すように、主成分分析（PCA）は、トランスクリプトーム発現に基づいて試料を空間的に分離できることを示した。示差的に発現した遺伝子（DEG）を群間で決定し（親対第2世代、親対第4世代、第2世代対第4世代）、ヒートマップにプロットした。図2A（下のパネル）に示すように、階層的クラスタリングを実行して、各行で順序遺伝子をランク付けし、各比較で2つの主要なクラスターに遺伝子を分離し、遺伝子発現のサブセットは一方のデータセットではより低く（青色）、他方ではより高かった（赤色）。次いで、各遺伝子セットに関連する遺伝子オントロジー（GO）を同定するために、PANTHERアプリケーションを使用して遺伝子を分析した。遺伝子セットを、関連する p 値とともに示す。各データセットにおいて、上方制御遺伝子又は下方制御遺伝子を同定した。図2Bに示すように、以下のGOに関連する遺伝子が、親CT26細胞と比べて第2世代細胞で上方制御された：細胞周期プロセスの正の制御、G1/S移行の制御、細胞分裂の制御、及び細胞増殖の制御。以下のGOに関連する遺伝子は、親CT26細胞と比べて第2世代細胞で下方制御された：リン脂質排出、線維素溶解の負の調節、カイロミクロンアセンブリ、及び原形質膜修復（図2B）。更に、図2Bに示すように、以下のGOに関連する遺伝子は、親CT26細胞と比べて第4世代細胞において上方制御された：IKBキナーゼ/NFkBシグナル伝達の正の調節、I型IFNシグナル伝達経路、IFN γ に対する細胞応答、自然免疫応答の調節。これは、とりわけ、IFN γ に対する細胞応答が抗PD-1及び他の免疫治療薬に対する感受性に関与することが広く知られているので、驚くべきことであった。以下のGOに関連する遺伝子は、親CT26細胞と比べて第4世代細胞で下方制御された：膜へのSRP依存性共翻訳タンパク質標的化、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リン脂質排出、翻訳の制御（図2B）。興味深いことに、以下のGOに関連する遺伝子は、第2世代細胞と比べて第4世代細胞では上方制御された：IFN γ に対する細胞応答、IKBキナーゼ/NFkBシグナル伝達の正の調節、抗原プロセッシング/提示の負の調節、及びMHCクラスIを介した内因性ペプチドの抗原プロセッシング/提示（図2B）。以下のGOに関連する遺伝子は、第2世代細胞と比べて第4世代細胞で下方制御された：ミトコンドリア呼吸鎖複合体I、ミトコンドリア翻訳伸長、DNA依存性DNA複製、及びATP生合成プロセス（図2B）。全てのデータセット間の遺伝子発現の重複のベン図を作成した。図2C（上パネル）に示すように、DEGは、第4世代細胞と第2世代細胞との間に有意な重複を示した。図2A（下のパネル）は、選択された遺伝子における100万当たりの転写物（TPM；正規化式データ）を示し、PD-L1、抗原プロセッシング/提示、タンパク質翻訳、ER輸送に関連する遺伝子のより高いベースライン発現を実証し、いくつかのデータセットでは他のデータセットよりも高い。図2C（下のパネル）に示されるように、遺伝子Cd274、B2M、Tap1、Tap2、Casp1及びGast3は、CT26親細胞から第2世代細胞及び第4世代細胞へと次第に増加する発現を示した。更に、遺伝子Rpl41、Rps15及びRps8は、CT26親細胞から第2世代細胞及び第4世代細胞への発現の漸減を示した（図2C（底部パネル））。図2Dに示されるように、遺伝子Stat1、Stat2、Irf、Ltbfr及びPvrは、CT26親細胞から第2世代細胞及び第4世代細胞へと次第に増大する発現を示した。

【0444】

これらの結果は、とりわけ、抗PD-1療法に対する獲得耐性に関連するバイオマーカーを確立する。そのようなバイオマーカーは、抗PD-1療法から利益を受け得る患者又は抗PD-1療法から利益を受けない患者を同定するために使用され得る。したがって、これらのバイオマーカーに基づいて、患者からの生物学的試料からの本明細書に開示される1又は複数の遺伝子オントロジー（GO）経路に関連する遺伝子の存在、非存在、又はレベルについて試料を評価することに基づいて、患者が抗PD-1療法による処置のため

10

20

30

40

50

に選択され得る。PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法は、例えば、Rpl41、Rps15及びRps8の1又は複数の発現が高く、並びに／あるいはCd274、B2m、Tap1、Tap2、Casp1及びGasta3の1又は複数の発現が低い場合に示され得る。対照的に、PD-1、PD-L1及び／又はPD-L2の機能及び／又は活性を阻害する能力を用いるがん療法は、例えば、Rpl41、Rps15及びRps8の1又は複数の発現が低く、並びに／あるいはCd274、B2m、Tap1、Tap2、Casp1及びGasta3の1又は複数の発現が高い場合に示され得ない。Rpl41、Rps15及びRps8の1又は複数の低発現並びに／あるいはCd274、B2m、Tap1、Tap2、Casp1及びGasta3の1又は複数の高発現を特徴とする患者は、PD-1非応答性細胞を排除するアジュバント療法又はネオアジュバント療法から利益を得る可能性が高い。

10

【0445】

実施例3：抗PD-1耐性CT26におけるPD-L1、PD-L2、MHCクラスI及びβ2ミクログロブリンの細胞表面発現

Cd274 (PD-L1)、β2ミクログロブリン (B2m)、並びにTap1及びTap2遺伝子 (主要組織適合遺伝子複合体クラスI関連抗原のプロセッシング及び小胞体への輸送に潜在的に関与する) がCT26親細胞から第2世代細胞及び第4世代細胞に徐々に下方制御されたため、PD-L1、PD-L2、MHCクラスI及びβ2ミクログロブリン (B2m) の表面発現を試験した。簡潔には、親を培養物から採取し、PD-L1、PD-L2、MHCクラスI及びβ2ミクログロブリン (B2M) の表面発現についてフローサイトメトリーによって分析した。ゲートは示されるように描かれ、各プロットの上には各ゲート中の細胞のパーセンテージが示され、各パーセンテージの右側には各マーカーのMFI (平均蛍光強度) が示される。図3に示すように、PD-L1、MHCクラスI及びβ2ミクログロブリン (B2M) の表面発現は、親細胞と比べて第4世代抗PD-1耐性細胞では下方制御されなかった。他方、PD-L2の表面発現は、親細胞と比べて第4世代抗PD-1耐性細胞において下方制御された。これらのデータは、遺伝子発現及び細胞表面タンパク質発現の不一致が、RNA発現と比較してPD-L1/2 MHCクラスI及びB2Mにおいて表面発現が観察されたことを示す。

20

【0446】

実施例4：抗PD-1耐性細胞株及び一次耐性抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイリング

次に、第2世代及び第4世代の抗PD-1耐性細胞株のトランスクリプトームプロファイルを、互いに、及び抗PD-1一次耐性細胞株と比較することによって研究した。B16.F10マウス黒色腫瘍細胞株を、これらの腫瘍が抗PD-1療法に応答しないので、抗PD-1「一次耐性」のモデルとして使用した。親CT26細胞の3つの別個のバイアル (ATCC; 「実験的反復」)、 「第2ラウンド」マウスからの2つの独立して単離された腫瘍、 「第4ラウンド」マウスからの4つの独立して単離された腫瘍 (両方とも「生物学的複製物」)、及び親B16.F10細胞の2つの別個のバイアル (ATCC; 「実験的複製物を、20 ng/mLのマウスIFNγ (Biolegend) の有無にかかわらず、37°C/5% CO₂で24時間培養して、インビトロ応答性を評価した。これは、免疫細胞が浸潤し、IFNγのようなエフェクターサイトカインを分泌するので、腫瘍細胞がインビボでどのように応答するかを模倣する。翌日、QIASHREDDER均質化及びオンカラムDNase I消化を含む製造者の指示に従って、Qiagen RNeasy試薬を使用して細胞からRNAを単離した。単離したRNAをRNA-seq及びデータ解析に供した。手短に言えば、配列決定ライブラリーを作製し、ILLUMINA HISEQ (2×150対のエンドリード) で配列決定し、試料当たり20×10⁶個を超えるリードを標的とした。TRIMMOMATIC v. 0.36を使用して配列をトリミングし、STAR ALIGNER v. 2.5.2bを使用してハツカネズミ (Mus musculus) GRCm38参照ゲノムにマッピングした。ユニーク遺伝子ヒットカウントは、SUBREADパッケージv. 1.5.2からのFEATURECOU

30

40

50

N T Sを使用することによって計算した。エクソン領域内に入るユニークリードのみをカウントした。示差的遺伝子発現をD E S e q 2を使用して決定し、W a l d検定を使用してp値及びl o g 2 倍数変化を生成した。l o g 2 倍数変化> 1 及び調整されたp値< 0 . 0 5を有意性のカットオフとする。未処置親C T 2 6とI F N γ 処置親C T 2 6との間でD E Gを同定した。図4 A (左パネル)に示すように、L o g 2 倍率変化をヒートマップにプロットし、遺伝子を親C T 2 6に基づいて階層的にクラスター化した。これらのうち、338個の遺伝子が他のデータセットから使用可能なデータを有しており、それらの値を他の列に示す(図4 A (左パネル))。遺伝子を3つの主要なクラスターに分離した(図4 A (左パネル))。関連する遺伝子をP A N T H E Rに入力して、調節不全遺伝子に関連する経路を同定し、D E Gに関連するG O経路を同定した。図4 A (右パネル)に示されるように、以下のG O経路に関連する遺伝子の発現の上方制御は、親C T 2 6細胞及びB 1 6 . F 1 0細胞の両方と比較した場合、第2世代細胞及び第4世代細胞において濃縮された: L - フェニルアラニン異化プロセス、リン脂質排出、チロシン異化プロセス、酸性p Hに応答したR N AポリメラーゼI Iプロモーターからの転写の正の調節、及び薬物輸送。したがって、これらのG O経路の1又は複数に関連する遺伝子の上方制御は、抗P D - 1療法に対する獲得耐性に関連する可能性が高い。更に、以下のG O経路に関連する遺伝子の発現の下方制御は、親C T 2 6細胞及びB 1 6 . F 1 0細胞の両方と比較した場合第4世代細胞で観察された: N K細胞媒介性細胞傷害の保護、I G S 1 5 - タンパク質コンジュゲーション、M H CクラスIを介した抗原プロセッシング/提示、M H Cタンパク質複合体アセンブリ、及びE R輸送に対するサイトゾル(図4 A (右パネル))。したがって、これらのG O経路の1又は複数の下方制御は、抗P D - 1療法に対する獲得耐性に関連する可能性が高い。図4 A (右パネル)に示されるように、以下のG O経路に関連する遺伝子の発現の下方制御は、第4世代細胞及びB 1 6 . F 1 0細胞において、両方の親C T 2 6細胞と比べて濃縮された: I κ Bキナーゼ/ N F κ Bシグナル伝達の正の調節、I型I F Nシグナル伝達経路、I F N α 産生の正の調節、防御応答の正の調節、I F N β 産生の正の調節、及び炎症応答の調節。したがって、これらのG O経路の1又は複数の下方制御は、抗P D - 1療法に対する耐性に関連する可能性が高い。図4 Bは、選択された遺伝子における100万当たりの転写物(T P M; 正規化発現データ)を示す。図4 Bに示されるように、C T 2 6抗P D - 1耐性細胞は、I型インターフェロン及びI I型インターフェロンのベースライン過活性化を有するが、それらの細胞がI F N γ によりチャレンジされると、それらの細胞は、これらの遺伝子を下方制御する。これは、とりわけ、I κ Bキナーゼ/ N F κ Bシグナル伝達の正の調節、I型I F Nシグナル伝達経路、I F N α 産生の正の調節、防御応答の正の調節、I F N β 産生の正の調節、及び炎症応答の調節が全て抗P D - 1及び他の免疫治療薬に対する感受性に関与することが広く知られているので、驚くべきことであった。

10

20

30

40

50

【0447】

これらの結果は、とりわけ、抗P D - 1療法に対する獲得耐性に関連するバイオマーカー、及び抗P D - 1療法に対する耐性(獲得耐性又は一次耐性)に関連するバイオマーカーを確立する。そのようなバイオマーカーは、抗P D - 1療法から利益を受け得る患者又は抗P D - 1療法から利益を受けない患者を同定するために使用され得る。したがって、これらのバイオマーカーに基づいて、患者からの生物学的試料からの本明細書に開示される1又は複数の遺伝子オントロジー(G O)経路に関連する遺伝子の存在、非存在、又はレベルについて試料を評価することに基づいて、患者が抗P D - 1療法による処置のために選択され得る。P D - 1、P D - L 1及び/又はP D - L 2の機能及び/又は活性を阻害する能力を用いるがん療法は、例えば、T r i m 7及び/又はA n k 3の発現が高い場合及び/又はT a p 2及び/又はC a s p 1の発現が低い場合に示され得る。対照的に、P D - 1、P D - L 1及び/又はP D - L 2の機能及び/又は活性を阻害する能力を用いるがん療法は、例えば、T r i m 7及び/又はA n k 3の発現が高い場合及び/又はT a p 2及び/又はC a s p 1の発現が低い場合に示されない場合がある。T r i m 7及び/又はA n k 3の高発現、並びに/あるいはT a p 2及び/又はC a s p 1の低発現を特徴

とする患者は、PD-1 非応答性細胞を排除するアジュバント療法又はネオアジュバント療法から利益を得る可能性が高い。

【0448】

実施例5：親細胞と比べて抗PD-1 耐性細胞において示差的に調節される遺伝子の逆説的調節不全

次に、野生型CT26細胞と比べて第4世代抗PD-1 耐性細胞において示差的に発現される特定の遺伝子の発現に対するIFN γ の効果を試験した。簡潔には、親CT26細胞、第2世代抗PD-1 耐性細胞及び第4世代抗PD-1 耐性細胞を、20 ng/mLのマウスIFN γ (Biolegend)を有する場合及び有さない場合で、37°C/5% CO₂で24時間培養した。翌日、QIASHREDDER均質化及びオンカラムDNase I消化を含む製造者の指示に従って、Qiagen RNeasy 試薬を使用して細胞からRNAを単離した。単離したRNAをRNA-seq及びデータ解析に供した。手短に言えば、配列決定ライブラリーを作製し、ILLUMINA HISEQ (2×150 対のエンドリード)で配列決定し、試料当たり20×10⁶個を超えるリードを標的とした。TRIMMOMATIC v. 0.36を使用して配列をトリミングし、STAR ALIGNER v. 2.5.2bを使用してハツカネズミ (Mus musculus) GRCh38 参照ゲノムにマッピングした。ユニーク遺伝子ヒットカウントは、SUBREAD パッケージ v. 1.5.2 からのFEATURECOUNTSを使用することによって計算した。エクソン領域内に入るユニークリードのみをカウントした。示差的遺伝子発現をDESeq2を使用して決定し、Wald検定を使用してp値及びlog₂ 倍数変化を生成した。log₂ 倍数変化>1 及び調整されたp値<0.05を有意性のカットオフとする。

10

20

【0449】

IFN γ の効果を理解するために、過剰発現 (Cd274 及びB2m) 又は抑制 (Trim7 及びLrg1) のいずれかである代表的な遺伝子の100万当たりの転写物 (TPM; 正規化発現データ) を分析した。予想通り、Cd274 (PD-L1) の発現は、野生型CT26細胞から第2世代抗PD-1 耐性細胞及び第4世代抗PD-1 耐性細胞に増加した (図5A (左パネル))。野生型CT26細胞において増加したCd274の発現は、野生型CT26細胞をIFN γ で誘導した場合に増加した (図5Aの閉円データを比較する (左右パネル))。逆説的に、Cd274 (PD-L1) の発現は、IFN γ に

30

【0450】

B2Mの発現はまた、予想通り、野生型CT26細胞から第2世代抗PD-1 耐性細胞及び第4世代抗PD-1 耐性細胞に増加した (図5B (左パネル))。野生型CT26細胞におけるB2Mの発現は、野生型CT26細胞をIFN γ で誘導した場合に増加した (図5B (左右パネル) の閉円データを比較する)。逆説的に、B2Mの発現は、IFN γ に

40

【0451】

予想通り、Trim7の発現は、野生型CT26細胞から第2世代抗PD-1 耐性細胞及び第4世代抗PD-1 耐性細胞に減少した (図5C (左パネル))。野生型CT26細胞において増加したTrim7の発現は、野生型CT26細胞をIFN γ で誘導した場合に増加した (図5Cの閉円データを比較する (左右パネル))。逆説的に、Trim7の発現は、IFN γ に

【0452】

同様に、Lrg1の発現は、野生型CT26細胞から第2世代抗PD-1 耐性細胞及び第4世代抗PD-1 耐性細胞に減少した (図5D (左パネル))。野生型CT26細胞におけるLrg1の発現は、野生型CT26細胞をIFN γ で誘導した場合に増加した (図

50

5 D（左右パネル）の閉円データを比較する）。逆説的に、L r g 1の発現は、I F N γに
応答して野生型C T 2 6細胞から第2世代抗P D - 1耐性細胞及び第4世代抗P D - 1
耐性細胞に減少した（図5 D（右パネル））。

【0453】

これらの結果は、とりわけ、I F N γの存在下又は非存在下で成長させた場合における
、親がん細胞と比べての、C d 2 7 4、B 2 m、T r i m 7及びL r g 1などの遺伝子の
逆説的な調節不全を示唆している。

【0454】

実施例6：耐性のドライバー遺伝子の同定

理論に拘束されることなく、複数の遺伝子で調節不全が観察されたので、逆説的な調節
不全は、抗P D - 1剤に対する獲得耐性の機能的結果であると仮定された。観察された逆
説的調節不全に関与するドライバー遺伝子を同定するために、図6 Aに開示される分析を
行った。簡潔には、I F N γの存在下で増殖させた場合に親C T 2 6細胞と比べて第4世
代抗P D - 1耐性細胞において示差的に発現する遺伝子（D E G）を同定した。図6 A（
パネル1）に示されるように、1, 999個の遺伝子が下方制御され、3607個の遺伝
子がC T 2 6細胞と比べてI F N γの存在下で第4世代抗P D - 1耐性細胞において上方
制御される。これらの遺伝子から、第4世代抗P D - 1耐性細胞を下方制御したがC T 2
6細胞を上方制御したものを同定した。図6 A（パネル2）に示されるように、1, 06
0個の遺伝子が、この基準を使用して狭められた（第4世代抗P D - 1耐性細胞は下方制
御されたが、C T 2 6細胞は上方制御された）。これらの遺伝子を、I F N γに対する応
答性に基づいて更に狭めた。図6 A（パネル3）に示されるように、688個の遺伝子は
、I F N γに対する応答性に従って選別することによって明らかにされるように、C T 2
6細胞と比べて第4世代抗P D - 1耐性細胞を下方制御する。これらの遺伝子は、L r g
1、S p r y 2、A r g 1、T r i m 8、T r i m 2、M a p k 8 i p 1、T r i m 7、
T r i m 6などを含む（図6 A（パネル3））。

【0455】

次いで、これらの遺伝子を更に狭めるために、親C T 2 6細胞、第2世代抗P D - 1耐
性細胞及び第4世代抗P D - 1耐性細胞をマウスにおいてインビボで増殖させた。R N A
を腫瘍から単離し、R N A - s e q及びデータ分析に供した。（図6 A（パネル3）から
の688個の遺伝子から。インビボでも上方制御されたこれらの遺伝子を同定した。図6
A（パネル4）に示されるように、70個の遺伝子が、C T 2 6細胞と比べて、第4世代
の抗P D - 1耐性細胞においてインビボで上方制御された。これらの遺伝子は、K r t 8
、M a p k 8 i p 1、A r g 1及びL r g 1を含む。図6 Bは、図6 Aの少なくとも2つ
の工程で濃縮された遺伝子オントロジー（G O）経路を示す。この分析は、T R I Mタン
パク質ファミリー（特に、T r i m 7）、M a p k 8 i p 1、E l k 1、L r g 1、A r
g 1がドライバーの一部であることを同定した。図6 Cは、タンパク質のT R I Mファミ
リによって影響される機能的経路を示す。図6 Dは、E l k 1及びc - J u nが役割を
果たす機能的経路を示す。図6 Eは、L r g 1、B 2 m及びA r g 1と他の遺伝子との間
の機能的接続を示す。図6 Fは、C a n c e r G e n o m e A t l a s（T C G A）
がんゲノムクスプログラムにおける腫瘍及び周囲の正常組織におけるE l k 1の発現レ
ベルを示す。

【0456】

実施例7：更なる示差的に調節される遺伝子の逆説的な調節不全

過剰発現している更なる代表的な遺伝子（S t a t 1、S t a t 2、I r f 1及びT a
p 1）についての100万当たりの転写物（T P M；正規化発現データ）を分析した。S
t a t 1の発現は、野生型C T 2 6細胞から第2世代抗P D - 1耐性細胞及び第四世代抗
P D - 1耐性細胞に増加した（図7 A（左パネル））。野生型C T 2 6細胞におけるS t
a t 1の発現は、野生型C T 2 6細胞をI F N γで誘導した場合に増加した（図7 A（左
右パネル）の閉円データを比較する）。逆説的に、S t a t 1の発現は、I F N γに
応答して野生型C T 2 6細胞から第2世代抗P D - 1耐性細胞及び第4世代抗P D - 1耐性細胞

10

20

30

40

50

胞に減少した（図 7 A（右パネル））。

【 0 4 5 7 】

S t a t 2 の発現はまた、野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に増加した（図 7 B（左パネル））。野生型 C T 2 6 細胞における S t a t 2 の発現は、野生型 C T 2 6 細胞を I F N γ で誘導した場合に増加した（図 7 B（左右パネル）の閉円データを比較する）。逆説的に、S t a t 2 の発現は、I F N γ に応答して野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に減少した（図 7 B（右パネル））。

【 0 4 5 8 】

同様に、I r f 1 の発現は、野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に増加した（図 7 C（左パネル））。野生型 C T 2 6 細胞における I r f 1 の発現は、野生型 C T 2 6 細胞を I F N γ で誘導した場合に増加した（図 7 C（左右パネル）の閉円データを比較する）。逆説的に、I r f 1 の発現は、I F N γ に応答して野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に減少した（図 7 C（右パネル））。

【 0 4 5 9 】

予想通り、T a p 1 の発現は、野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に増加した（図 7 D（左パネル））。野生型 C T 2 6 細胞における T a p 1 の発現は、野生型 C T 2 6 細胞を I F N γ で誘導した場合に増加した（図 7 D（左右パネル）の閉円データを比較する）。逆説的に、T a p 1 の発現は、I F N γ に応答して野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に減少した（図 7 D（右パネル））。

【 0 4 6 0 】

実施例 8：示差的に調節された遺伝子の経路分析

経路分析を行うために、WEBベースの G E n e S e t A n a l y s i s T o o l k i t (W e b G e s t a l t) を使用して行った。簡潔には、第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞を下方制御したが、C T 2 6 細胞を上方制御した上位 1, 0 0 0 個の遺伝子（図 6 A（パネル 2）参照）を、第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞と親 C T - 2 6 試料との間の発現の倍率差に基づいて順位付けした。これらの遺伝子及びランキングを W e b G e s t a l t に入力して、遺伝子セット濃縮分析 (G S E A) 及び K y o t o E n c y c l o p e d i a o f G e n e s a n d G e n o m e s (K E G G) 経路機能データベースを使用して、これらの遺伝子に関連する濃縮／脱濃縮経路を同定した。B e n j a m i n i - H o c h b e r g 偽陽性率 (F D R) を統計学的有意性のために使用した。この分析は、親 C T - 2 6 細胞と比べて、第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞では以下の経路が過活性であることを示した：シルカルダン同調、c A M P シグナル伝達経路、コリン作動性シナプス、メラニン形成、R a p 1 シグナル伝達経路、ヒトサイトメガロウイルス感染、ヒト免疫不全 1 ウイルス感染、グルタミン酸作動性シナプス、がんにおける経路及び R a s シグナル伝達経路（図 8 A）。以下の経路が、親 C T - 2 6 細胞と比べて第 4 世代の抗 P D - 1 耐性細胞において抑制された：全身性エリテマトーデス、がんにおけるマイクロ RNA、肝細胞がん、結核及び小胞体におけるタンパク質プロセッシング。濃縮スコア及び有意性を可視化するために、図 8 A に示すデータに基づいてボルケーノプラットを調製した。図 8 B は、ボルケーノプロットを示す。図 8 B に示すように、概日エンタレインメントは右に最も遠い「点」であったが、がん及び R a s シグナル伝達における経路が最も高かった（すなわち、最も有意な F D R 値を有する）。強い有意性はなかったが（全ての F D R > . 0 5、ゲノミクスのノイズでしばしば起こる）、この不偏分析では R a s / R a p 1 シグナル伝達経路が同定された。図 8 C は、R A S シグナル伝達経路を示し、R a f / M e k / E r k シグナル伝達との収束を示す。図 8 D は、R A P 1 シグナル伝達経路を示し、R a f / M e k / E r k シグナル伝達との収束を示す。

【 0 4 6 1 】

実施例 9：C c l 5 (R A N T E S)、C x c l 1 0 (I P - 1 0) 及び I f n b 1 の

逆説的調節不全

C c l 5 (R A N T E S)、C x c l 1 0 (I P - 1 0) 及び I f n b 1 についての 1 0 0 万当たりの N e s t 転写物 (T P M; 正規化発現データ) を分析した。これらの遺伝子は、T r i m 7 の活性化によって誘導される。

【0462】

C c l 5 (R A N T E S) 及び C x c l 1 0 (I P - 1 0) は、I F N γ によって調節される遺伝子である。C c l 5 (R A N T E S) 及び C x c l 1 0 (I P - 1 0) を調節するプロモーターは、S T A T 1 二量体及び／又は I S G F 3 に対する結合部位を含有する。予想通り、C c l 5 (R A N T E S) の発現は、野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に増加した (図 9 A (左パネル))。野生型 C T 2 6 細胞において増加した C c l 5 (R A N T E S) の発現は、野生型 C T 2 6 細胞を I F N γ で誘導した場合に増加した (図 9 A の閉円データを比較する (左右パネル))。逆説的に、C c l 5 (R A N T E S) の発現は、I F N γ に応答して野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に減少した (図 9 A (右パネル))。

10

【0463】

C x c l 1 0 (I P - 1 0) の発現は、予想通り、野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に増加した (図 9 B (左パネル))。野生型 C T 2 6 細胞における C x c l 1 0 (I P - 1 0) の発現は、野生型 C T 2 6 細胞を I F N γ で誘導した場合に増加した (図 9 B (左右パネル) の閉円データを比較する)。逆説的に、C x c l 1 0 (I P - 1 0) の発現は、I F N γ に応答して野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に減少した (図 9 B (右パネル))。

20

【0464】

I f n b 1 の発現はまた、野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に増加した (図 9 C (左パネル))。野生型 C T 2 6 細胞における I f n b 1 の発現は、野生型 C T 2 6 細胞を I F N γ で誘導した場合に増加した (図 9 C (左右パネル) の閉円データを比較する)。逆説的に、I f n b 1 の発現は、I F N γ に応答して野生型 C T 2 6 細胞から第 2 世代抗 P D - 1 耐性細胞及び第 4 世代抗 P D - 1 耐性細胞に減少した (図 9 C (右パネル))。

30

【0465】

これらの結果は、とりわけ、抗 P D - 1 に対する獲得耐性が、C c l 5 (R A N T E S)、C x c l 1 0 (I P - 1 0) 及び I f n b 1 などの T r i m 7 調節遺伝子の逆説的調節に関連することを示している。

【0466】

実施例 10 : 材料及び方法

構築物生成及びタンパク質精製

ヒト及びマウスの T I G I T - F c - L I G H T の配列をコドン最適化し、哺乳動物発現ベクターに指向的にクローニングした。次いで、ベクターを E x p i 2 9 3 細胞に一過性にトランスフェクトするか、又は C H O 細胞に安定にトランスフェクトし、得られた融合タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。

40

【0467】

ウエスタンブロット

ヒト (h) 及びマウス (m) の T I G I T - F c - L I G H T タンパク質を製造者の推奨に従って 3 7 °C で 1 時間、+ / - デグリコシラーゼ P N G a s e F (N E B) で処理し、次いで + / - 還元剤ベータメルカプトエタノール (B M E) で処理し、S D S - P A G E による分離の前に S D S 負荷緩衝液で希釈した。h T I G I T - F c - L I G H T 及び m T I G I T - F c - L I G H T をプローブするために使用される一次抗体は、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g i e s, J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s, I n c. a n d R a n d D S y s t e

50

ms から入手した。

【0468】

MSD 及び ELISA の検出

二重結合効力アッセイ

TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質について；MSD マルチアレイプレート (MSD) を組換えヒト LT β R-Fc 又は HVEM-Fc (Acro Biosystems) で 4℃ にて一晚プレコーティングした。プレートを、シェーカー上、室温で少なくとも 1 時間、希釈剤 100 (MSD) でブロッキングした。洗浄後、分析試料を添加し、次いで連続的に 3 倍希釈し、2 連のウェルに充填して 8～10 個の試験濃縮物を生成した。結合した TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質を、組換えビオチン化ヒト PVR (Acro Biosystems) を用いて検出した。ルテニウム (MSD) にコンジュゲートしたストレプトアビジンを添加してビオチン標識検出器を結合させた。MSD Gold Reading 緩衝液 (MSD) をプレートに添加し、電荷を印加すると、電気化学発光シグナルが生成され、MSD MESO QuickPlex SQ 120 MM、Model 1300 で検出されて、相対光単位 (RLU) が生成された。同様のアッセイを、mTIGIT-Fc-LIGHT 及び マウス組換え PVR、HVEM 及び LT β R (Acro Biosystems) を使用して行った。

10

【0469】

抗体ベースの結合アッセイ

上記の二重効力アッセイについて記載したのと同じ方法を行ったが、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質を抗ヒト TIGIT で捕捉し、抗ヒト LIGHT-ビオチン (RandD Systems からの全ての抗体)、続いてストレプトアビジンスルホータグで検出した。

20

【0470】

DcR3 ブロッキングアッセイ

ヒト健常ドナー (2 人の異なるドナー) 及びがん患者 (腎臓、非小細胞肺癌、及び前立腺) の血清試料を Innovative Research から得た。MSD DcR3 検出試薬を使用して、製造業者の指示に従って、各試料中の可溶性 DcR3 のレベルをプロファイリングした。DcR3 の血清レベルが PVR 又は HVEM への TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質の結合を阻害するのに十分であるかどうかを評価するために、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質を氷上で 20 分間各血清試料中で個別にインキュベートした。このインキュベーションの後、試料をヒト組換え HVEM で予めコーティングした MSD プレートにロードした。次いで、プレートを上記の二重効力アッセイに従って処理し、ヒト組換え PVR を検出試薬として使用した。

30

【0471】

受容体／リガンド相互作用のバイオレイヤー干渉法に基づく親和性試験

バイオレイヤー干渉法に基づく親和性試験を使用して、ヒト組換えタンパク質 (PVR、HVEM、LT β R、PVR L2、PVR L3、及びネクチン-4；Acro Biosystems 又は Sino Biological から購入) のヒスチジン又はビオチンでタグ化されたバージョンを使用して、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質の意図される結合標的に対するオン速度 (K_a)、オフ速度 (K_d) 及び結合親和性 (K_D) を決定した。市販又は内部で製造された片側融合タンパク質対照 (TIGIT-Fc 及び Fc-LIGHT) も並行して試験した。標的を、Kinetics 緩衝液 (PBS / 1% Tween-20 / 1% BSA；pH 7.0) 中 3 μ g/mL の濃度で抗ペンタ His 又はストレプトアビジンコーティングバイオセンサに固定化した。組換え標的タンパク質への融合タンパク質の直接結合を、それぞれ 90 秒及び 120 秒の会合時間及び解離時間を使用して、Octet-Red 96 BLI 装置で行った。

40

【0472】

細胞培養

CHO-K1、CT26 / WT、B16.F10、CT26 / AR、Jurkat 及び

50

A375細胞をATCCから得、それらのガイドラインに従って培養し、5%CO₂中、37℃で維持した。活性培養中の全ての親細胞株を、Venor GeM Mycoplasma Detection Kit (Sigma) を使用して毎月試験する。全てのトランスフェクト細胞株を、トランスフェクション後に少なくとも2週間離して更に2回試験し、マイコプラズマについて陰性のままであることを確認する。

【0473】

インビトロ細胞株作製

ヒト又はマウスのTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のインビトロ結合を評価するために、CHO-K1/hPVR、CHO-K1/hHVEM、及びCHO-K1/mLTPRを含む、安定な細胞株を作製した。手短に言えば、cDNAベクターをRandDシステム又はOrigeneから得、pcDNA3.1(-) (Thermo Fisher) にクローニングし、次いで、親CHO-K1又はJurkat細胞を4D-Nucleofector及びCell Line Nucleofector Kit SE (Lonza) で製造者の指示に従ってヌクレオフェクションした。抗生物質選択及び限界希釈を用いた単一細胞クローニングの後、受容体発現をフローサイトメトリーを用いて検証し、得られた細胞株をインビトロ結合アッセイに使用した。

10

【0474】

インビトロ機能アッセイ

NFκBシグナル伝達：非カノニカル

LTPRを発現するU2OS/NIK/NFκBレポーター細胞をEurofins/DiscoverXから購入し、それらの推奨に従って培養した。アッセイの当日に、1×10⁴個のU2OS/NIK/NFκBレポーター細胞を、Fc-LIGHT又はTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のいずれかを含む96ウェルプレートの各ウェルにプレーティングした。培養6時間後、ルミノメーター (Promega) で発光活性を評価した。

20

【0475】

TIGIT/PVR/DNAM1レポーターアッセイ

CD155 (PVR) /TIGITブロッキングアッセイ (Promega) を製造者の説明書に従って使用した。試薬は、ヒトCD155 (PVR) を発現するCHO-K1標的細胞、並びにヒトTIGIT、CD226 (DNAM1) 及び共刺激薬応答性ルシフェラーゼ発現ベクターを発現するエフェクターJurkat細胞からなる。Jurkatエフェクターもまた、フローサイトメトリーを使用してヒトHVEMを発現することが確認された。アッセイのために、Jurkatエフェクター細胞を白色96ウェルプレート (Costar) に播種し、37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、細胞をCHO-K1標的細胞及び以下の試験物一組換えヒトIgG4 (陰性対照)、抗DNAM1遮断抗体、Fc-LIGHT又はTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と共培養した。抗LIGHT遮断抗体を使用して、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の共刺激ドメインの機能を遮断した。全ての抗体及び試薬は、Acro Biosystems、Sino Biologicals、又はRandD Systemsから購入した。更に6時間培養した後、Promega Navigator luminometerの自動注入器を用いてBio-Glo試薬 (Promega) をウェルに添加し、相対発光 (RLU) を測定した。

30

40

【0476】

NK/T細胞殺傷アッセイ

CT26腫瘍細胞を透明な96ウェルプレートに播種し、37℃/5%CO₂で一晩培養した。EasySep Mouse NK Cell Isolation Kit (StemCell Technologies) を用いて、BALB/cマウスの脾臓からNK細胞を単離した。EasySep Mouse T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies) を用いて、BALB/cマウスの脾臓からも全T細胞を単離した。T細胞を抗マウスCD3/CD28磁気ビーズ (

50

StemCell Technologies; 推奨濃度の $1/10$ で) で 48 時間準最適に刺激した。共培養の日に、NK (2.5 エフェクター: 1 標的細胞比) 又は T (5 エフェクター: 1 標的細胞比) 細胞を、CT26 腫瘍細胞 + / - mTIGIT-Fc-LIGHT 及び腫瘍細胞殺傷を評価するためのカスパーゼ 3 / 7-緑色試薬 (Essen Bioscience) を含むプレートに添加した。Incucyte S3 プラットフォームで画像を撮影し、Incucyte ソフトウェアを使用して蛍光シグナル (細胞死の増加) を経時的に定量した。

【0477】

T ナイブ (Tn) 及び T 幹細胞メモリー (Tscm) の分化及び分析

健康ヒトドナー PBMC を得、ナイーブ CD8 磁気単離キット (StemCell Technology からの細胞及び単離キット) を使用して CD8+T 細胞を単離した。単離された細胞を、抗ヒト CD3 / CD28 磁気ビーズ (Invitrogen) の存在下、1:3 の細胞対ビーズ比、 20 IU mL^{-1} ヒト組換え IL-2 (RandD Systems) 及び $5 \mu\text{M}$ TWS119 (SelleckChem) で 9 日間、AIMV 培地 (GIBCO) 中で培養した。Gattinoni et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat Med 17, 1290-1297 (2011). インキュベーション後、細胞を単離し、Human TruStain FcX Fc 受容体ブロッキング溶液 (BioLegend) を用いて Fc 受容体をブロックした。次いで、細胞を、CD3、CD8、CCR7、CD45RO、CD62L、CD45RA、CD27、IL7R α 、IL2R β 及び CD95 (全て BioLegend 製の抗体) に対する蛍光コンジュゲート化抗体を使用するフローサイトメトリーによって分析した。

【0478】

AIMV 増殖アッセイ及びサイトカイン分析

健康なヒトドナー PBMC を、ビヒクル (PBS)、TIGIT-Fc (IgG4) - LIGHT (150 nM)、TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT (150 nM)、抗 TIGIT (150 nM、IgG1 クローン #HuTIG1-IgG1. AA、Creative Biolabs)、抗 PD-1 (150 nM、ペンプロリズマブ)、又は抗 TIGIT と抗 PD-1 の組み合わせを含む 24 ウェルプレート中の AIM-V 培地 (Gibco) に 200 万細胞 / mL の密度で播種した。TIGIT-Fc (IgG4) - LIGHT について、ヒトドナー処理 PBMC のコンフルエンスを 6 日間の時間経過にわたって評価した。TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT 及び TIGIT-Fc (IgG4) - LIGHT の両方について、Promega MTS 増殖アッセイを製造業者の推奨に従って 7 日間の培養後に実施した。プレートを約 7 日間にわたって Incucyte S3 イメージャでイメージングした。2 日目及び 7 日目に、静的画像を撮影して、処置群間の形態の違いを実証した。実験の最後に、コンフルエント率を、Incucyte ソフトウェアを使用して決定した。同じ処理群を有する複製プレートを同じ密度の細胞で播種し、 $37^\circ\text{C} / 5\% \text{ CO}_2$ の標準的な細胞培養インキュベーターに 2 日間入れた。時間経過の最後に、培地を除去し、製造業者の推奨に従って、MSD 多重アレイを使用して IFN γ 、IL-8、IL-10、IL-12 / p70 及び SDF-1 α (CXCL12) のレベルについて評価した。

【0479】

AIMV 単一細胞 RNA-seq (scRNA-seq)

150 nM の TIGIT-Fc (IgG4) - LIGHT 又は TIGIT-Fc (IgG1) - LIGHT のいずれかと共に 2 日間培養した PBMC の免疫トランスクリプトームプロファイルを評価するために、10x Genomics Chromium ハンドラを使用して、処置された健康なドナーのヒト PBMC からの単一細胞を個々の油滴中に単離した。単一細胞ライブラリーを、10x Genomics Chromium Next GEM Single Cell 3' v3.1: Dual Index 試薬を製造者の説明書に従って使用して作製した。ライブラリーを Illumina NovaSeq

6000で配列決定し、逆多重化、バーコード化及びUMIカウント及びリードアラインメントのために10Xセルランジャーパイプライン(v6.0.2)で処理した。>10,000個の個々の細胞からのリード(>350×10⁶)をヒトhg38参照ゲノム(平均12K細胞/試料)にマッピングした。次いで、品質管理、正規化、統合、次元削減、視覚化、細胞クラスター化及びDEG分析のために、フィルタリングされた遺伝子カウントマトリックスをSeurat(v4.0.2)によって分析した。200未満、2500を超える遺伝子を有するか、又は>15%のミトコンドリア数を有する細胞を濾過した。遺伝子カウントを総リードカウントに対して正規化し、10,000にスケールリングし、次いで対数変換した。バッチ効果を除去するために、2000個のアンカーフィーチャを使用して全ての試料を統合した。次いで、統合されたデータをスケールリングし、上位30の主成分(PC)を均一なマニホールド近似及び投影(UMAP)の視覚化に使用した。上位30のPCを使用して共有最近傍(SNN)を識別し、細胞クラスターリングの分解能を0.4に設定した。次に、本発明者らは、SingleR(v1.6.1)を細胞型注釈に使用した。各クラスター内の処理細胞対対照についての示差的発現分析を、ウィルコックス法を使用して行った。本発明者らは、群間で0.25のlog倍数変化閾値を有する遺伝子に試験を限定した。

10

【0480】

SEBスーパー抗原アッセイ

初代PBMC(又はマウス脾細胞)を健常ドナー(Stemcell technologies)又はBALB/cマウスから得、ヒト又はマウスIgGコントロール(10µg/mL; Jackson ImmunoResearch, Inc.)又はTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の存在下で、200ng/mLのスーパー抗原SEB(List Biological Laboratories)とインキュベートした。3日後、培養上清を回収し、ヒト又はマウスIL-2(BioLegend)のレベルについてELISAによって評価した。

20

【0481】

A375細胞刺激

LTβRを発現するヒトA375細胞株は、LIGHTを介して共刺激に応答することが報告されている(Hehlhans and Mannel, 2001)。手短に言えば、A375細胞を、24ウェルプレートにウェル当たり2×10⁵細胞で一晩播種した。翌朝、細胞を未処理にするか、又は100nMのヒト抗LTβR(クローン71315、RandD Systems)若しくはTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のいずれかと培養した。3時間後、培地を細胞から除去し、5%ベータメルカプトエタノールを含有するQiagen RLT緩衝液をウェルに直接添加して、RNA単離のために細胞を溶解した。細胞材料をQiaShredderカラム(Qiagen)に通し、次いでオンカラムDNaseI消化を含むQiagen RNeasyキットを使用してRNAを精製した。0.5~1µgのRNAを、Origene First-Strand cDNA Synthesis試薬を使用して逆転写した。ヒトGAPDH、ACTB、CXCL8及びCCL2に対する検証されたqPCRプライマーをOrigeneから得た。Sybr Green試薬及びBioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Systemを使用してcDNAを増幅した。遺伝子発現の倍率変化は、デルターデルタCt法を使用して決定し、ハウスキーピング遺伝子ACTBに対する無処置対照の標的遺伝子発現を1の値に設定した。処置に応答して発現を変化させなかった遺伝子の例として、第2のハウスキーピング遺伝子(GAPDH)も使用した。

30

40

【0482】

フローサイトメトリー

手短に言えば、細胞を適切な場合にFc受容体遮断試薬(BioLegend)と共にインキュベートし、続いて暗所で氷上で30分間蛍光抗体で染色した。示された抗体は、BioLegend又はAbcamから購入した。AH1-四量体試薬をMBL Int

50

ernationalから購入し、暗所で氷上で1時間細胞とインキュベートした後、残りの抗体カクテルを添加した。このインキュベーション期間の後、染色した細胞を洗浄し、FACS緩衝液（1%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.02%アジ化ナトリウム及び2mM EDTAを含有する1×PBS緩衝液）に再懸濁した。フローサイトメトリーをBD LSR II Fortessaで行った。

【0483】

腫瘍モデルシステム

CT26/WT、抗PD-1耐性CT26腫瘍（CT26/AR）及びB16.F10研究のために、BALB/c又はC57BL/6マウスのそれぞれに、 5×10^5 個の腫瘍細胞を後側腹部に皮下移植した。腫瘍体積が約80～115mm³に達したとき（0日目を示す）、マウスを腫瘍体積によってランダム化し、処置を開始した。各個々の実験からの平均開始腫瘍体積（STV）を対応する図に列挙する。処置日に、マウスを、ビヒクル（滅菌PBS）、抗PD-1（クローンRMP1-14）、抗PD-L1（クローン10F.9G2）、抗TIGIT（クローン1G9）、抗LTβR（クローン4H8WH2）、Fc-LIGHT又はmTIGIT-Fc-LIGHTの腹腔内（IP）注射によって処置した。LTβR抗体はAdipogen及びLSBioから入手し、他の全ての治療用抗体はBioXcellから入手した。各剤の用量及びスケジュールを、対応する図及び図の凡例に列挙する。腫瘍体積（mm³）及び全生存を経時的に評価した。生存基準は、腫瘍潰瘍形成の徴候がない1800mm³未満の総腫瘍体積を含む。腫瘍が確立され、その後拒絶された完全奏効者を適切な図に列挙する。CT26実験マウスのコホートを、フローサイトメトリーを使用した腫瘍組織における免疫プロファイリングのため、並びにLuminexマルチプレックスアレイを製造者の説明書に従って使用した血清及び単離腫瘍におけるサイトカイン分析のために、様々な実験中に安楽死させた。腫瘍をこれらのマウスから切除し、腫瘍解離キット（Miltenyi）を用いて解離させ、100μMストレーナーでホモジナイズして腫瘍細胞及び浸潤免疫細胞を単離した。実験群のサイズは各図に記載されており、最低2回の独立した実験から生成される。

【0484】

CD4、CD8、及びNK枯渇実験

－1日目、1日目、及び7日目に、100μgの抗CD4（クローンGK1.5）、100μgの抗CD8（クローン2.43）、又は500μgの抗NK（クローンNK1.1）のIP注射を介してマウスを処置した。末梢血中のCD4、CD8、及びNK細胞集団をフローサイトメトリーによって評価して、枯渇を確認した。

【0485】

抗PD-1耐性CT26腫瘍の生成

上記のように、マウスの後側腹部に 5×10^5 個のCT26を接種した。平均腫瘍体積が80～100mm³に達したら（0日目を示す）、マウスに、0、3、及び6日目にそれぞれ100ugからなる抗PD-1（クローンRMP1-14；BioXcell）の腹腔内注射を行った。抗PD-1療法に応答しなかったマウスから腫瘍を切除し、コラゲナーゼ（StemCell Technologies）を用いて解離させ、1×PBSで洗浄し、培養培地にプレーティングした。細胞を2～4回継代し、次いで、上記と同じプロトコルに従って新しいレシピエントマウスに接種した。再び、腫瘍が80～100mm³に達したら、抗PD-1の別の処置過程を開始した。このプロセスを合計5ラウンド繰り返し、その時点で、処置マウスのいずれも抗PD-1療法に応答しなかった。抗PD-1獲得耐性を発達させるためのこのインビボ圧力の後に生成された細胞株は、CT26/AR（本明細書中で以前に特性決定された）と称される。

【0486】

カニクイザルにおけるヒトTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の投与

目的飼育のアジア起源カニクイザル（Macaca fascicularis）をCharles River Laboratories（Mattawan, MI）に收容し、これらの動物を用いた実験を、Guide for the Care and

Use of Laboratory Animalsに概説されている原則に従って、Institutional Animal Care and Use Committee for Charles River Laboratoriesによって承認された。ビヒクル対照又はTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質を、30分間にわたる静脈内注入によって投与した。ビヒクル（雄5匹、雌5匹）、0.1mg/kg（雄3匹、雌3匹）、1mg/kg（雄3匹、雌3匹）、10mg/kg（雄3匹、雌3匹）、又は40mg/kg（雄5匹、雌5匹）のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質を、7日（1日目、8日目、15日目、22日目）ごとに合計4回投与した。被験物質投与の前後に、全ての動物を、潜在的な臨床所見、体重、摂餌量、獣医学的身体検査、眼科検査、心電図検査、血圧評価及び神経学的評価について観察した。投与前及び投与後の臨床病理評価は、血液学、凝固、臨床化学及び尿検査も含んでいた。血清サイトカインに対するカリウムEDTA抗凝固及び末梢血フローサイトメトリー研究に対するヘパリンナトリウム抗凝固を使用した末梢血の投与前及び投与後採取を含む薬力学的評価。フローサイトメトリー分析のために末梢免疫細胞を染色するために使用される抗体パネルは、BD BiosciencesからのCD45及びCD3、並びにBiolegendからのCD8及びHVEMを標的とする試薬を含んでいた。

10

【0487】

実験動物ガイドライン

全てのマウス動物試験は、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)に従って、及びその承認を得て行われ、認可された獣医によって検討及び承認される。実験マウスを毎日モニタリングし、CO₂窒息によって安楽死させた後、苦痛の徴候が現れる前に頸椎脱臼を行った。

20

【0488】

バイオインフォマティクス及び統計解析

【0489】

TCGAデータは、NIH GDC (EBPlusPlusAdjustPANCAN_IlluminaHiSeq_RNASeqV2_geneExp.tsv)を介してアクセスした。リードカウントを正規化して、遺伝子発現の上位四分位数を1000に設定した。

【0490】

実験的反復(N)を図及び図の凡例に示す。特に明記しない限り、プロットされた値は、最低2回の別個の実験からの平均を表し、誤差はSEMである。統計学的有意性(p値)は、対応のないt検定又は多重比較による一元配置分散分析を用いて決定した。有意なp値は、*p<.05、**p<.01、***p<.001及び****p<.0001を示す1又は複数の「*」で標識される。マンテル・コックス統計検定を使用して、生存曲線間の有意性を決定した。P値は、これらの図の凡例及び補足に記載されている。

30

【0491】

実施例11：抗PD-1耐性細胞株及び一次耐性抗PD-1耐性細胞株に対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の有効性

TIGIT系及びLIGHT系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。「TIGIT-Fc-LIGHT」構築物は、IgG1由来のヒンジーCH2-CH3 Fcドメインを介してヒトLIGHTのECDに融合されたヒトTIGITの細胞外ドメイン(ECD)を含んだ。図10Aを参照されたい。

40

【0492】

構築物をチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞における発現のためにコドン最適化し、CHO細胞にトランスフェクトし、高発現のために個々のクローンを選択した。次いで、高発現クローンを、無血清培地中の攪拌バイオリアクターにおける小規模製造に使用し、関連するキメラ融合タンパク質をプロテインA結合樹脂カラムで精製した。

【0493】

TIGIT-Fc-LIGHT構築物をコドン最適化し、293個の細胞で一過性に発

50

現させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、還元剤又は脱グリコシル化剤による処理なしで、SDSの存在下で煮沸する）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、 β -メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸）及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、 β -メルカプトエタノールと脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。更に、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3連で泳動し、抗TIGIT抗体（図10B、左プロット）、抗Fc抗体（図10B、中央プロット）又は抗LIGHT抗体（図10B、右側プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、非還元レーン（図10B、各プロットにおけるレーンNR）に優勢な二量体バンドの存在を示し、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図10B、各プロットにおけるレーンR）。図10B、各プロットのレーンDGに示すように、キメラタンパク質は、還元剤（ β -メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約73 kDaの予測分子量でモノマーとして泳動した。

10

20

30

40

【0494】

TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、哺乳動物産生細胞株において単一の発現ベクターから合成され、アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製された二機能性Fc連結融合タンパク質である。以前に、サイズ排除クロマトグラフィー／多角度光散乱（SEC-MALS）及び電子顕微鏡法（EM）を使用して、このクラスのTNFリガンド含有融合タンパク質治療薬の構造を研究した。いくつかの場合、ジスルフィドは、中心Fcドメインの二量体化及びTNF-リガンドドメインの電荷に基づく三量体化を誘導し、理論に束縛されることを望むものではないが、溶液中で三量体の二量体を生じると考えられる。de Silva et al., CD40 Enhances Type I Interferon Responses Downstream of CD47 Blockade, Bridging Innate and Adaptive Immunity. Cancer Immunol Res 8:230-245 (2020); Fromm et al., Agonist redirected checkpoint, PD-1-Fc-OX40L, for cancer immunotherapy. J Immunother Cancer 6:149 (2018). TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、六量体構造を有すると予測された（図10A）。非還元SDS-PAGE下でのTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の分析により、約140 kDaのグリコシル化ジスルフィド結合二量体の存在が確認され（SDSはTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の電荷に基づく三量体化を中和する）、これは、 β -メルカプトエタノール及びPNGase-F（図10B）とのインキュベーション後に、59.3 kDaの予想分子量を有する脱グリコシル化モノマーに還元することができた。ヒトTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質構築物及びマウスTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質構築物の両方の3つのタンパク質ドメインは全て、ウエスタンブロットを介して市販の抗体によって認識された（図10B及び図24A）。

【0495】

融合タンパク質とそれらの同族結合パートナーとの間のタンパク質-タンパク質相互作用（PPI）を、組換えタンパク質及び細胞ベースの方法の両方を使用して特性決定した。最初に、バイオレイヤー干渉法に基づく親和性試験を使用して、受容体／リガンド結合の動態を評価した。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、3.52 nMの親和性で組換えヒトLT β Rに結合し（市販の組換えFc-LIGHT対照よりも約8倍大きい）、4.07 nMのヒトPVRに結合した（ヒトTIGIT-Fcと一致する）。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、Fc-LIGHT結合（2.12 nM）と同様に、6.49 nMでヒトHVEMに結合した（以下の表を参照のこと）。

【0496】

50

【表 2】

標的	分子	KD (nM)	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	R ²
rhLTβR	Fc-LIGHT	2.84E-08	2.66E+05	7.54E-03	.7412
rhLTβR	TIGIT-Fc-LIGHT	3.52E-09	2.12E+04	7.44E-05	.9992
rhHVEM	Fc-LIGHT	2.12E-09	4.10E+05	8.76E-04	.9679
rhHVEM	TIGIT-Fc-LIGHT	6.49E-09	2.61E+04	1.73E-04	.9942
rhPVR	TIGIT-Fc	5.24E-09	2.96E+05	1.54E-03	.9633
rhPVR	TIGIT-Fc-LIGHT	4.07E-09	2.53E+04	1.03E-04	.9984
rhCD112 (PVRL2)	TIGIT-Fc-LIGHT	3.00E-09	1.72E+05	4.71E-04	.7148
rhCD113 (PVRL3)	TIGIT-Fc-LIGHT	5.14E-09	1.30E+05	1.26E-03	.3389

10

【0497】

上記の表は、ヒトTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質又はFc-LIGHT及びTIGIT-Fc片面融合タンパク質対照の、組換えヒト(rh)LTβR、HVEM、PVR、PVRL2及びPVRL3に対するバイオレイヤー干渉法(Octet)結合動態を示す。

20

【0498】

PVRL2(CD112)、PVRL3(CD113)、及びネクチン-4を含む他のPVRリガンドファミリーメンバーへの結合を実証するために、バイオレイヤー干渉法とMeso Scale Discovery(MSD)アッセイの組み合わせを開発した(上記の表及び図24Bを参照されたい)。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のその受容体への結合を、Meso Scale Discovery(MSD)ELISAアッセイによって特性決定した。簡潔には、LTβR-Fcをプレートにコーティングし、プレートに結合したLTβR-Fcによる捕捉のために、漸増量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質をプレートに添加した。LTβR-Fcへのキメラタンパク質の結合を、PVR-ビオチンを使用し、電気化学発光(ECL)読出しを使用して検出した。図10Cに示されるように、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、LTβR-Fc及びPVRの両方に結合した。HVEM-Fcをプレートにコーティングし、プレートに結合したHVEM-Fcによる捕捉のために、漸増量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質をプレートに添加した。HVEM-Fcへのキメラタンパク質の結合を、PVR-ビオチンを使用し、電気化学発光(ECL)読出しを使用して検出した。図10Cに示されるように、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、HVEM-Fc及びPVRの両方に結合した。抗TIGIT抗体をプレートにコーティングし、プレートに結合した抗TIGIT抗体による捕捉のために漸増量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質をプレートに添加した。抗TIGIT抗体へのキメラタンパク質の結合を、抗LIGHT抗体を使用し、電気化学発光(ECL)読出しを使用して検出した。図10Cに示されるように、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、抗TIGIT抗体及び抗LIGHT抗体の両方に結合した。これらの結果は、用量依存的で飽和性の結合を示した。したがって、図10Cは、チェックポイント標的(PVR)並びに骨髄細胞、CD8+T細胞及びNK細胞(LTβR及びHVEM)上に見出される免疫共刺激受容体に対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の同時結合を実証する。

30

40

【0499】

50

M S Dを使用して、個々の標的への結合、並びにP V R及びH V E Mの両方へのヒトT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質の同時結合（28．31 n MのE C₅₀）又はP V R及びL T β Rへの結合（85．99 n MのE C₅₀）を評価し、融合タンパク質全体がインタクトであり、その標的に係合することができることを示す（図10 C）。L I G H Tは可溶性デコイ受容体3（D c R 3）にも結合することができ、これは特定の自己炎症性疾患で上昇し得る。がん患者の可溶性血清D c R 3がT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質のL I G H Tドメインを妨害するのに十分なレベルに達するかどうかを評価するために、D c R 3の濃度を健康なヒトドナー血清試料及びがん性ヒトドナー血清試料の範囲で定量した。ほとんどの血清試料において、D c R 3レベルは、アッセイの定量上限（>15，000 p g／m L）を超えた前立腺がん試料を除いて、2，000 p g／m L以下であった。T I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質を各血清試料中でブレインキュベートした全ての場合において、D c R 3のこれらのレベルは、二重H V E M／P V R効力アッセイにおいてT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質結合を妨害するのに十分ではなかった（図24 C）。

10

【0500】

細胞表面結合アッセイを、ヒトP V R又はH V E Mを安定に発現するように操作されたC H O－K 1細胞を使用して、細胞膜で発現されるそれらの標的へのヒト及びマウスの両方の融合タンパク質の結合を特徴付けるために開発した。フローサイトメトリー分析は、ヒトT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質が細胞表面P V R（E C₅₀=35．42 n M）、細胞表面L T β R（E C₅₀=87．12 n M）及び細胞表面H V E M（E C₅₀=65．77 n M）に結合することを実証した（図10 D）。更に、マウスT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質は、E L I S Aを使用してその標的に用量依存的に結合し、野生型C T 26（C T 26／W T）、C P I獲得耐性C T 26（C T 26／A R）及びB 16．F 10腫瘍細胞（図24 D～図24 E）に結合することが示された。したがって、これらの3つの前臨床同系マウス腫瘍モデルは、マウスT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質で処置した場合、抗腫瘍有効性の評価に関連する。

20

【0501】

T I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質活性を示すために、追加の細胞ベースの機能アッセイを利用した。第1に、高レベルのL T β R（図10 E）を発現するヒト骨肉腫細胞株U 2 O Sを使用したN I K依存性非カノニカルN F k Bシグナル伝達アッセイを用いて、T I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質のL I G H Tドメインの活性を試験した。T I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質で処理すると、市販の組換えF c－L I G H Tで生成されたレベルよりも有意に高いレベルで生物発光が検出された（図10 E）。第2に、T I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質は、抗原依存的にH V E Mを介してC D 8＋T細胞に共刺激を提供すると予想される。これを評価するために、ヒトP B M C又はマウス脾細胞をS E B及びヒトT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質又はマウスT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質のいずれかと共にそれぞれ3日間培養したブドウ球菌エンテロトキシンB（S t a p h y l o c o c c a l e n t e r o t o x i n B：S E B）超抗原アッセイを使用した。次いで、I L－2分泌を培養培地中で評価し、ヒト及びマウスT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質が適応サイトカインの産生を誘導できることを示した（図10 F）。第3に、C D 8＋T細胞及びN K細胞の表面上のH V E MへのL I G H Tのライゲーションは、標的腫瘍細胞の死滅を促進すると予測される。単離されたマウスTエフェクター細胞又はN Kエフェクター細胞を、蛍光活性化切断型カスパーゼ3／7レポーターの存在下でC T 26腫瘍細胞と共培養した。マウスT I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質の添加は、標的腫瘍細胞におけるカスパーゼ活性の増加を刺激し、とりわけ、T I G I T－F c－L I G H Tキメラタンパク質が培養中のエフェクター細胞の細胞傷害能を能動的に増加させたことを示した（図24 F）。第4に、ヒト黒色腫細胞株A 3 7 5は、L I G H Tによる刺激後のI L－8関連遺伝子のL T β R依存的産生を介して、L I G H T／L T β Rシグナル伝達のための直接的な機能的読出しとして使用されている。H e h l g a n s 及

30

40

50

びMannel組換え可溶性LIGHT(HVEMリガンド)は、A375黒色腫細胞においてIL-8分泌の増加及び増殖停止を誘導する。J Interferon Cytokine Res 21:333-338(2001)。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質又は市販のLTβRアゴニスト抗体をA375細胞と共に培養した場合、CXCL8(IL-8をコードする遺伝子)及びCCL2は、抗LTβR対照抗体と比較して、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の方が有意に大きい大きさで、3時間以内に有意に上方制御された(図24G)。最後に、市販のTIGIT/DNAM-1レポーター系を利用して、エフェクターリンパ球のHVEM共刺激がDNAM-1への冗長なシグナル伝達経路を利用したかどうかを決定した。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のTIGITドメインはPVRに結合するので、この相互作用は、PVRがDNAM-1と相互作用する能力を競合的に阻害する。したがって、DNAM-1媒介共刺激は、TIGITの細胞外ドメインを含む組換え構築物で阻害されると予想される。このアッセイでは、TIGIT及びDNAM-1発現Jurkat T細胞(エフェクター)を、PVR発現CHO-K1細胞と共培養した。エフェクター細胞はまた、T細胞受容体(TCR)及びDNAM-1共刺激の両方に応答するルシフェラーゼレポーターを含有する。このアッセイで使用したエフェクター細胞はJurkat T細胞であったため、これらの細胞がヒトHVEMを内因的に発現することが確認された(図10G)。CHO-K1レポーター細胞では、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、LIGHTによる直接HVEM共刺激によるDNAM-1共刺激を迂回することができた(図10H)。DNAM-1遮断抗体対照は、予想通り、アッセイにおいてシグナルレポーターの蛍光を減少させることが示された。対照的に、これらの細胞とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質とのインキュベーションは、シグナル蛍光の有意な増加をもたらし、これは、LIGHTブロッキング抗体で完全に阻害され得るため、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のLIGHTドメインに特異的であることが確認された(図10H)。

10

20

【0502】

LTβRの発現は、固形腫瘍組織内及び特に骨髓細胞(図13A~図13G)の両方で観察され、とりわけ、LIGHTがFcγ受容体の関与を介して報告されているものと同様の様式で骨髓細胞活性化を提供し得ることを示している。これを更に試験するために、ヒトTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の天然IgG1及びエフェクターFcγRサイレントIgG4変異体、TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHTキメラタンパク質を生成した。TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHTキメラタンパク質は、エフェクターFcγ受容体に係合する能力を含む、TIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質変異体と同様の構造的特徴を有することが示された(図25A~図25C)。IgG1及びIgG4変異体をヒトPBMCと共に培養し、1週間後、両方の融合タンパク質は、細胞培養プレートへの細胞の接着を誘導し、骨髓細胞活性化と一致する形態への分化を誘導し、有意な増殖を刺激した(図14A~図14B)。実際、ヒトPBMCの骨髓分化に対するTIGIT-Fc(IgG1)-LIGHTキメラタンパク質及びTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質の両方の明確な形態学的影響は、培養のわずか2日後に明らかであった(図25B)。TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHTキメラタンパク質及びTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質の両方もまた、エフェクター(IFNγ)及び骨髓特異的(IL-8、IL12/p70及びCXCL12)サイトカインの両方を誘導した(図14C)。IgG1融合タンパク質とIgG4融合タンパク質との間で、細胞形態、増殖の大きさ、及びサイトカイン誘導に対する有意な影響は見られなかった(図14A~図14C)。サイトカイン応答を、単独で、及び抗PD-1抗体ペンブロリズマブと組み合わせて、市販のFcコンピテントIgG1 TIGIT抗体で処理したPBMCにおいて評価した。興味深いことに、これらの研究では、IFNγ及びIL-8の小さな誘導のみが観察されたが、これらは対照処理培養物と有意に異ならなかった(図25D)。

30

40

【0503】

50

TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の免疫刺激活性及びIgG1変異体とIgG4変異体との間の潜在的な機能的差異を更に評価するために、ヒトPBMC培養物の刺激の2日後に単細胞RNA配列決定を実施した。TIGIT、HVEM、LTβR、DNAM1及び全てのPVRリガンドを発現する細胞の分布を、UMAP(図25E)を使用して可視化した。示差的に発現した遺伝子(DEG)を、TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHT及びTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質変異体の両方と未処理対照との間で、同定された16個全てのSeuratクラスターにわたって同定した(図14D)。骨髓系細胞、NK細胞及びCD8+T細胞に関連するクラスターにわたるDEGには、CCL3、ITGAX(CD11cをコードする遺伝子)、CXCL8、CD68、CD74(HLA-DRをコードする遺伝子)、B2M、IL32、CD7、JUNB、IER2及びCXCR4(図14E及び図25F)が含まれた。骨髓活性化遺伝子の上方制御は、TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHT又はTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTバージョンのいずれかによる処置後のクラスター6集団(LTβRの発現が高いクラスター、図13F参照)における拡大を伴っていた(図14F)。NK集団(図14D~図14Eのクラスター7、10、及び11に見られる)は穏やかに増加し、CD8+T細胞(クラスター5及び8、T細胞支持性サイトカインは培養物に添加されなかったことに留意されたい)のわずかな減少にもかかわらず、T細胞及び適応免疫活性化に関連する遺伝子は上方制御された(図14F)。骨髓系細胞、NK細胞及びCD8+T細胞クラスターに関連するDEGに関する遺伝子オンロジー経路分析は、TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHT又はTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質の両方が、ある範囲の免疫細胞画分にわたって広範な免疫細胞活性化を刺激したことを確認した(図14G)。興味深いことに、全てのSeuratクラスターにわたって評価された全てのDEGのうち、TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHT又はTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質間で示差的に発現される遺伝子は合計で2つのみであることが分かった(図25G)。まとめると、これらの結果は、とりわけ、FcγR結合又は非結合Fcドメインの選択によって更に影響を受けなかった、LIGHTによる直接的な骨髓細胞活性化の証拠を提供した。

10

20

30

40

50

【0504】

TIGIT-Fc(IgG1)-LIGHT及びTIGIT-Fc(IgG4)-LIGHTキメラタンパク質で処置したマウスのヒトPBMCから単離した骨髓細胞の変化を、未処置マウスと比較して評価した。具体的には、HLA-DRB1m HLA-DRB、CD80、CD86、CD40又はB2M発現細胞を評価した。図14Hに示されるように、誘導は、Fcコンピテントマウス抗体で観察されたものよりも大きい(例えば、Han, et al., Effective Anti-tumor Response by TIGIT Blockade Associated With FcγR Engagement and Myeloid Cell Activation Frontiers in Immunology 11:573405(2020)を参照のこと)。これらの結果は、理論に束縛されるものではないが、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質が、LIGHT:LTβR相互作用を介して骨髓細胞を活性化し、Fcドメインの組成に依存しないことを示唆する。

【0505】

マウスTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質(mTIGIT-Fc-LIGHT)のインビボ抗腫瘍活性を、結腸直腸がん(CT26/WT)及び黒色腫(B16.F10)のモデルにおいて評価した。両方とも、CPIに対して感受性(CT26/WT)又は非感受性(B16.F10)のモデルとして広く使用されている。B16.F10モデルは、抗PD-1/L1遮断に対する一次耐性を模倣するために使用され得る。

【0506】

BALB/cマウスの後側腹部にCT26/WT腫瘍を接種し、平均開始腫瘍体積(STV)が約84mm³に達したとき、マウスを無作為化し、mTIGIT-Fc-LIGHT又はベンチマーク抗体(図12A)で処置した。mTIGIT-Fc-LIGHTは

腫瘍成長を有意に遅延させ、初期処置後、融合タンパク質処置群が腫瘍負荷量に達した平均日は、ビヒクル対照群の15日目（+／－3.01日目）と比較して、初期処置後28日目（+／－6.87日目）であった（図12C）。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質活性を、マウスTIGIT、PD-1、PD-L1、LT β R、Fc-LIGHT融合タンパク質、及び以下の表に示すこれらの剤の組み合わせを標的とする抗体の活性と比較した。

【0507】

【表3】

標的	クローン	用量(ug)	スケジュール
抗-TIGIT	1G9	100	0、3、6日目
抗-PD-1	RMP1-14	100	0、3、6日目
抗-PD-L1	10F.9G2	100	0、3、6日目
抗-LT β R	4H8 WH2	100	0、3、6日目
Fc-LIGHT	-	100	0、3、6日目
TIGIT-Fc-LIGHT	-	200	0、3、6日目

10

20

【0508】

上記の表は、CT26WT腫瘍有効性実験のための試験剤、用量及びスケジュールを示す。

【0509】

30

40

50

【表 4】

群	試料サイズ (n)	拒絶
ビヒクル	31	0
抗-PD-1	30	4
抗-PD-L1	23	2
抗-TIGIT	19	0
Fc-LIGHT	13	0
抗-TIGIT + Fc-LIGHT	13	0
抗-TIGIT + 抗-PD-1	13	0
抗-TIGIT + 抗-PD-L1	13	0
抗-TIGIT + Fc-LIGHT + 抗-PD-1	13	1
抗-TIGIT + Fc-LIGHT + 抗-PD-L1	13	3
TIGIT-Fc-LIGHT	31	3
TIGIT-Fc-LIGHT + 抗-PD-1	22	9
TIGIT-Fc-LIGHT + 抗-PDL1	22	9
抗-LTβR	5	0

10

20

30

【0510】

上記の表は、CT26WT腫瘍有効性実験のための試験剤、用量及びスケジュールを示す。

【0511】

唯一市販されている抗TIGIT（クローン1G9）は、エフェクターサイレントマウスIgG1であり、単剤療法として依然として中程度の活性を示し、腫瘍負荷までの時間を18日目（+/-4.38日）まで増加させる。Fc-LIGHT単独では腫瘍負荷までの時間が20日目（+/-1.92日目）まで遅延したが、抗TIGITとの組み合わせはこれを更に延長することができず、理論に拘束されることを望まないが、抗腫瘍活性の大部分がLIGHTに由来することを示唆した。マウスTIGIT-Fc-LIGHTは、抗TIGIT及びFc-LIGHTの別々の投与よりも生存を有意に改善し、これらの阻害シグナル及び共刺激シグナルの共局在化が抗腫瘍効果を最大化するために重要であることを示している（図12D、図26A、及び以下の表）。

40

【0512】

50

【表 5】

群	コンパレータ	マンデル・スコックス p 値
ビヒクル vs.	抗-PD-1	<0.0001
	抗-PD-L1	<0.0001
	抗-TIGIT	0.0135
	Fc-LIGHT	<0.0001
	抗-LT β R	0.419
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT	<0.0001
	抗-TIGIT+抗-PD-1	<0.0001
	抗-TIGIT+抗-PD-L1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	TIGIT-Fc-LIGHT	0.3647
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	0.1886
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	TIGIT-Fc-LIGHT	0.1025
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	0.4262
Fc-LIGHT	抗-LT β R	<0.0001

【0513】

上記の表は、CT26WT腫瘍有効性実験の生存統計を示す。

【0514】

市販のLT β R抗体（クローン4H8 WH2）を評価したが、CT26/WTモデルではいずれの活性も示さなかった（図26B）。有望なことに、mTIGIT-Fc-LIGHT単剤療法は、処置動物の12.9%において完全な腫瘍退縮を誘導した。

【0515】

原発腫瘍を拒絶した個々のマウスに、その後の再処置なしに、反対側の後側腹部にCT26/WT腫瘍細胞の2回目の接種を29日目に再チャレンジした。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質による最初の処置経過後に完全な腫瘍拒絶を有することが観察されたマウスは、二次腫瘍の進行を防ぐ防御免疫を有することが分かった（図26C）。最初にTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処置した6匹のマウス及び抗PD-L1単剤療法で処置した3匹のマウスを含むこれらの動物から、末梢血を39日目に単離した（29日目の再チャレンジの10日後）。二重陽性エフェクターメモリー細胞の比較レベル（全CD8⁺PBMCのうちのCD127⁺KLRG1⁺）をこれらのマウ

スにおいて評価し、この細胞集団は、最初にTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（図26D）で処置した動物において有意に拡大していることが分かった。TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の初期抗腫瘍活性は、CD25+及びFOXP3+CD4調節性T細胞の枯渇と共に、IFN γ +NK細胞、抗原特異的CD8+T細胞及びCD86+樹状細胞の腫瘍浸潤の増加に関連していた（図26E）。興味深いことに、FOXP3レベルはまた、ヒトTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のIgG1変異体及びIgG4変異体の両方による処置後のヒトPBMCにおいて、具体的には、制御性T細胞についてのImmuneExp定義のアノテーションにおいて下方制御されることが観察された（図25F）。更に、これらのマウス試験では、解離した腫瘍組織から生成された上清を使用して、腫瘍環境において一連のエフェクター及び骨髄特異的サイトカインを評価した。IL-2、TNF α 、CCL3、CCL4、IL-12（p70）及びCCL2の腫瘍レベルの上昇が、mTIGIT-Fc-LIGHT処置動物の腫瘍微小環境内で見出された（図26F）。抗TIGITとFc-LIGHT及び抗PD-1又は抗PD-L1のいずれかとの組み合わせは、ベンチマーク対照群の最大活性をもたらし、腫瘍負荷量は31（+/-3.75日）及び32（+/-3.82日）に押し上げられ、処置動物のそれぞれ7.7%及び23.1%で完全な腫瘍拒絶が生じた（図12C）。mTIGIT-Fc-LIGHTと抗PD-1又は抗PD-L1のいずれかとの組み合わせも有効性を有意に改善し、腫瘍負荷は33日目（+/-それぞれ4.94又は4.64日）に達した。完全な腫瘍拒絶が、抗PD-1と抗PD-L1の両方の組み合わせについて40.9%の動物において観察された。

10

20

【0516】

マウスTIGIT-Fc-LIGHTはまた、B16.F10黒色腫において単剤療法活性を示し、腫瘍負荷量に達する平均時間は、ビヒクル対照群の10（+/-2.00）日、及び抗TIGIT+Fc-LIGHT併用群の14（+/-2.27）日と比較して、19（+/-4.47）日であった（図12A、図12E、及び以下の表）。

【0517】

【表6】

標的	クローン	用量（ug）	スケジュール
抗-TIGIT	1G9	100	0,3,6日目
抗-PD-1	RMP1-14	100	0,3,6日目
抗-PD-L1	10F.9G2	100	0,3,6日目
Fc-LIGHT	-	100	0,3,6日目
TIGIT-Fc-LIGHT	-	200	0,3,6日目

30

【0518】

上記の表は、B16.F10腫瘍有効性実験の試験剤、用量及びスケジュールを示す。

【0519】

40

【表 7】

群	試料サイズ (n)	拒絶
ビヒクル	17	0
抗-TIGIT	14	0
抗-PD-1	14	0
抗-PD-L1	14	0
Fc-LIGHT	8	0
抗-TIGIT+Fc-LIGHT	8	0
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	8	0
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	8	0
抗-TIGIT+抗-PD-1	8	0
抗-TIGIT+抗-PD-L1	8	0
TIGIT-Fc-LIGHT	16	0
TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	17	0
TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	17	1

10

20

【0520】

上記の表は、B16.F10腫瘍有効性実験において原発腫瘍を完全に拒絶した動物の群試料サイズ及び数を示す。

【0521】

抗TIGIT、Fc-LIGHT及び抗PD-1又は抗PD-L1のいずれかのトリプレットの組み合わせは、中間の利益を提供し、腫瘍増殖を18日（それぞれ+/-3.02又は2.56日）まで遅延させた。mTIGIT-Fc-LIGHTと抗PD-1又は抗PD-L1との組み合わせは、有効性及び生存を更に改善し（それぞれ24（+/-4.85）及び26（+/-4.02）日目）、抗PD-L1との組み合わせは、1匹の動物において完全な腫瘍拒絶を誘導した。これらの所見は、侵襲性腫瘍タイプ及び平均>110mm³の開始腫瘍体積（図12E、図12F、図26G、及び以下の表）を考慮すると有意である。

30

【0522】

40

50

【表 8】

群	コンパレータ	マンデル・スコ クス p 値
ビヒクル vs.	抗-PD-1	0.0004
	抗-PD-L1	0.0005
	抗-TIGIT	0.1859
	Fc-LIGHT	0.0059
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT	0.0019
	抗-TIGIT+抗-PD-1	<0.0001
	抗-TIGIT+抗-PD-L1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	0.0046
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	0.0021
	TIGIT-Fc-LIGHT	0.0004
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	TIGIT-Fc-LIGHT	0.3936
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	0.0041
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	TIGIT-Fc-LIGHT	0.3688
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001

【0523】

上記の表は、B16.F10腫瘍有効性実験の生存統計を示す。

【0524】

B16.F10モデルでは、抗腫瘍活性に対する免疫細胞サブセットの寄与を評価した。マウスのコホートを、CD4、CD8、又はNK枯渇抗体で時間経過の－1日目、1日目、及び7日目に処置し、細胞枯渇をフローサイトメトリーによって確認した（図12A、図12H、及び図26H）。CD4細胞の枯渇はmTIGIT-Fc-LIGHT活性に影響を及ぼさなかったが、CD8細胞又はNK細胞の枯渇は、TIGIT及びHVEMの発現パターンと一致して、腫瘍増殖制御を部分的に減少させた（図12H）。CD8枯渇もNK枯渇も抗腫瘍応答を完全に無効にしなかったという事実は、理論に拘束されることを望まないが、CD8+T細胞とNK細胞の両方がTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の抗腫瘍活性に独立して寄与し、それにもかかわらず両方の細胞集団が存在する場合に増強されたことを示唆した。

【0525】

TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の抗腫瘍活性の効果を評価するために、マウスの後側腹部に結腸直腸腫瘍CT26細胞、CT26抗PD-1耐性細胞（獲得耐性）又はB16.F10黒色腫瘍（初期耐性）を接種した。マウスを無作為に以下の処置群に分けた：（1）ビヒクル単独、（2）抗PD-1抗体（クローンRMP1-14）の用量当たり100μg、（3）抗PD-L1抗体（クローン10F.9G2）の用量当たり100μg、（4）TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質、抗PD-L1

抗体の用量当たり200 μ g、(5)抗PD-1抗体の用量当たり100 μ g + TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200 μ g、及び(6)抗PD-L1抗体の用量当たり100 μ g + TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200 μ g。マウスに、腹腔内注射による腫瘍接種後0日目、3日目、及び6日目に投薬した。腫瘍サイズを、B16.F10モデルでは腫瘍接種後11日目に、CT26及びCT26抗PD-1耐性モデルでは腫瘍接種後14日目に測定した。ビヒクル単独処置マウスと比較した腫瘍成長阻害を計算し、プロットした。

【0526】

図11(左パネル)に示すように、各処置はCT26腫瘍の腫瘍増殖阻害をもたらした。抗PD-1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との併用処置は、抗PD-1抗体のみによる処置($p=0.0027$)並びにTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質のみによる処置($p=0.0264$)と比較して、有意に高い腫瘍増殖阻害を示した(図11左パネル)。同様の実験では、開始時の平均腫瘍サイズが86.6 mm^3 に達したときに同一の処置を開始し、全生存率を測定し、プロットした。図12Aは、個々の動物腫瘍成長曲線、各群が腫瘍負荷量に達した平均日、及び処置に応答して腫瘍を完全に拒絶したマウスの数を示す。図12B(左パネル)に示すように、観察された腫瘍増殖阻害と一致して、各処置は、ビヒクル処置マウスと比較してカプラン・マイヤー曲線に示すように、マウスの生存率の増加をもたらした。抗PD-1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との併用処置は、Kaplan-Meier曲線に示されるように、抗PD-1抗体単独での処置と比較して有意に高い生存率($p=0.0238$)を示し、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独での処置と比較してより高い生存率($p=0.1445$)を示した(図12B左パネル)。

【0527】

同様の分析を、CT26抗PD-1耐性細胞同種移植モデルを用いて行った。図11(中央パネル)に示されるように、抗PD-1抗体による処置を除いて、各処置は、CT26抗PD-1耐性腫瘍の腫瘍増殖阻害をもたらした。興味深いことに、抗PD-1抗体及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質による併用処置は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独による処置と比較して有意に高い腫瘍増殖阻害を示した($p=0.032$)(図11、中央パネル)。これらのデータは、とりわけ、抗PD-1抗体単独での処置がCT26抗PD-1耐性腫瘍モデルにおいて有効でなかったのも、驚くべきものである(図11、中央パネル)。抗PD-1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との併用処置もまた、抗PD-L1抗体単独での処置と比較して有意に高い腫瘍増殖阻害を示した($p=0.014$)(図11、中央パネル)。同様の実験では、開始時の平均腫瘍サイズが89.49 mm^3 に達したときに処置を開始した。全生存を測定し、プロットした。図12B(中央パネル)に示されるように、抗PD-1抗体単独による処置は、CT26抗PD-1耐性腫瘍モデルにおいて、存在するとしても、生存率の改善をほとんど引き起こさず、腫瘍成長阻害の観察された欠如と一致した。抗PD-L1抗体単独での処置は、ビヒクル処置マウスと比較してカプラン・マイヤー曲線に示されるように、CT26抗PD-1耐性腫瘍モデルにおいて生存のいくつかの改善を引き起こした(図12B、中央パネル)。興味深いことに、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と抗PD-1抗体との併用処置は、Kaplan-Meier曲線に示されるように、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独での処置と比較して生存率の改善を示した($p=0.1672$)(図12B、中央パネル)。同様に、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と抗PD-L1抗体との併用処置は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独による処置と比較して有意に改善された生存を示した($p=0.0443$)(図12B、中央パネル)。これらのデータは、とりわけ、抗PD-1抗体単独での処置がCT26抗PD-1耐性腫瘍モデルにおいて有効ではなく(図11、中央パネル; 図12B、中央パネル)、抗PD-1抗体と組み合わせた場合のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の有意に改善された有効性は予想されなかったであろうから、驚くべきものである。

【0528】

B16、F10細胞同種移植モデルを用いて同様の分析を行った。図11（右パネル）に示すように、抗PD-L1抗体単独又は抗PD-L1抗体単独での処置では、腫瘍増殖抑制の改善は非常に小さかった。対照的に、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独による処置は、抗PD-L1抗体単独又はB16、F10細胞同種移植モデルにおいて抗PD-L1抗体単独と比較して、腫瘍増殖阻害のより大きな改善を引き起こした。興味深いことに、抗PD-L1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との併用処置は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独（ $p=0.0353$ ）又は抗PD-L1抗体単独（ $p<0.0001$ ）による処置と比較して、B16、F10細胞同種移植モデルにおいて有意に高い腫瘍増殖阻害を示した（図11、右パネル）。抗PD-L1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との併用処置もまた、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独による処置と比較して、B16、F10細胞同種移植モデルにおいてより高い腫瘍増殖阻害を示した（図11、右パネル）。同様の実験では、開始時の平均腫瘍サイズが 99.03 mm^3 に達したときに処置を開始した。全生存を測定し、プロットした。図12B（右パネル）に示されるように、抗PD-L1抗体単独又は抗PD-L1抗体単独による処置は、B16、F10腫瘍モデルにおいて、観察された小さい腫瘍成長阻害と一致して、生存におけるわずかな改善を引き起こした。興味深いことに、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質及び抗PD-L1抗体による併用処置は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独による処置と比較して有意に改善された生存を示した（ $p=0.0031$ ）（図12B右パネル）。同様に、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と抗PD-L1抗体との併用処置は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単独での処置と比較して生存率の改善を示した（ $p=0.2268$ ）（図12B右パネル）。これらのデータは、とりわけ、抗PD-L1抗体又はPD-L1抗体単独での処置がB16、F10腫瘍モデルにおいて有効ではなく（図11右パネル；図12B右パネル）、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と組み合わせた場合に有意に改善された有効性は予想されなかったであろうから、驚くべきものである。

【0529】

チェックポイント阻害剤獲得耐性の前臨床モデルを生成し、特性決定した。このモデルは、PD-L1/L1獲得耐性NSCLC患者において観察された特徴の多くを反映している。このモデルは、確立されたCT26/WT腫瘍を有するマウスを抗PD-L1抗体で処置し、処置後に部分的に制御されたが拒絶されなかった腫瘍を切除することによって開発された。切除された腫瘍を解離させ、エキスビボで増殖させ、抗PD-L1抗体による反復処置のために新しいレシピエントマウスに再接種した。この手順をインビボで5回連続反復して、いずれのマウスもPD-L1遮断の利益を示さなくなるまで、継続的な抗PD-L1選択圧を提供した。得られた腫瘍をCT26/AR（獲得耐性）と命名した。CT26/AR腫瘍及びPD-L1/L1抗体獲得耐性NSCLC患者から単離された腫瘍のトランスクリプトームの比較を比べ、JAK/STAT及びIFNシグナル伝達経路において同様の摂動を共有することが見出された。したがって、CT26/ARモデルは、PD-L1/L1耐性の状況における新規治療薬の潜在的な抗腫瘍活性を評価するための有用なツールであり得る。

【0530】

マウスTIGIT-Fc-LIGHTを、以前に提示されたベンチマークコントロール処置群と共に、レシピエントマウスにおいて 100 mm^3 超の開始腫瘍体積に達した後でCT26/AR腫瘍において評価した（図12A及び以下の表）。

【0531】

10

20

30

40

50

【表 9】

標的	クローン	用量 (u g)	スケジュール
抗-TIGIT	1G9	100	0、3、6日目
抗-PD-1	RMP1-14	100	0、3、6日目
抗-PD-L1	10F.9G2	100	0、3、6日目
Fc-LIGHT	-	100	0、3、6日目
TIGIT-Fc-LIGHT	-	200	0、3、6日目

10

【0532】

上記の表は、CT26AR腫瘍有効性実験のための試験剤、用量及びスケジュールを示す。

【0533】

【表 10】

群	試料サイズ (n)	拒絶
ビヒクル	24	0
抗-PD-1	23	0
抗-PD-L1	23	0
抗-TIGIT	14	0
Fc-LIGHT	13	0
抗-TIGIT+Fc-LIGHT	13	0
抗-TIGIT+抗-PD-1	13	0
抗-TIGIT+抗-PD-L1	13	0
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	13	0
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	13	0
TIGIT-Fc-LIGHT	22	1
TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	22	2
TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	22	4

20

30

【0534】

上記の表は、CT26AR腫瘍有効性実験において原発腫瘍を完全に拒絶した動物の群試料サイズ及び数を示す。

【0535】

平均して、CT26/AR腫瘍は、それらのCT26/WT対応物よりも迅速にインビボで増殖し、ビヒクル処置動物は、処置開始後平均14(+/-3.02)日で腫瘍負荷量に達した(図12I)。抗TIGIT又は抗PD-1による処置は腫瘍増殖を感知できるほどに遅延させなかったが、Fc-LIGHT及び抗PD-L1は腫瘍負荷をそれぞれ17(+/-3.38)日及び19(+/-5.07)日遅延させた。Fc-LIGHTの適度な単剤療法活性はまた、理論に拘束されることを望まないが、HVEM及び/又はLTβRを介したLIGHTシグナル伝達がPD-1とは独立して機能し、単剤療法抗TIGIT処置とは異なることを示唆した(図12I)。これらの線に沿って、HVEMとDNAM-1との間の細胞質アミノ酸配列のアラインメントは、最小限の相同性を同定し、それにより、HVEMは、PD-1のSHP-2ドメインによって脱リン酸化されることが報告されているDNAM-1に見出されるチロシン残基を欠いており、DNAM-1共刺激のPD-1阻害に関与する(図27B)。

40

【0536】

マウスTIGIT-Fc-LIGHT単剤療法は、抗TIGIT及びFc-LIGHT

50

の別個の投与と比較して、腫瘍負荷を24日目まで遅延させ（+／－6.05日間）、生存を有意に改善した（マンテル・コックスp値<0.0001；図12I－図12J、図27A、及び以下の表）。

【0537】

【表11】

群	コンパレータ	マンテル・コックスp値
ビヒクル vs.	抗-PD-1	0.0889
	抗-PD-L1	<0.0001
	抗-TIGIT	0.5928
	Fc-LIGHT	0.0062
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT	0.0053
	抗-TIGIT+抗-PD-1	0.0791
	抗-TIGIT+抗-PD-L1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	0.0557
	抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	0.0042
	TIGIT-Fc-LIGHT	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-1	TIGIT-Fc-LIGHT	0.0082
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-1	<0.0001
抗-TIGIT+Fc-LIGHT+抗-PD-L1	TIGIT-Fc-LIGHT	0.2502
	TIGIT-Fc-LIGHT+抗-PD-L1	<0.0001

【0538】

上記の表は、CT26AR腫瘍有効性実験の生存統計を示す。

【0539】

抗PD-1又は抗PD-L1とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の組み合わせは、腫瘍負荷を29日間（+／－5.95日間）及び31日間（+／－5.18日間）に遅延させ、それぞれマウスの9.1%及び18.2%において完全な腫瘍拒絶を誘導した。両方のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の組み合わせは、抗TIGIT、Fc-LIGHT、及び抗PD-1又は抗PD-L1のいずれかのトリプレットの組み合わせと比較して、生存を有意に改善した（図12J及び図27A）。興味深いことに、CT26/AR腫瘍は、CT26/WT腫瘍よりもCD8+T細胞浸潤がわずかに少なかったが、NK細胞のレベルは類似していた（図27C～図27D）。T細胞浸潤物を治療的に増強する能力はCT26/AR腫瘍において制約されていたが、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単剤療法は、依然として腫瘍内への抗原特異的CD8+T細胞を適度に増強した。更に、この腫瘍モデルにおいて、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と抗PD-L1との組み合わせは、エフェクターCD8+T細胞浸

潤の有意な増加をもたらし、これはCT26／WT腫瘍で観察されたレベルに匹敵した（図27C）。NK細胞は、CT26／ARモデルにおいて影響を受けにくいようであり、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質単剤療法及び抗PD-L1との組み合わせの両方が、NK細胞の有意な増加をもたらした（図27D）。これらの結果は、以前に記載された細胞枯渇研究（図12H）において同定された免疫細胞寄与と一致しており、とりわけ、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の広範な免疫刺激活性が、チェックポイント獲得耐性の状況において抗腫瘍免疫を増強し得ることを示唆している。

【0540】

これらの結果は、とりわけ、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質が、チェックポイント遮断に対する耐性に関係なく、がんに対して有効であることを実証している。更に、PD-1／PD-L1軸遮断の影響を受けやすいがんは、PD-1／PD-L1軸遮断薬とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との組み合わせで処置される。

10

【0541】

骨髄系細胞の活性化を評価するために、マウスTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（mTIGIT-Fc-LIGHT）を腫瘍を有するマウスにIV注射し、マウスTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質（mTIGIT-Fc-LIGHT）の用量を増加させてマウスに注射した。1日後に末梢血を抽出し、フローサイトメトリーを用いて細胞の免疫表現型決定を行った。

【0542】

20

図12Kに示されるように、200μg用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、CD8+細胞の数を減少させた。図12Lに示されるように、20μg、100μg、200μg及び300μg用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、活性化CD8+DNAM1+細胞の数を有意に減少させ、一方、図12Mに示されるように、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質はCD4+細胞の数を有意に変化させる。これらの結果は、末梢からのCD8+T細胞、具体的にはCD8+DNAM1+細胞の「マージネーション」を示唆しており、約10mg/kgのヒト等価用量である200μgの用量でピークに達する。

【0543】

図12Nに示されるように、100μg、200μg及び300μg用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、CD11+細胞の数を有意に増加させた。図12Oに示すように、100μg、200μg及び300μg用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、活性化CD11+CD80+細胞の数を有意に増加させた。同様に、図12Pに示されるように、100μg、200μg及び300μg用量のTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は、活性化CD11+CD86+細胞の数を有意に増加させた。これらの結果は、総CD11b+細胞及び活性化CD11b+細胞の増加を示唆し、200μgの用量でピークに達し、これは約10mg/kgのヒト等価用量である。

30

【0544】

実施例12：TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質は自然免疫と適応免疫の両方を活性化する

40

53個の免疫共刺激受容体の発現をTCGA腫瘍全体で評価した（図13A）。遺伝子を、全てのTCGA腫瘍にわたる各遺伝子の平均発現に基づいて、高いものから低いものへと順位付けした。進行腫瘍におけるDNAM-1発現の以前に記載された下方制御と一致して、本発明者らは、DNAM-1が最も豊富でない免疫共刺激薬の1つとしてランク付けされることを見出した（図13A）。腫瘍型にわたってより一貫した発現パターンを有する共刺激受容体の中で、ヘルペスウイルス侵入メディエーターA（HVEM、TNFRSF14）及びリンホトキシンβ受容体（LTβR、TNFRSF3）の両方が上位10の中にランク付けされ、DNAM-1と比較して有意に高い転写数を有した（図13A～図13B）。TNF受容体としてのHVEM及びLTβRの発現は、全てのTCGAが

50

んにわたって腫瘍で高度に発現し、上位10のHVEM及びLTBRを同定した(図13A)。HVEM及びLTβRは両方とも、LIGHT(TNFSF14(リンホトキシンに相同))は、誘導性発現を示し、Tリンパ球上に発現される受容体であるHVEMへの結合についてHSV糖タンパク質Dと競合する)として知られるTNFリガンドの受容体である。

【0545】

Tscm細胞上のHVEM及びDNAM-1の相対的発現を評価するために、以前に記載されたインビトロ分化プロトコルを使用した。Gattinoni et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat Med 17, 1290-1297 (2011). HVEM及びLTβRはLIGHTの受容体であるが、TIGITはDNAM-1の活性化効果に拮抗する。したがって、T幹細胞メモリー(Tscm)細胞上の発現HVEM及びDNAM-1を特性評価した。ナイーブCD8+細胞を健康なドナーのヒトPBMCから単離し、抗ヒトCD3/CD28ビーズ、IL-2及びGSK3β阻害剤と共に培養した。培養9日後、ナイーブCD8+T細胞(Tn)をTscm細胞から分離する抗体のパネルを使用して細胞を単離し、表現型解析した(図13C)。Gattinoni et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat Med 17, 1290-1297 (2011). HVEM発現を、CD3/CD28、IL-2及びGSK3β阻害剤で9日間誘導したT幹細胞メモリー(Tscm)細胞上のDNAM-1発現に関して特性決定した。HVEM及びDNAM-1の発現をアッセイした。したがって、Tn細胞の大部分がHVEMを発現する(74.1%がHVEMのみを発現し、21.8%がHVEM及びDNAM-1を共発現する)のに対して、Tnの1.15%のみがDNAM-1のみを発現することが見出された。最近の未発表の知見と一致して、Tscm細胞はそれらのTn対応物よりも多くのDNAM-1を発現したが、DNAM-1+細胞の大部分はHVEMも発現した(54.25%のうち45.5%)。更に、総Tscmの86.7%が高レベルのHVEMを発現した。このデータセットでは、HVEMはTscmを含む全てのT細胞集団で高度に発現したが、DNAM-1発現は異なるメモリーT細胞サブセット間で変動した(図13C及び図23A)。したがって、TNF受容体としてのHVEM及びDNAM-1は、ナイーブCD8+T細胞及びCD8+T幹細胞メモリー細胞上に高度に発現された。

【0546】

この分析を拡張し、免疫細胞上の共刺激シグナルの存在量を体系的に評価するために、単一細胞RNAシーケンシング(scRNA-seq)をヒトPBMCで行い、トランスクリプトームクラスタリング(Seurat)及び免疫細胞型予測(図13D)によって生物情報学的に定義された細胞集団を行った。上記で評価した53個の免疫共刺激遺伝子の発現も、16個のSeurat定義クラスターにわたって調査した(図13D)。遺伝子を、全てのクラスターにわたる各遺伝子の平均発現に基づいて、高いものから低いものへと順位付けした。TNFRSF14(HVEM)及びCD226(DNAM-1)は、このヒートマップにおいて上位にランク付けされ、これらが多くの免疫細胞において、特にCD8+T細胞に対応するクラスター5及び8並びにナチュラルキラー(NK)細胞を表すクラスター7、10及び11において高度に発現されたことを示している(図13E及び図13F)。Novershtern及びHPCA注釈もデータに適用し、同様の細胞型予測を生成した(図23B)。予想通り、LTBR発現は、骨髄細胞を表すクラスター6を除いて、ほとんどのPBMC集団において他のTNF受容体と比較して低かった(図13F)。

【0547】

自然免疫及び適応免疫に対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の効果を研究した。簡潔には、マウスに結腸直腸腫瘍CT26細胞又はCT26抗PD-1耐性細胞腫瘍を後側腹部に接種した。実験マウスのコホートは、腫瘍接種の14日後に人道的

に安楽死させ、腫瘍を切除し、解離させ、免疫浸潤物をフローサイトメトリーによって評価した。H V E M / D N A M 1 を発現する T 細胞及び N K 細胞を、切除した C T 2 6 又は C T 2 6 抗 P D - 1 耐性腫瘍からのフローサイトメトリーによって評価した。図 1 3 G に示すように、約 6 1 % である D N A M 1 + N K T I L と比較して、N K 腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の約 9 3 % が H V E M + であった。更に、5 8 % である D N A M 1 + C D 8 T T I L と比較して、C D 8 T T I L の約 9 5 % が H V E M + であった (図 1 3 G) 。これらの結果は、とりわけ、H V E M の発現が D N A M と比較して T I L においてより豊富であるが、自然免疫細胞と適応免疫細胞の両方が T I L の間に存在することを示唆している。

【 0 5 4 8 】

T I L 上の D N A M - 1 よりも H V E M の優先的発現が前臨床的に様々なマウス腫瘍タイプに変換されるかどうかを評価するために、マウスに C T 2 6 野生型 (C T 2 6 / W T) 、C T 2 6 C P I 獲得耐性 (C T 2 6 / A R) 、又は B 1 6 . F 1 0 腫瘍 (図 1 3 G) を接種した。腫瘍を確立させ、次いでマウスから単離し、解離させ、C D 8 + T 及び N K 細胞浸潤物をフローサイトメトリーによって評価した。3 つの腫瘍タイプ全てにおいて、H V E M は、D N A M - 1 よりも C D 8 + T 細胞及び N K 細胞の両方ではるかに広く発現されることが見出され、ヒト P B M C の所見と一致した (図 1 3 G) 。更に、H V E M は、マウス脾細胞から単離された T 細胞及び N K 細胞上に高レベルで発現されることが見出された (図 2 3 C) 。合わせて、これらの結果は、H V E M 及び L T β R を介して共刺激シグナル伝達を提供することができる治療候補の探索の理論的根拠を提供した。

【 0 5 4 9 】

免疫細胞に対する T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の効果を評価するために、ヒト P B M C を A I M V 培地中で T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の I g G 1 又は I g G 4 変異体と共に培養した。単一細胞 R N A - s e q を培養の 2 日後に実施し、高次元縮小アルゴリズム U n i f o r m M a n i f o l d A p p r o x i m a t i o n a n d P r o j e c t i o n (U M A P) で分析した。図 1 4 F に示すように、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質の I g G 1 又は I g G 4 変異体の両方が、未処理細胞と比べて同様の変化をもたらした。T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質誘導示差的発現遺伝子 (D E G) に関連する経路を、進化的関係 (P A N T H E R) によるタンパク質分析によって同定した。図 1 4 G に示すように、骨髓細胞機能に関連する 1 0 6 個の D E G が、未処理細胞と比べて、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質で処理した P B M C において上方制御された。骨髓細胞機能に関連する 1 3 0 個の D E G が、未処理細胞と比べて、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質で処理した P B M C では、下方制御された (図 1 4 G) 。N K 細胞機能に関連する 4 7 個の D E G が、未処理細胞と比べて、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質で処理した P B M C では、上方制御された (図 1 4 G) 。N K 細胞機能に関連する 1 7 個の D E G が、未処理細胞と比べて、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質で処理した P B M C では、下方制御された (図 1 4 G) 。C D 8 + T 細胞機能に関連する 3 7 個の D E G が、未処理細胞と比べて、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質で処理した P B M C では、上方制御された (図 1 4 G) 。C D 8 + T 細胞機能に関連する 1 2 個の D E G が、未処理細胞と比べて、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質で処理した P B M C では、下方制御された (図 1 4 G) 。これらの結果は、とりわけ、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質が、骨髓細胞、C D 8 + T 細胞又は N K 細胞に対応する細胞集団の機能に影響を及ぼすことを示した。S i n g l e R 及び I m m u n e E x p を使用して同様の結果が得られた (図 1 3 D) 。

【 0 5 5 0 】

T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質を含む P B M C の培養の 2 日後、M e s o S c a l e D i s c o v e r y (M S D) E L I S A アッセイを使用して、多数のサイトカインをアッセイした。図 1 4 C に示されるように、T I G I T - F c - L I G H T キメラタンパク質 (両方のバージョンが I g G 1 又は I g G 4 由来の F c ドメインを

10

20

30

40

50

含む)は、 $IFN\gamma$ 、 $IL-8$ 、 $IL-10$ 、 $IL-12/p70$ 及び $SDF1\alpha$ ($CXCL12$)を有意に誘導した。まとめると、これらの結果は、とりわけ、 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質が骨髄系細胞、 $CD8+T$ 細胞又は NK 細胞集団を刺激し、それらの細胞を誘導してサイトカインを産生させたことを示唆している。

【0551】

市販のPVR:DNAM1レポーターアッセイからのJurkatエフェクター細胞をHVEMの発現についてアッセイした。図14C(上のパネル)に示されるように、これらのJurkatエフェクター細胞もヒトHVEMを発現した。これらの細胞を、抗IgG4対照、抗DNAM-1抗体、 $Fc-LIGHT$ 片側タンパク質、又は $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質($LIGHT$ 遮断あり又はなし)と共にインキュベートした。興味深いことに、これらの細胞のバックグラウンド生物発光は、抗DNAM-1抗体(図14C)によって阻害され、DNAM-1共刺激の役割を示した。図14C(下のパネル)に示されるように、Jurkatエフェクター細胞は、 $LIGHT-Fc$ タンパク質又は $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質とインキュベートした場合、生物発光によってアッセイされるように活性化を示した。 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質は、 $Fc-LIGHT$ タンパク質と比較してより多くの生物発光をもたらした(図14C)。しかしながら、 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質によって生成された生物発光は、 $LIGHT$ 抗体遮断によって遮断された(図14C)。これらのデータは、理論に拘束されることを望まないが、 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質が、とりわけ、DNAM-1共刺激の必要性を回避し、HVEMを介して下流シグナル伝達を直接活性化することを示唆した。

【0552】

抗PD-1の効果を評価するために、自然免疫及び適応免疫に対する抗PD-L1及び $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質を次に研究した。簡潔には、マウスに結腸直腸腫瘍CT26細胞又はCT26抗PD-1耐性細胞を後側腹部に接種した。マウスを無作為に以下の処置群に分けた:(1)ビヒクル単独、(2)抗PD-1抗体(クローンRMP1-14)の用量当たり $100\mu g$ 、(3)抗PD-L1抗体(クローン10F.9G2)の用量当たり $100\mu g$ 、(4) $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質、抗PD-L1抗体の用量当たり $200\mu g$ 、(5)抗PD-1抗体の用量当たり $100\mu g$ + $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質の用量当たり $200\mu g$ 、及び(6)抗PD-L1抗体の用量当たり $100\mu g$ + $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質の用量当たり $200\mu g$ 。マウスに、腹腔内注射による腫瘍接種後0日目、3日目、及び6日目に投薬した。抗原特異的 $CD8+T$ 細胞(AH1+)及び NK 細胞の割合を処置群にわたって決定した。

【0553】

図12G(左上のパネル)に示すように、野生型CT26腫瘍の各処置による処置は、ビヒクル処置マウスと比較して、AH1+ $CD8+T$ 細胞を有意に増加させた($p<0.05$)。 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質と抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体との組み合わせによる野生型CT26腫瘍の併用処置は、単回処置と比較して、AH1+ $CD8+T$ 細胞の量を更に増加させた(図12G、左上パネル)。更に、図12G(左下パネル)に示されるように、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体ではなく、 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質による野生型CT26腫瘍の処置は、ビヒクル処置マウスと比較して $NKP46+NK$ 細胞を有意に増加させた($p<0.0001$)。 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質と抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体との組み合わせによる野生型CT26腫瘍の処置も、ビヒクル処置マウスと比較して $NKP46+NK$ 細胞の量を有意に増加させた(図12G、左下パネル)。

【0554】

抗PD-1抗体によるCT26抗PD-1耐性細胞腫瘍の処置は、AH1+ $CD8+T$ 細胞(図12G、右上パネル)又は $NKP46+NK$ 細胞(図12G、右下パネル)のいずれの割合も有意に増加させなかった。 $TIGIT-Fc-LIGHT$ キメラタンパク質

と抗PD-L1抗体との組み合わせによるCT26抗PD-1耐性細胞腫瘍の処置は、AH1+CD8+T細胞の割合を有意に増加させた（図12G、右上パネル）。更に、単独で、又は抗PD-L1抗体と組み合わせて、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質によるCT26抗PD-1耐性細胞腫瘍の処置は、NKP46+NK細胞の割合を有意に増加させた（図12G、右下パネル）。

【0555】

これらの結果は、とりわけ、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質が自然免疫及び適応免疫の両方を活性化することを示している。理論に拘束されるものではないが、これらの結果は、とりわけ、抗PD-1獲得耐性CT26モデルにおけるTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の活性が、自然抗腫瘍免疫応答及び獲得抗腫瘍免疫応答の両方を活性化し、NK細胞及び抗原特異的CD8+T細胞の両方の浸潤を促進するその能力によって独自に駆動され得ることを示唆している。

【0556】

TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の抗腫瘍活性に対する様々な種類の免疫細胞の役割を評価するために、TIGIT-Fc-LIGHTで処置する前に、腫瘍担持マウスからCD4+T細胞、CD8+細胞又はNK細胞を除去した。簡潔には、マウスにB16.F10腫瘍を後側腹部に接種した。マウスを無作為に以下の処置群に分けた：

（1）ビヒクル単独、（2）TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200μg（枯渇なし）、（3）TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質+CD4+T細胞枯渇（-CD4）の用量当たり200μg、（4）TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質+CD8+T細胞枯渇（-CD8）の用量当たり200μg、及び（5）TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質+NK細胞枯渇（-NK）の用量当たり200μg。示された細胞を枯渇させる抗体でマウスを処置した。腫瘍接種後0日目、3日目及び6日目に腹腔内注射によって投与した。腫瘍サイズを腫瘍接種後11日目に測定した。ビヒクル単独処置マウスと比較した腫瘍成長阻害を計算し、プロットした。図12Hに示すように、ビヒクル処置対照と比較して、枯渇なし対照、-CD4及び-CD8群は有意な腫瘍減少を示した。枯渇なしマウスと比較して、-CD8マウス及び-NKマウス（統計学的に有意）は、抗がん応答の低下を示した。CD4-マウスは、存在するとしても、影響がより小さかった。これらのデータは、とりわけ、CD8+及びNK細胞が、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質によって産生される抗腫瘍応答において役割を果たすことを示している。

【0557】

次いで、腫瘍浸潤リンパ球を分析した。簡潔には、マウスに結腸直腸腫瘍CT26細胞又はCT26抗PD-1耐性細胞を後側腹部に接種した。マウスを無作為に以下の処置群に分けた：（1）ビヒクル単独、（2）抗PD-1抗体（クローンRMP1-14）の用量当たり100μg、（3）抗PD-L1抗体（クローン10F.9G2）の用量当たり100μg、（4）TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200μg、（5）抗PD-1抗体の用量当たり100μg+TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200μg、及び（6）抗PD-L1抗体の用量当たり100μg+TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200μg。マウスに、腹腔内注射による腫瘍接種後0日目、3日目、及び6日目に投薬した。抗原特異的CD8+T細胞（AH1+）及びNK細胞の割合を処置群にわたって決定した。図12G（左上のパネル）に示されるように、CT26腫瘍は、各剤で処置した場合、増加した数のCD8+T細胞（AH1四量体+）を蓄積した。CT26腫瘍は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処理した場合、CD8+T細胞（AH1テトラマー+）の数の増加を蓄積し、これは抗PD-L1抗体との同時処理によって更に増強され、それ自体CD8+T細胞（AH1テトラマー+）の中程度の増加を示した（図12G（右上パネル））。図12G（左下パネル）に示すように、CT26腫瘍は、各剤で処置した場合、NK細胞の数の増加を蓄積した。CT26腫瘍は、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質で処理した場合にNK細胞の数の増加を蓄積し、これは抗PD-L1抗体との

10

20

30

40

50

同時処理によって更に増強され、それ自体NK細胞の中程度の増加を示した（図12G（右上パネル））。

【0558】

実施例13：抗PD-1耐性細胞株及び一次耐性抗PD-1耐性細胞株に対するTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の有効性の、抗TIGIT及び／又は抗PD-1抗体との比較

手短に言えば、マウスに結腸直腸腫瘍CT26細胞、CT26抗PD-1耐性細胞（獲得耐性）又はB16.F10黒色腫瘍（一次耐性）を後側腹部に接種した。マウスを無作為に以下の処置群に分けた：（1）ビヒクル単独、（2）抗TIGIT抗体（クローン1G9）の用量当たり100 μ g、（3）抗PD-1抗体（クローンRMP1-14）の用量当たり100 μ g、（4）抗PD-1抗体+抗TIGIT抗体のそれぞれの用量当たり100 μ g、（5）抗PD-Fc-LIGHTキメラタンパク質、抗PD-1抗体の用量当たり200 μ g、及び（6）抗PD-1抗体の用量当たり100 μ g+TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質の用量当たり200 μ g。マウスに、腹腔内注射による腫瘍接種後0日目、3日目、及び6日目に投薬した。腫瘍サイズを腫瘍接種後14日目に測定した。腫瘍体積を測定し、プロットした。

【0559】

図15（上のパネル）に示されるように、抗TIGIT抗体単独による処置は、ビヒクル単独処置マウスと比較して、CT26腫瘍を有するマウスにおいて腫瘍サイズを有意に減少させた（ $p < 0.05$ ）。抗PD-1抗体、抗TIGITと抗PD-1抗体との組み合わせ、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質、及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と抗PD-1抗体との組み合わせによる処置は、ビヒクル単独処置マウスと比較して、CT26腫瘍を有するマウスの腫瘍サイズを有意に減少させた（ $p < 0.0001$ ）（図15、上部パネル）。興味深いことに、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質による処置は、抗TIGIT抗体単独で処置したマウスと比較して、CT26腫瘍を有するマウスにおいて腫瘍サイズを有意に減少させた（ $p < 0.05$ ）（図15、上部パネル）。更に、抗PD-1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との組み合わせによる処置は、抗TIGIT抗体単独（ $p < 0.001$ ）、抗PD-1抗体単独（ $p < 0.05$ ）、又は抗TIGIT抗体と抗PD-1抗体との組み合わせ単独（ $p < 0.05$ ）で処置したマウスと比較して、CT26腫瘍を有するマウスの腫瘍サイズを有意に減少させた（図15、上部パネル）。

【0560】

図15（下のパネル）に示されるように、抗TIGIT抗体単独、抗PD-1抗体単独、又は抗TIGITと抗PD-1抗体との組み合わせによる処置は、ビヒクル単独処置マウスと比較して、CT26抗PD-1耐性細胞腫瘍を有するマウスにおいて腫瘍サイズを有意に減少させなかった。一方、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質による処置、及びTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質と抗PD-1抗体との組み合わせは、ビヒクル単独処置マウスと比較して、CT26抗PD-1耐性細胞腫瘍を有するマウスにおいて腫瘍サイズを有意に減少させた（ $p < 0.0001$ ）（図15、底部パネル）。興味深いことに、TIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質による処置は、抗TIGIT抗体単独（ $p < 0.05$ ）、抗PD-1抗体単独（ $p < 0.01$ ）、又は抗TIGITと抗PD-1抗体との組み合わせ（ $p < 0.05$ ）で処置したマウスと比較して、CT26抗PD-1耐性細胞腫瘍を有するマウスの腫瘍サイズを有意に減少させた（図15底部パネル）。更に、抗PD-1抗体とTIGIT-Fc-LIGHTキメラタンパク質との組み合わせによる処置は、抗TIGIT抗体単独（ $p < 0.001$ ）、抗PD-1抗体単独（ $p < 0.001$ ）、又は抗TIGITと抗PD-1抗体との組み合わせ（ $p < 0.001$ ）で処置したマウスと比較して、CT26抗PD-1耐性細胞腫瘍を有するマウスの腫瘍サイズを有意に減少させた（図15、底部パネル）。

【0561】

これらの結果は、とりわけ、TIGIT-Fc-LIGHTがWT CT26及び獲得

10

20

30

40

50

耐性CT26腫瘍モデルの両方において非常に活性であり、抗TIGIT、抗PD-1、抗PD-L1又は抗TIGIT／抗PD-1の組み合わせのチェックポイント遮断よりも優れていることを示唆している。

【0562】

実施例14：例示的なヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の構築及び特性決定

SIRPα及び4-1BBLベースのキメラタンパク質をコードする構築物を作製した。「hSIRPα-Fc-4-1BBL」構築物は、ヒンジーCH2-CH3 Fcドメインを介してヒト4-1BBLのECDに融合されたヒトSIRPαの細胞外ドメイン（ECD）を含んだ。図16（上パネル）を参照されたい。

【0563】

構築物をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞における発現のためにコドン最適化し、CHO細胞にトランスフェクトし、高発現のために個々のクローンを選択した。次いで、高発現クローンを、無血清培地中の攪拌バイオリアクターにおける小規模製造に使用し、関連するキメラ融合タンパク質をプロテインA結合樹脂カラムで精製した。

【0564】

hSIRPα-Fc-4-1BBL構築物を293個の細胞で一過性に発現させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。SIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、還元剤又は脱グリコシル化剤による処理なしで、SDSの存在下で煮沸する）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸）及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノールと脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。更に、SIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを三連で泳動し、抗SIRPα抗体（図16、底部パネル、左プロット）、抗ヒトFc（H+L）抗体（図16、中央プロット）又は抗4-1BBL抗体（図16、底部パネル、右側プロット）を使用してプローブした。ウェスタンブロットは、非還元レーン（図16、底部パネル、各プロットにおける第2のレーン）に優勢な二量体バンドの存在を示し、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図16、下のパネル、各プロットにおける3番目のレーン）。図16の下のパネル、各プロットの4番目のレーンに示されるように、キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下でモノマーとして泳動した。これらの結果は、ヒトSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質がグリコシル化されており、多量体の天然状態を形成する傾向があることを実証している。

【0565】

2つの末端のリガンド、ヒトCD47、ヒト4-1BBへのhSIRPα-Fc-4-1BBLの結合を、Meso Scale Discovery（MSD）ELISAアッセイを使用して評価した。それに向けて、ヒトCD47-Hisをプレート上にコーティングし、プレートに結合したヒトCD47-Hisによる捕捉のために、漸増量のhSIRPα-Fc-4-1BBL又はPD-1-Fc-4-1BBLキメラタンパク質をプレートに添加した。PD-1-Fc-4-1BBLキメラタンパク質を、ヒトCD47への結合のための陰性対照として使用した。CD47-Hisへのキメラタンパク質の結合を、抗SIRPα抗体及び抗ヒツジSULFO-TAG二次抗体を使用して検出した。結合を、電気化学発光（ECL）読出しを使用してアッセイした。図17Aに示すように、hSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質のそれぞれは、ヒトCD47-Hisに用量依存的かつ飽和的に結合した。対照的に、PD-1-Fc-4-1BBLキメラタンパク質は、ヒトCD47-Hisに結合しなかった。これらのデータは、hSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質がSIRPαのリガンドであるヒトCD47に特異的に結合することを示している。

10

20

30

40

50

【0566】

同様の実験では、ヒト4-1BB-Hisをプレート上にコーティングし、プレートに結合したヒト4-1BB-Hisによる捕捉のために、漸増量のhSIRPα-Fc-4-1BB-L、PD-1-Fc-4-1BB-L又はhSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質をプレートに添加した。hSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質を、ヒト4-1BBへの結合のための陰性対照として使用した。抗4-1BB-L抗体及び抗ヒツジSULFO-TAG二次抗体を使用して、4-1BB-Hisへのキメラタンパク質の結合を検出した。結合を、電気化学発光（ECL）読出しを使用してアッセイした。図17Bに示されるように、hSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質及びPD-1-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質のそれぞれは、ヒト4-1BB-Hisに用量依存的かつ飽和的に結合した。対照的に、hSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質は、ヒト4-1BB-Hisに結合しなかった。これらのデータは、hSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質が4-1BB-Lのリガンドであるヒト4-1BBに特異的に結合することを示している。

10

【0567】

ヒトSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質がヒト4-1BB及びCD47に同時に結合することができるかどうかを理解するために、ヒト4-1BB-Hisをプレートにコーティングし、プレートに結合したヒト4-1BB-Hisによる捕捉のために、漸増量のhSIRPα-Fc-4-1BB-L又はPD-1-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質をプレートに添加した。PD-1-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質を陰性対照として使用した。次いで、任意のキメラタンパク質による捕捉のためにヒトCD47-His-ビオチンをプレートに添加し、次いで、これをヒト4-1BBによって捕捉した。ストレプトアビジンSULFO-TAG二次を検出に使用した。結合を、電気化学発光（ECL）読出しを使用してアッセイした。図17Cに示すように、hSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質は、ヒト4-1BB-His及びCD47-Hisに対する同時期の用量依存的結合と一致するシグナルを生成した。対照的に、PD-1-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質はシグナルを生成しなかった。これらのデータは、hSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質がヒト4-1BB及びCD47に同時に結合し得ることを示す。

20

【0568】

4-1BBを発現する細胞へのSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質の結合を更に試験するために、4-1BBを発現するヒト線維肉腫HT1080細胞（HT1080/4-1BB細胞）を、標準的な技術を使用して作製した。2つの陽性クローン、HT1080/4-1BB+クローンA及びBを結合試験に使用した。SIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質がHT1080/4-1BB細胞に特異的に結合することができるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。HT1080/4-1BB細胞を、緩衝液単独又はSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質と共にインキュベートした。結合した細胞をPaciflic Blueにコンジュゲートした抗マウスFc抗体で対比染色し、SIRPα-Fc-4-1BB-L結合の結合をフローサイトメトリーによって検出した。図18Aに示されるように、SIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質により染色されるHT1080/4-1BB細胞は、染色されていないHT1080/4-1BB細胞と比べて、より多くの染色を呈した。これらのデータはまた、SIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質がHT1080/4-1BB細胞の両方のクローズに結合することを実証した。

30

40

【0569】

結合を定量するために、HT1080/4-1BB細胞を漸増濃度のSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質と共にインキュベートした。結合した細胞をPaciflic Blueにコンジュゲートした抗マウスFc抗体で対比染色し、SIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質結合の結合をフローサイトメトリーによって検出した。平均蛍光強度（MFI）をSIRPα-Fc-4-1BB-Lキメラタンパク質のlog濃

50

度の関数としてプロットした。図 18 B に示されるように、SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質は、HT1080/4-1 BB 細胞に対する用量依存的な結合を示した。

【0570】

次に、SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質が 4-1 BB/4-1 BBL シグナル伝達を活性化できるかどうかを研究した。4-1 BB/4-1 BBL シグナル伝達の活性化時に IL-8 を分泌する HT1080/h4-1 BB 細胞をモデルとして使用した。HT1080/h4-1 BB 細胞を一晩成長させ、緩衝液単独、1 μ g/ml 又は 3.33 μ g/ml の SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質を加えた。インキュベーションを更に 3 時間継続した。3 時間後、HT1080/h4-1 BB 細胞培養物から培地を除去し、IL-8 を ELISA によって評価した。IL-8 産生を、Mes o Scale Discovery (MSD) ELISA アッセイを使用して培養上清において評価した。図 18 C に示されるように、緩衝液のみで処理された HT1080/h4-1 BB 細胞と比べて、有意により多くの IL-8 産生が、1 μ g/ml ($p < 0.01$) 又は 3.33 μ g/ml ($p < 0.001$) の SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質により処理された HT1080/h4-1 BB 細胞において観察された。

10

【0571】

これらの結果は、とりわけ、SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質が 4-1 BB/4-1 BBL シグナル伝達を活性化することを示した。

20

【0572】

実施例 15：例示的マウス SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質の構築及び特性決定

マウス SIRP α 及び 4-1 BBL ベースのキメラタンパク質をコードする構築物を、マウスモデルにおけるインビボ研究のために生成した。「mSIRP α -Fc-4-1 BBL」構築物は、ヒンジ-CH2-CH3 Fc ドメインを介してマウス 4-1 BBL の ECD に融合されたマウス SIRP α の細胞外ドメイン (ECD) を含んだ。図 19 (上パネル) を参照されたい。

【0573】

構築物をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における発現のためにコドン最適化し、CHO 細胞にトランスフェクトし、高発現のために個々のクローンを選択した。次いで、高発現クローンを、無血清培地中の攪拌バイオリアクターにおける小規模製造に使用し、関連するキメラ融合タンパク質をプロテイン A 結合樹脂カラムで精製した。

30

【0574】

mSIRP α -Fc-4-1 BBL 構築物を 293 個の細胞で一過性に発現させ、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料 (すなわち、還元剤又は脱グリコシル化剤による処理なしで、SDS の存在下で煮沸する) を、(i) 脱グリコシル化されていない還元試料 (すなわち、 β -メルカプトエタノールのみで処理し、SDS の存在下で煮沸) 及び (ii) 還元及び脱グリコシル化試料 (すなわち、 β -メルカプトエタノールと脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDS の存在下で煮沸した) と比較した。更に、SIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを三連で泳動し、抗 SIRP α 抗体 (図 19、底部パネル、左プロット)、抗マウス Fc 抗体 (図 19、中央プロット) 又は抗 4-1 BBL 抗体 (図 19、底部パネル、右側プロット) を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、非還元レーン (図 19、底部パネル、各プロットにおける第 2 のレーン) に優勢な二量体バンドの存在を示し、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された (図 19、下のパネル、各プロットにおける 3 番目のレーン)。図 19 の下のパネル、各プロットの 4 番目のレーンに示されるように、キメラタンパク質は、還元剤 (β -メルカプトエタノール) 及び脱グリコシル化剤の両方の存在下でモノマーとして泳動した。これらの結果は、mSIRP α -Fc-4-1 BBL キメラタンパク質

40

50

がグリコシル化されており、多量体の天然状態を形成する傾向があることを実証している。

【0575】

3つのドメイン、マウスCD47、抗Fc抗体、及びマウス4-1BBのリガンドへのmSIRPα-Fc-4-1BBLの結合を、Meso Scale Discovery (MSD) ELISAアッセイを使用して評価した。

【0576】

抗マウスFc-γ抗体をプレート上にコーティングし、プレート結合マウスによる抗マウスFc-γ抗体の捕捉のために、漸増量のmSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質をプレートに添加した。抗マウスFc-γ抗体へのキメラタンパク質の結合を、抗マウスSULFO-TAG抗体を使用して検出した。結合を、電気化学発光(EL)読出しを使用してアッセイした。図20Aに示すように、mSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質のそれぞれは、抗マウスFc-γ抗体に用量依存的に結合した。これらのデータは、mSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質が、Fcドメインのリガンドである抗マウスFc-γ抗体にマウスに特異的に結合することを示している。

【0577】

マウス4-1BB-Hisをプレートにコーティングし、プレートに結合したマウス4-1BB-Hisによる捕捉のために、漸増量のmSIRPα-Fc-4-1BBL又はmSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質をプレートに添加した。mSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質を、マウス4-1BBへの結合のための陰性対照として使用した。抗マウスSULFO-TAG抗体を使用して、4-1BB-Hisへのキメラタンパク質の結合を検出した。結合を、電気化学発光(EL)読出しを使用してアッセイした。図20Bに示すように、mSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質は、用量依存的かつ飽和性であるようにマウス4-1BB-Hisに結合した。対照的に、mSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質は、マウス4-1BB-Hisに結合しなかった。これらのデータは、mSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質が4-1BBLのリガンドであるマウス4-1BBに特異的に結合することを示している。

【0578】

マウスCD47-Hisをプレート上にコーティングし、プレートに結合したマウスCD47-Hisによる捕捉のために、漸増量のmSIRPα-Fc-4-1BBL又はmSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質をプレートに添加した。mSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質を、マウスCD47への結合の陽性対照として使用した。CD47-Hisへのキメラタンパク質の結合を、抗マウスSULFO-TAG抗体を使用して検出した。結合を、電気化学発光(EL)読出しを使用してアッセイした。図20Cに示すように、mSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質及びmSIRPα-Fc-CD40Lキメラタンパク質のそれぞれは、マウスCD47-Hisに用量依存的かつ飽和可能であるように、同等の動態で結合した。これらのデータは、mSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質がSIRPαのリガンドであるマウスCD47に特異的に結合することを示している。

【0579】

マウスSIRPα-Fc-4-1BBLキメラタンパク質がマウス4-1BB及びCD47に同時に結合することができるかどうかを理解するために、マウスCD47-Fcをプレート上にコーティングし、プレート結合マウスCD47-Fcによる捕捉のために漸増量のmSIRPα-Fc-4-1BBL又はPD-1-Fc-4-1BBLキメラタンパク質をプレートに添加した。PD-1-Fc-4-1BBLキメラタンパク質を陰性対照として使用した。次いで、任意のキメラタンパク質による捕捉のためにマウス4-1BB-Hisをプレートに添加し、これをマウスCD47-Fcタンパク質によって順に捕捉した。検出には、抗His-ビオチン及びストレプトアビジン-SULFO-TAGを使用した。結合を、電気化学発光(EL)読出しを使用してアッセイした。図20Dに

示すように、 $mSIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質は、マウス4-1BB-His及びCD47-Fcに対する同時期の用量依存的結合と一致するシグナルを生成した。対照的に、PD-1-Fc-4-1BBキメラタンパク質はシグナルを生成しなかった。これらのデータは、 $mSIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質がマウス4-1BB及びCD47に同時に結合することができることを示している。

【0580】

実施例16：抗PD-1感受性及び抗PD-1耐性腫瘍に対する $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質の有効性

Balb/cマウスに、500,000個の結腸直腸腫瘍CT26細胞又は第4世代抗PD-1耐性細胞を後側腹部に接種した。平均開始腫瘍体積が約90mm³に達したら（0日目）、マウスを以下の処置群に無作為に分けた：（1）ビヒクル単独（PBS、n=8）、（2）抗PD-1抗体の用量当たり100μg（クローンRMP1-14、n=7）、及び（6） $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質の用量当たり200μg（n=8）。マウスに、腹腔内注射によって0、3、及び6日目に投与した。

【0581】

野生型CT26同種移植片（図21Aの実線）を有するマウスの腫瘍体積を測定し、処置を開始した後の時間の関数としてプロットした。図21Aに示すように、抗PD-1抗体又は $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質のいずれかによる処置は、ビヒクル単独処置マウスと比較してCT26（野生型）腫瘍成長の阻害をもたらした（図21Aの曲線2及び3を曲線1と比較する）。 $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質の有効性は、抗PD-1抗体の有効性と同様であると思われた。腫瘍接種後17日目に腫瘍サイズを測定し、プロットした。図21Bに示すように、野生型CT26腫瘍を有するマウスは、ビヒクル単独処置マウスと比較して、抗PD-1抗体（ $p<0.0001$ ）又は $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質（ $p<0.0001$ ）による処置後に腫瘍サイズの統計学的に有意な減少を示した。カプラン・マイヤー生存曲線を、野生型CT26同種移植片を有するマウスについてプロットした（図21Cの実線）。図21Cに示すように、野生型CT26腫瘍を有するマウスは全て21日目までに死亡したが、野生型CT26同種移植片を有するマウスは、抗PD-1抗体（Mantel-Cox p 値0.0004）又は $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質（Mantel-Cox p 値0.0005）による処置後に生存の改善を示した。

【0582】

第4世代抗PD-1耐性細胞同種移植片（図21Aの点線）を有するマウスの腫瘍体積を測定し、処置を開始した後の時間の関数としてプロットした。図21Aに示すように、 $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質は、ビヒクル単独処置マウスと比較して第4世代抗PD-1耐性細胞腫瘍成長の阻害をもたらした（図21Aの曲線6を曲線4と比較する）。一方、抗PD-1抗体による処置は、第4世代抗PD-1耐性細胞同種移植片腫瘍サイズに対してわずかな効果を有した（図21Aの曲線5を曲線4と比較する）。腫瘍サイズを腫瘍接種後17日目に測定し、プロットした（図21Bのパターニングされたバーを参照されたい）。図21Bに示すように、野生型第4世代抗PD-1耐性腫瘍を有するマウスは、ビヒクル単独処置マウスと比較して、 $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質による処置後に腫瘍サイズの統計学的に有意な減少を示した（ $p<0.01$ ）。一方、抗PD-1抗体による第4世代抗PD-1耐性細胞同種移植片を有するマウスの処置は、腫瘍サイズにわずかな影響を及ぼした（図21B）。カプラン・マイヤー生存曲線を、第4世代抗PD-1耐性細胞同種移植片を有するマウスについてプロットした（図21Cの点線）。図21Cに示されるように、野生型の第4世代の抗PD-1耐性腫瘍を有するマウスは全て18日目までに死亡したが、第4世代の抗PD-1耐性細胞同種移植片を有するマウスは、抗PD-1抗体による処置（Mantel-Cox p 値0.3907）とは異なり、 $SIRP\alpha-Fc-4-1BB$ キメラタンパク質による処置（Mantel-Cox p 値0.0111）の後に改善された生存を示した。

【0583】

これらの結果は、とりわけ、S I R P α -F c-4-1 B B Lキメラタンパク質が、抗 P D-1 感受性腫瘍及び抗 P D-1 耐性腫瘍の両方に罹患している動物において腫瘍成長を有意に阻害し、生存を改善することを実証している。

【0584】

実施例 17：カニクイザルにおける T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質の安全性及び薬力学的活性（P D）

カニクイザルは、カニクイザル標的へのヒト T I G I T及び L I G H Tの交差結合に起因するヒト T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質の潜在的毒性及び免疫特性を調べるために適切な種であると判断された（データは示さず）。処置未経験のカニクイザルの群を、試験の 1 日目、8 日目、15 日目及び 22 日目に投与した 0.1、1.0、10、40 mg / kg の用量の T I G I T-F c（I g G 4）-L I G H T又はビヒクルコントロールの静脈内注入で繰り返し処置した。T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質は、全ての用量群で忍容性が高かった。

【0585】

3 回目の投与の 15 日前、及び 3 回目の投与のおよそ 24 時間後の 16 日目に、投与前及び投与後のリンパ球数を得た。この実験では、フローサイトメトリーを実施して、リンパ球数の観察された変化が、末梢循環からの H V E M 発現リンパ球の選択的マージネーションによって引き起こされたかどうかを決定した。一貫して、T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質は、投与直後の全血球計算分析において明らかであった末梢リンパ球の用量依存的マージネーションを刺激した（図 22 A）。したがって、15 日目から 16 日目までの投与後リンパ球のマージネーションが観察された（図 22 A）。末梢血リンパ球数は、15 日目の投与後に用量依存的に減少することが観察され、 $(100 - ((16 \text{ 日目のリンパ球数}) / (15 \text{ 日目のリンパ球数}) \times 100))$ としてプロットされている。各データ点は個々の動物を示す。図 22 A に示すように、T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質で処置したサルでは、対照サルと比較して、末梢血リンパ球の数が用量依存的に減少した。

【0586】

末梢 C D 3 + T 細胞に対する T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質の効果を、カニクイザルにおいて更に調査した。カニクイザルに、ビヒクル又は 40 mg / kg の T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質を I V 注入した。投与前及び投与後のリンパ球数を、投与前及び投与後 6 時間に得た。図 22 B は、投与後 6 時間の試料からの C D 3 + T 細胞の投与後マージネーションを示す。図 22 B に示すように、末梢血 C D 3 + T 細胞数は、T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質で処理したサルにおいて約 30 % 減少した。対照的に、末梢血 C D 3 + T 細胞の数は、ビヒクル処置サルにおいて 2.65 % 増加した（図 22 B）。これらのデータは、C D 3 + T 細胞の投与後のマージネーションを示す。これらのデータは、投与後のリンパ球マージネーションを示す。より具体的には、T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質は、初期注入後 6 時間以内に末梢から C D 3 + T 細胞のマージネーションを誘導し（図 22 B）、これらの細胞は高レベルの H V E M を発現することが実証された（図 28 A）。末梢リンパ球の変化はリンパ系区画に限定され、末梢好中球、好塩基球、好酸球、血小板の数に有意な変化は観察されず、ヘモグロビン又はヘマトクリットのレベルにも差は観察されなかった（データは示さず）。

【0587】

カニクイザルに、ビヒクル又は 0.1、1.0、10、若しくは 40 mg / kg の T I G I T-F c-L I G H Tキメラタンパク質の毎週 4 回の I V 注入（1 日目、8 日目、15 日目、22 日目）を行った。様々なサイトカインを投与の 2 時間後に測定して、サイトカインシグネチャを決定した。主成分分析（P C A）を行って、投与後 2 時間のサイトカインシグネチャに基づいて動物の分布を可視化した。複数の炎症促進性サイトカインの血清濃度の用量依存的な増加が認められ、偏りのない主成分分析（P C A）により、マルチプレックスアレイからの 30 個全てのサイトカインを分析に含めた場合の用量処置群の分

離が明らかにされた（図 2 2 C）。図 2 2 C に示すように、動物のサイトカインプロファイルは、ビヒクル処置サルと比較して用量依存的変化の傾向を示した。様々なサイトカインの傾向をプロットした。JMP ソフトウェアを使用して、特定のサイトカインシングネチャ（図 2 2 D）に基づいて、PCA 四分円にわたる個々の動物の遊走を支配するサイトカインを同定したベクタープロットを作成した。図 2 2 D に示されるように、炎症誘発性サイトカインは、Q 3 及び Q 4 の四分円における試料のクラスター化を支配し、適応免疫サイトカイン（例えば、IL-2 及び IL-17）は Q 2 を支配した。Meso Scale Discovery (MSD) アッセイを使用して、様々なサイトカインの投与後 2 時間のレベルを評価し、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質の用量の関数としてプロットした。図 2 2 E に示されるように、IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1 β (CCL4) TARC (CCL17)、IFN γ 、IL-8、IL-12 及び SDF1 α (CXCL12) は、用量依存的な増加を示した。四分円 3 及び四分円 4 に移動する動物応答をもたらしたシングネチャには、CXCL10、CCL2、CCL4、CCL17 及び IL-10 などの炎症促進性サイトカインが含まれた。適応免疫サイトカインも用量応答に従うことが観察され、IL-2 及び IL-17 を含む四分円 2 にクラスター化した（図 2 2 E 及び図 2 8 B）。血清サイトカイン応答の多くは、マウス TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質を使用した観察で保存された（図 2 8 C）。まとめると、これらの結果は、とりわけ、TIGIT 経路及び LIGHT 経路に關与する受容体／リガンド相互作用に基づいて強力な免疫学的効果を發揮したことを示した。有望なことに、非ヒト霊長類で観察された血清サイトカイン変化の多くは、マウスインビボ及びヒトインビトロアッセイで観察されたサイトカイン変化と重複した（図 2 4 及び図 2 6）。図 2 2 E は、Meso Scale Discovery (MSD) アッセイを用いて評価されるサイトカイン応答を示す。IL-2 及び IP-10 の誘導の程度を、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質の用量の関数としてアッセイした。図 2 2 F に示されるように、IL-2 の誘導が用量依存的に認められた。同様に、図 2 2 G に示されるように、IP-10 の誘導が用量依存的に認められた。誘導の動態を研究した。図 2 2 G は、IP-10 の誘導倍数を示す。図 2 2 H は、第 1、第 2 及び第 3 の投与中及び投与後の CXCL-10 の誘導の動態を示す。図 2 2 H に示されるように、誘導のピークが投与の 2 時間後に観察され、バックグラウンドレベルが約 8 時間で達成された。

10

20

30

【0588】

これらのデータは、IL-2 及び IP-10（上記）を含む血清サイトカインの明確なプロファイルが用量依存的であるように観察されたことを示す。まとめると、これらの結果は、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質が、T 細胞のマージネーション、並びに IL-2、IL-10、IP-10 (CXCL10)、MCP-1、MIP-1 β (CCL4) TARC (CCL17)、IFN γ 、IL-8、IL-12 及び SDF1 α (CXCL12) などのサイトカインの誘導を引き起こすことを実証している。

【0589】

全体として、TIGIT-Fc-LIGHT キメラタンパク質は、少なくとも 40 mg / kg まで十分に忍容性であった。重要なことに、サイトカインプロファイル及び IL-6 の比較的小さな増加が観察されたにもかかわらず、サイトカイン放出症候群の証拠はなかった。

40

【0590】

参照による組込み

本明細書で参照される全ての特許及び刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

本明細書で論じられる刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示のためにのみ提供される。本明細書中のいかなるものも、本開示が先行発明によってそのような刊行物に先行する権利がないことの承認として解釈されるべきではない。

本明細書で使用される場合、全ての見出しは単に編成のためのものであり、決して本開

50

示を限定することを意図するものではない。任意の個々のセクションの内容は、全てのセクションに等しく適用可能であり得る。

【0591】

均等物

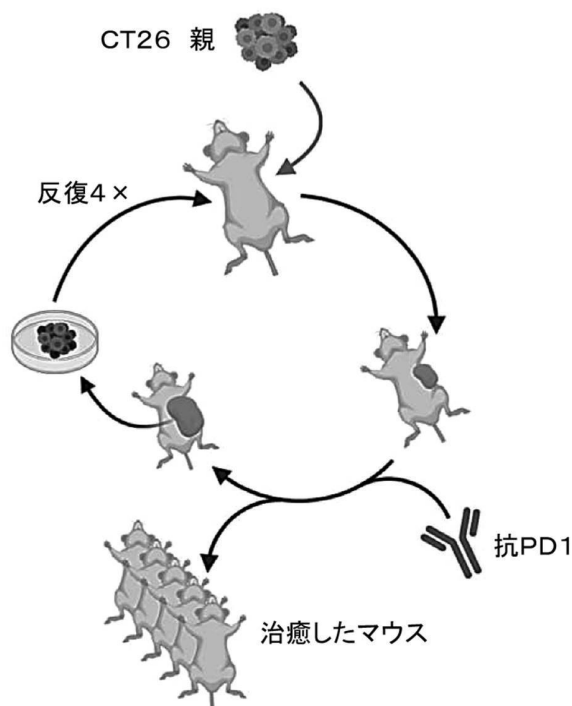
本発明は、その特定の実施形態に関連して開示されているが、更なる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従って、本発明が関連する技術分野内の既知の又は慣習的な実施に含まれるような、及び添付の特許請求の範囲に記載された以下の本質的な特徴に適用され得るような本開示からの逸脱を含む、本発明の任意の変形、使用、又は適合を網羅することを意図していることが理解されよう。

【0592】

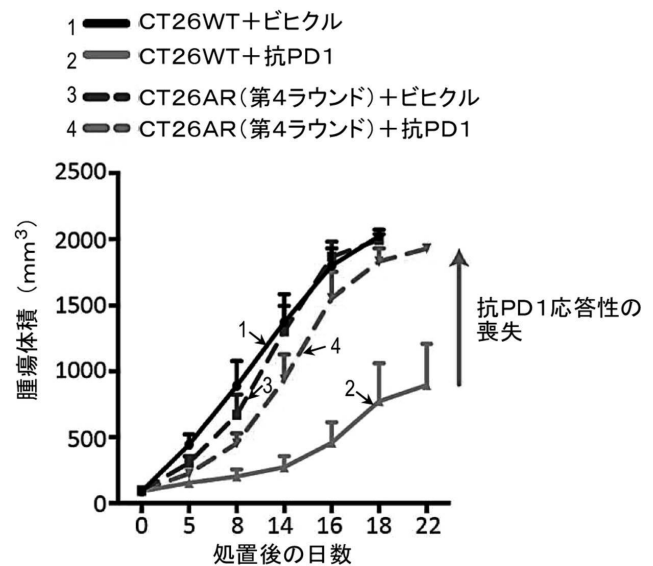
当業者は、日常的な実験のみを使用して、本明細書に具体的に開示された特定の実施形態に対する多数の等価物を認識するか、又は確認することができるであろう。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

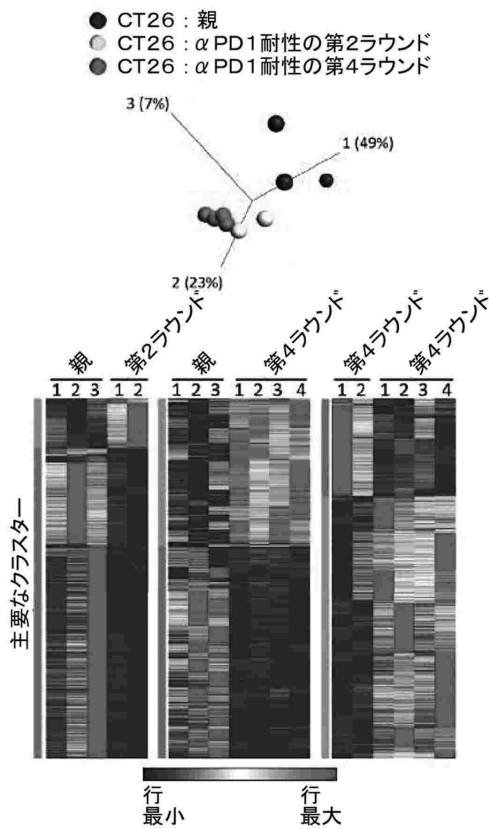
20

30

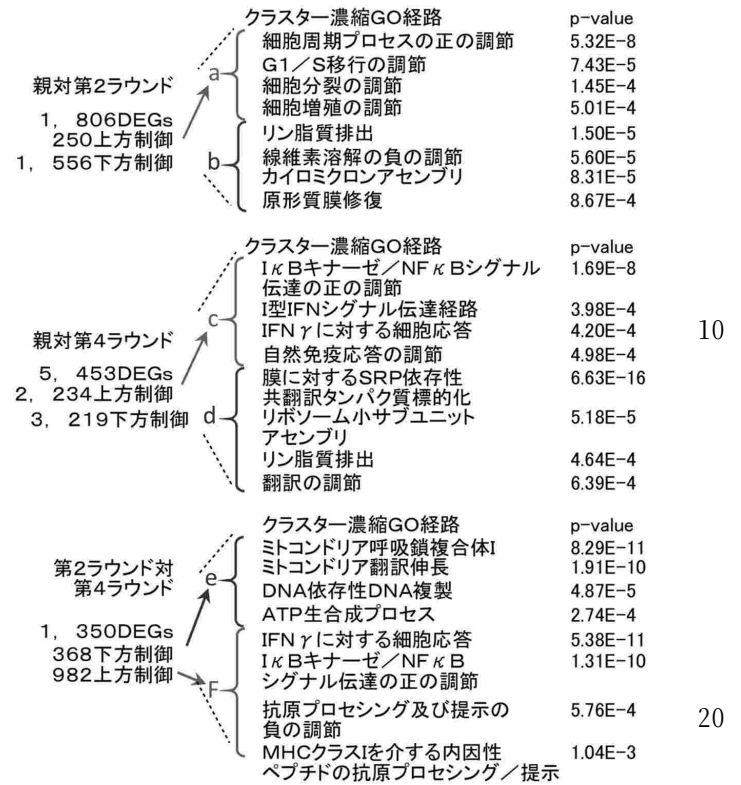
40

50

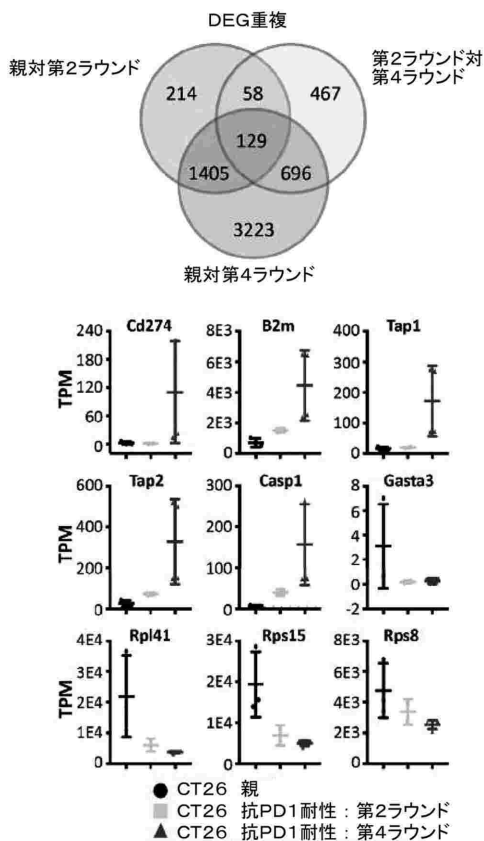
【図 2 A】



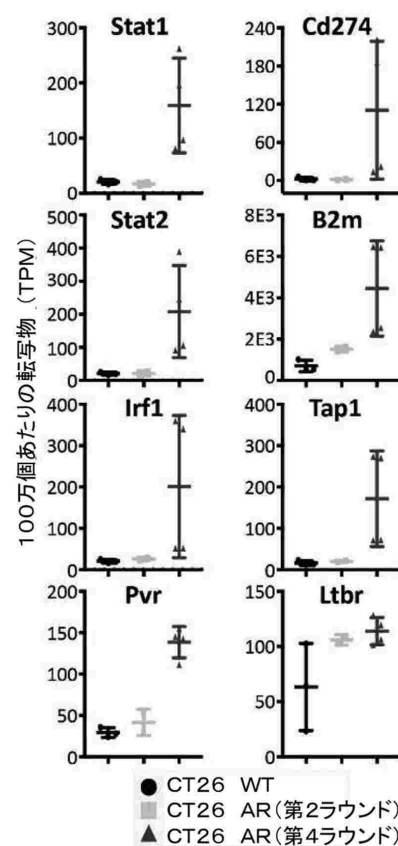
【図 2 B】



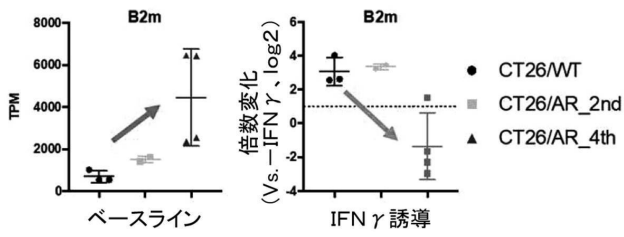
【図 2 C】



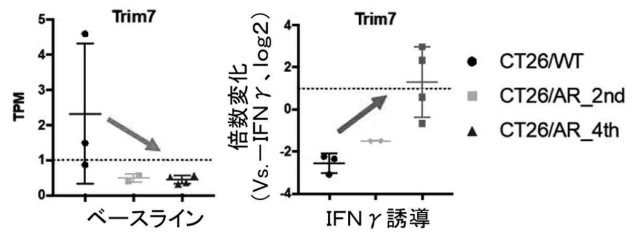
【図 2 D】



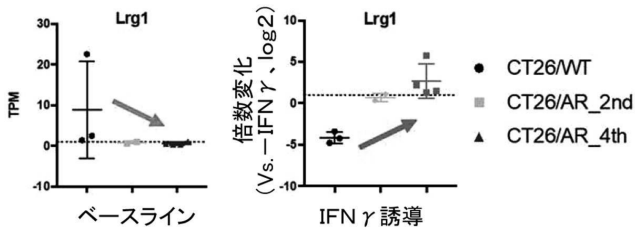
【図 5 B】



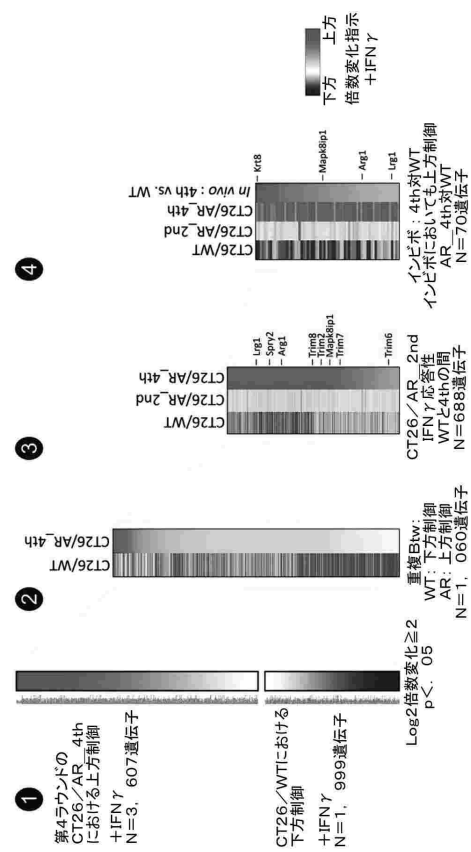
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6 A】



10

20

30

40

50

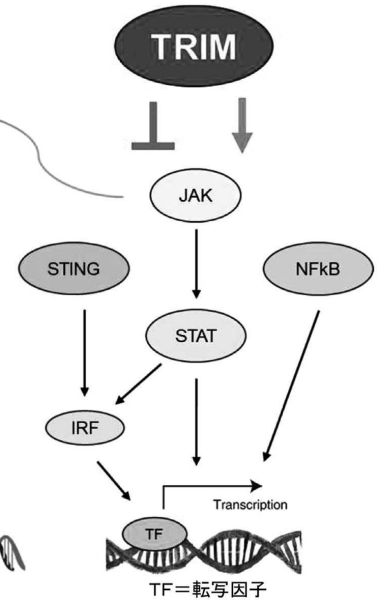
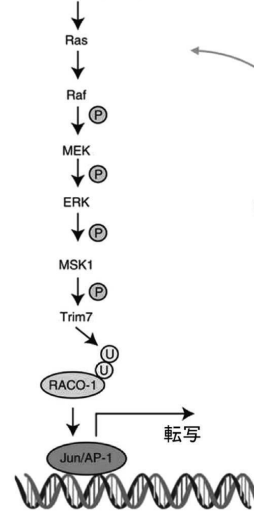
【図 6 B】

Panther GO用語	p=値
増殖の調節	7.30E-05
アポトーシスの負の調節	1.77E-04
シグナル伝達の調節	1.61E-04

分析の最後の2工程からの濃縮経路

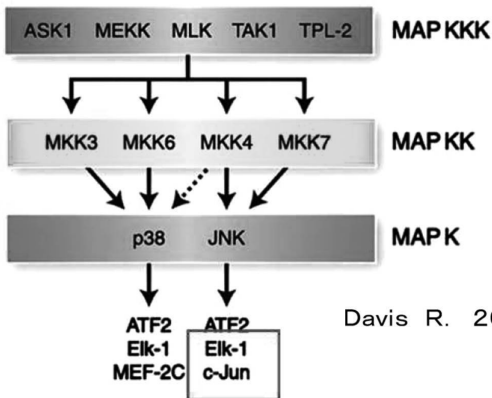
【図 6 C】

成長因子シグナル伝達



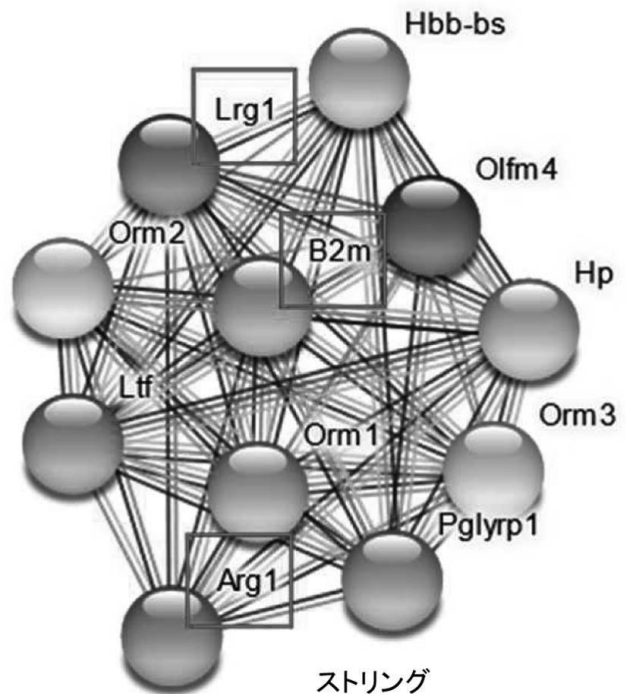
10

【図 6 D】



Davis R. 2000. 細胞

【図 6 E】



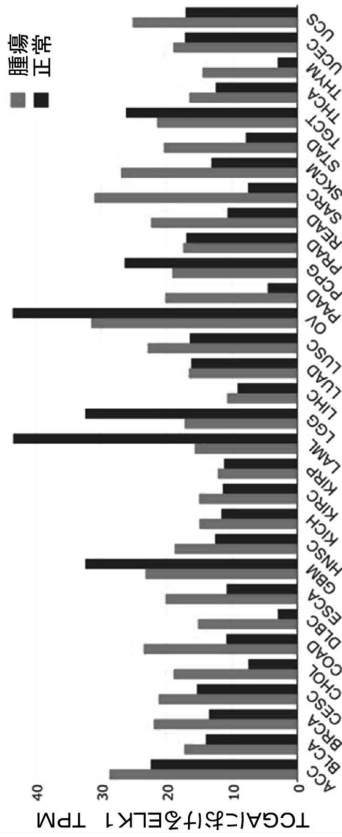
20

30

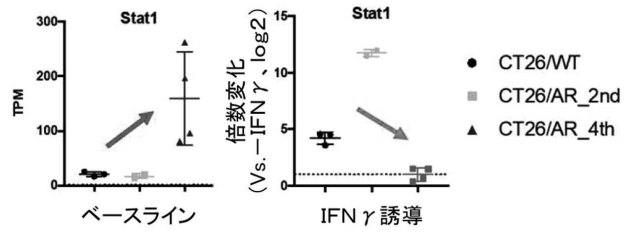
40

50

【図 6 F】



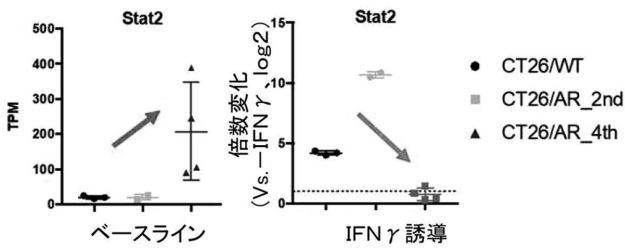
【図 7 A】



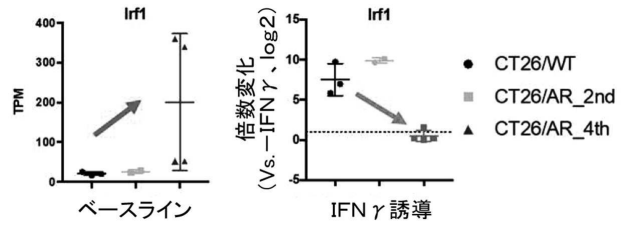
10

20

【図 7 B】



【図 7 C】

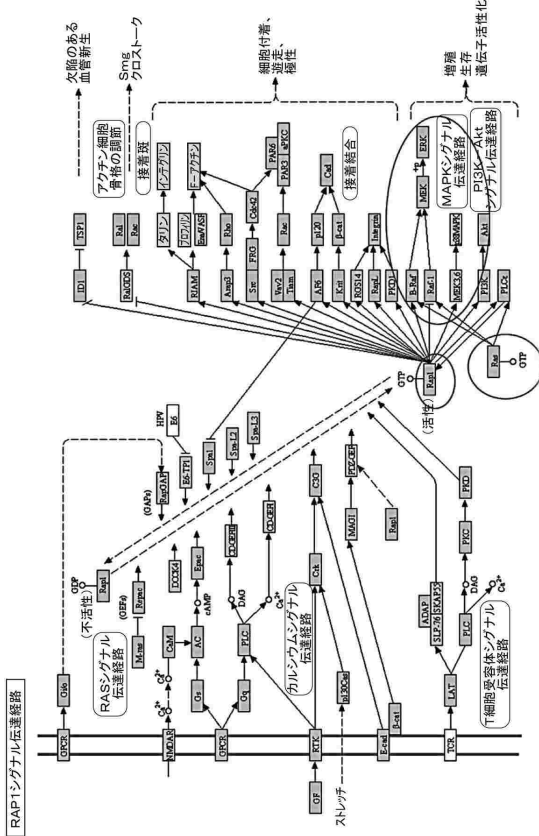


30

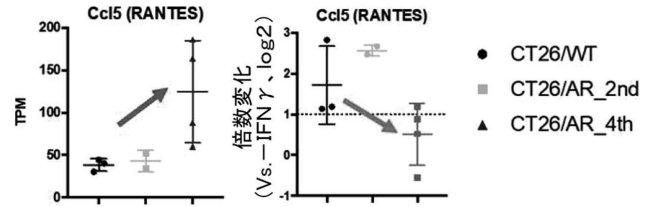
40

50

【図 8 D】



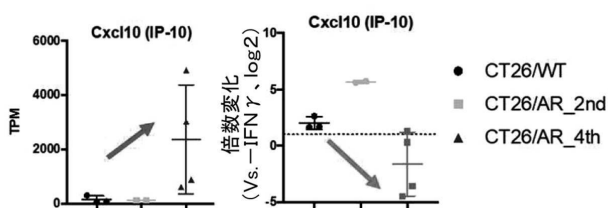
【図 9 A】



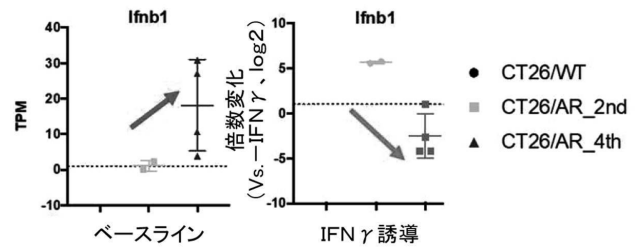
10

20

【図 9 B】



【図 9 C】

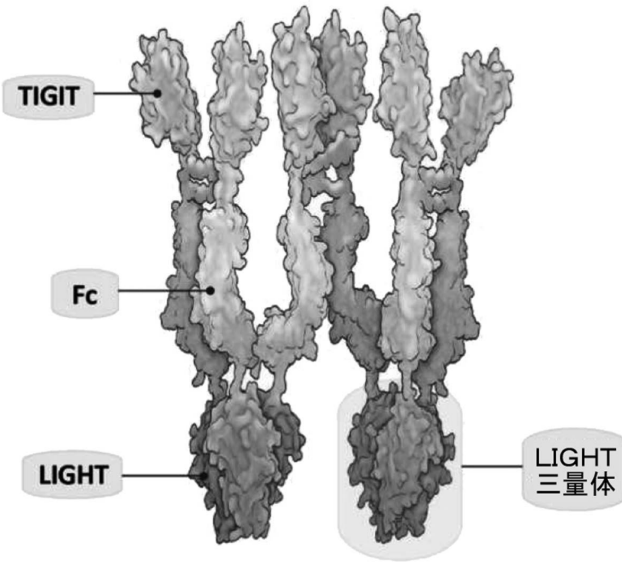


30

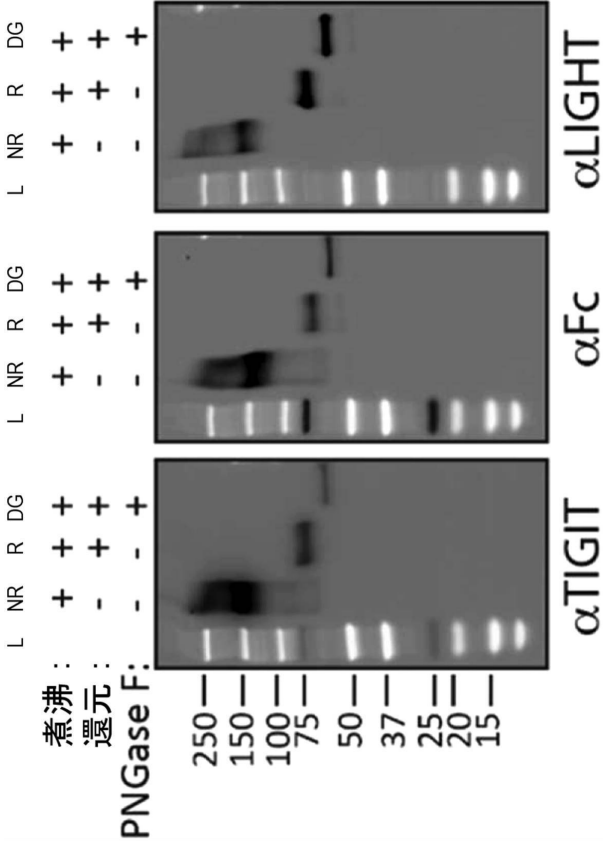
40

50

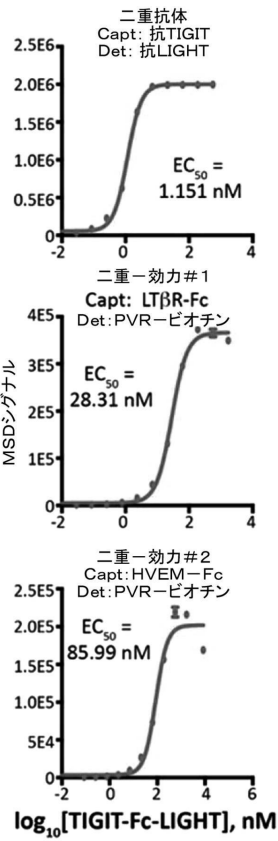
【図 10 A】



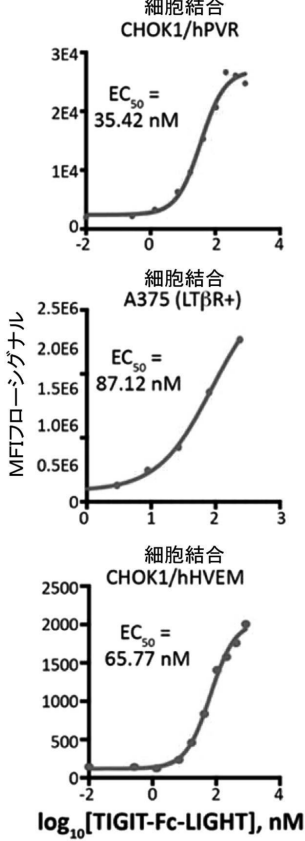
【図 10 B】



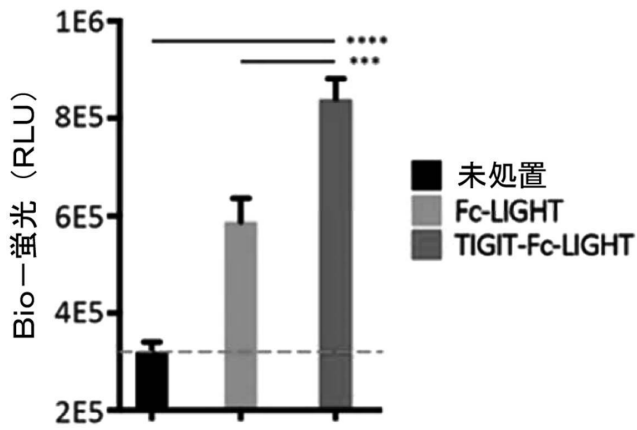
【図 10 C】



【図 10 D】



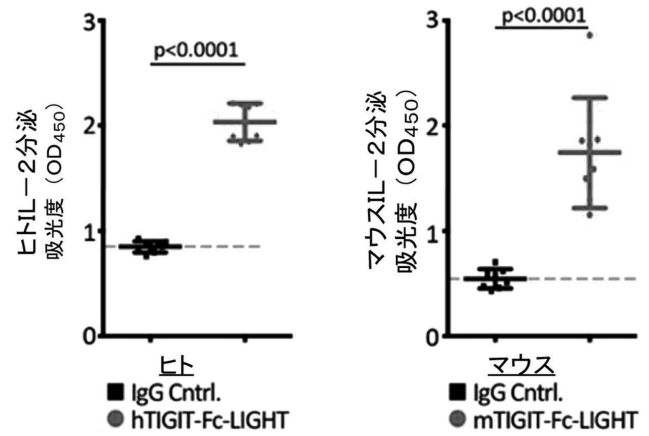
【図 10 E】

NF κ B/NIKシグナル伝達

【図 10 F】

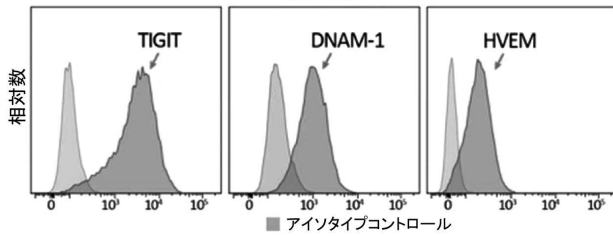
SEB超抗原アッセイ

ヒトPBMC又はマウス脾臓+200ng/mL SEB

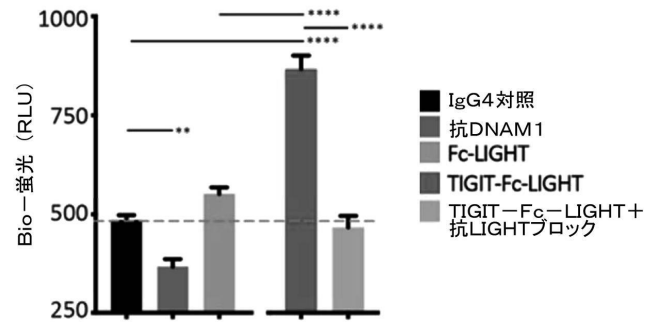


10

【図 10 G】

Jurkatエフェクター
細胞表現型

【図 10 H】

TIGIT/PVR/DNAM1ブロッキングアッセイ
Jurkat/TIGIT/DNAM1 + CHO/PVR

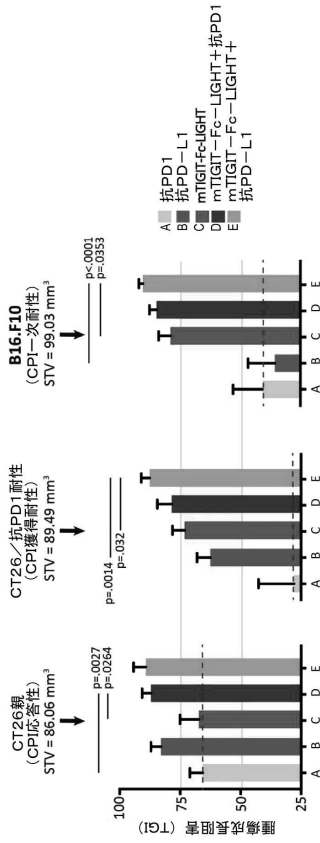
20

30

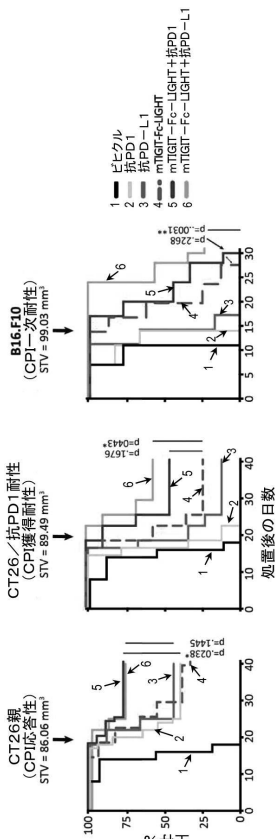
40

50

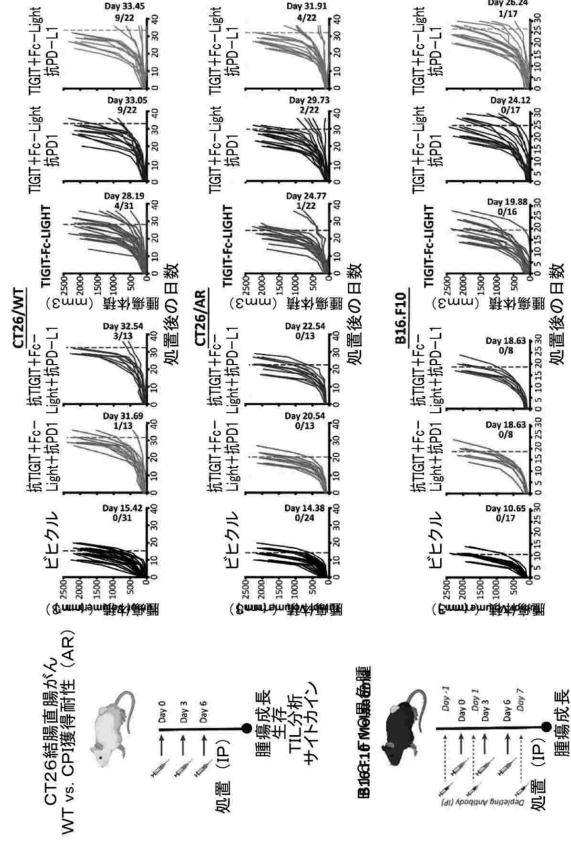
【図 1 1】



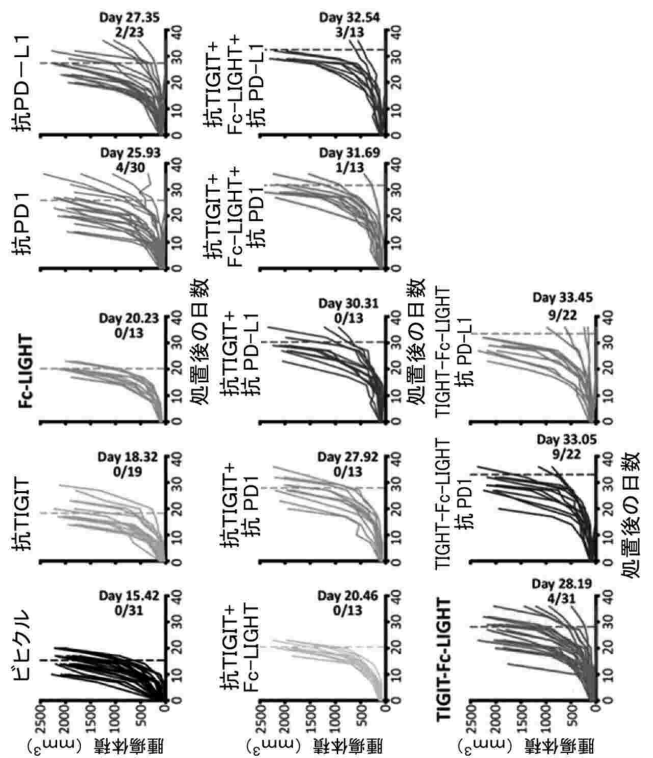
【図 1 2 B】



【図 1 2 A】



【図 1 2 C】



10

20

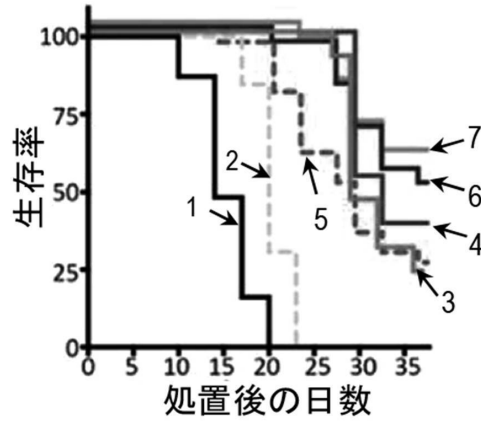
30

40

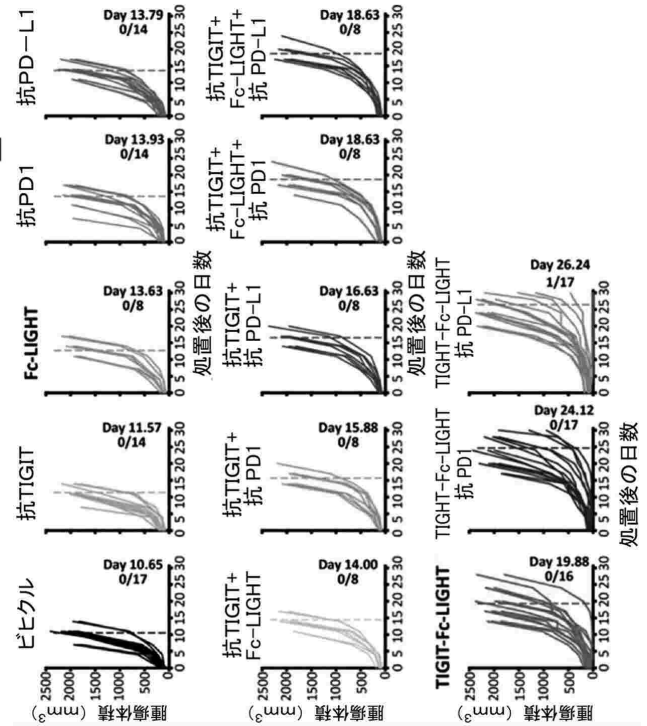
50

【図 1 2 D】

- 1 ■ ビヒクル
 2 ■ 抗TIGIT+Fc-LIGHT
 3 ■ 抗TIGIT+Fc-LIGHT+抗PD1
 4 ■ 抗TIGIT+Fc-LIGHT+抗PD-L1
 5 ■ TIGIT-Fc-LIGHT
 6 ■ TIGIT-Fc-LIGHT+抗PD1
 7 ■ TIGIT-Fc-LIGHT+抗PD-L1

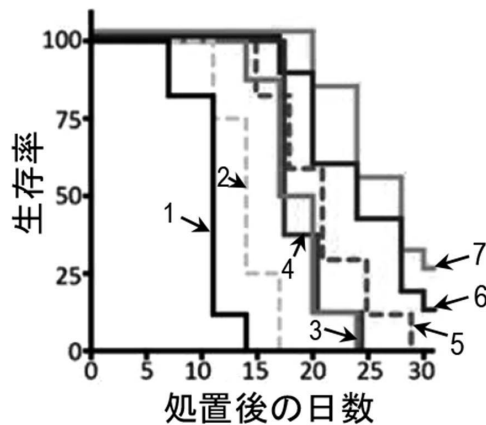


【図 1 2 E】



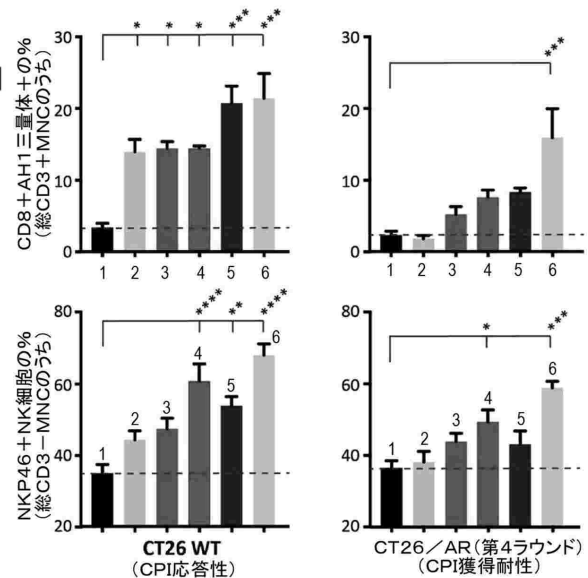
【図 1 2 F】

- 1 ■ ビヒクル
 2 ■ 抗TIGIT+Fc-LIGHT
 3 ■ 抗TIGIT+Fc-LIGHT+抗PD1
 4 ■ 抗TIGIT+Fc-LIGHT+抗PD-L1
 5 ■ TIGIT-Fc-LIGHT
 6 ■ TIGIT-Fc-LIGHT+抗PD1
 7 ■ TIGIT-Fc-LIGHT+抗PD-L1



【図 1 2 G】

TIGIT-Fc-LIGHTは、WT及びAR腫瘍において、
 自然抗腫瘍活性及び獲得抗腫瘍活性の両方を活性化する



- 1 ■ ビヒクル
 2 ■ 抗PD1
 3 ■ 抗PD-L1
 4 ■ mTIGIT-Fc-LIGHT
 5 ■ mTIGIT-Fc-LIGHT+抗PD1
 6 ■ mTIGIT-Fc-LIGHT+抗PD-L1

一元ANOVA
 * p<.05
 ** p<.01
 *** p<.001
 **** p<.0001

10

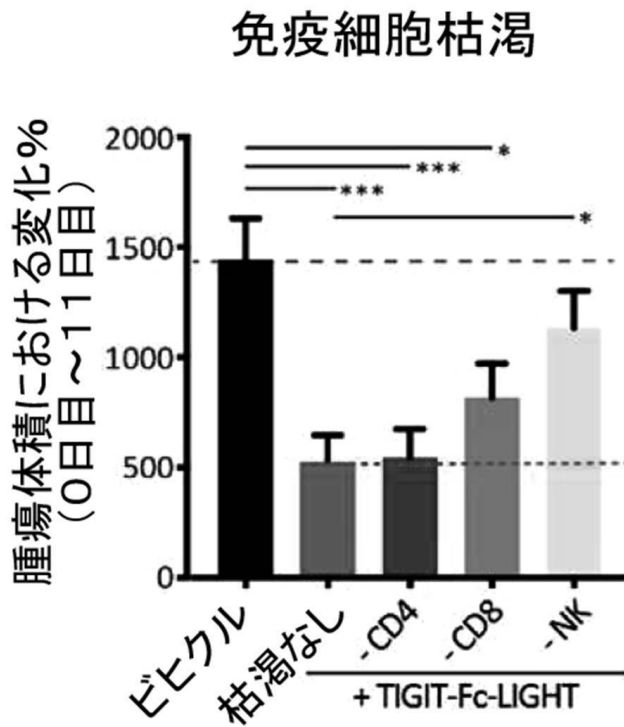
20

30

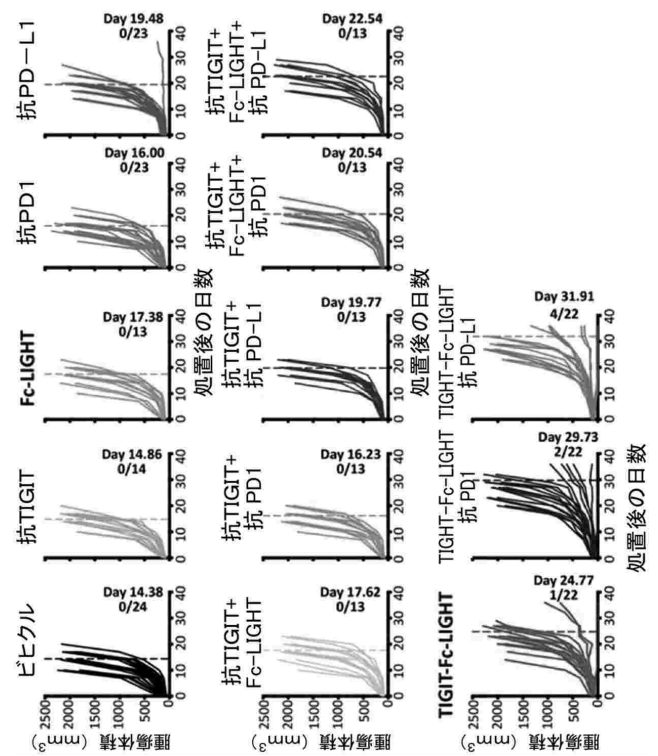
40

50

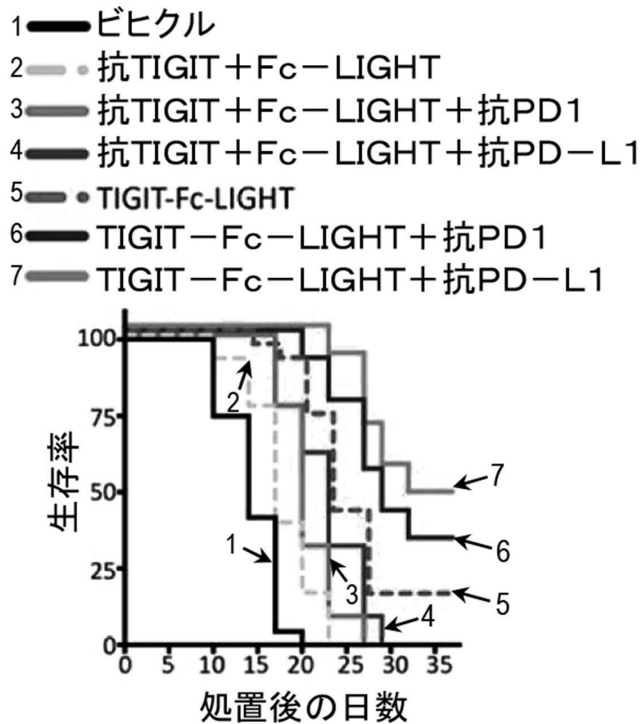
【図 1 2 H】



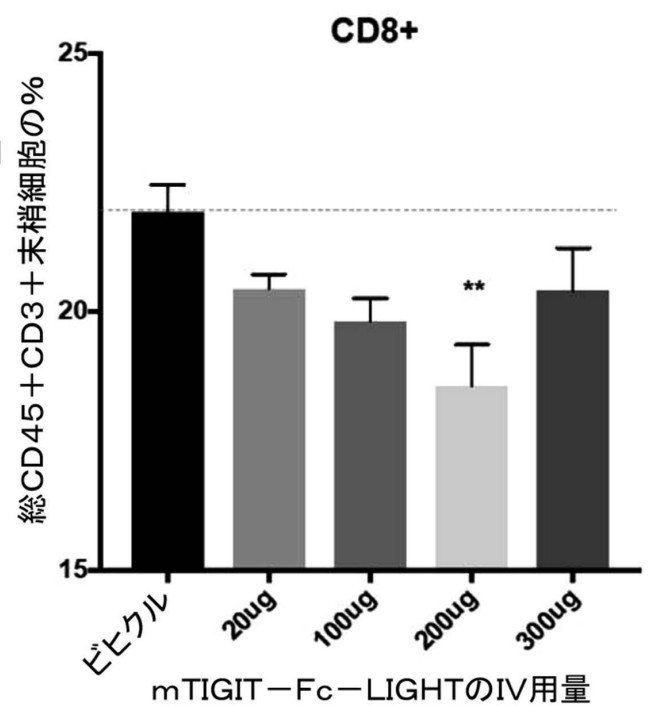
【図 1 2 I】



【図 1 2 J】



【図 1 2 K】



10

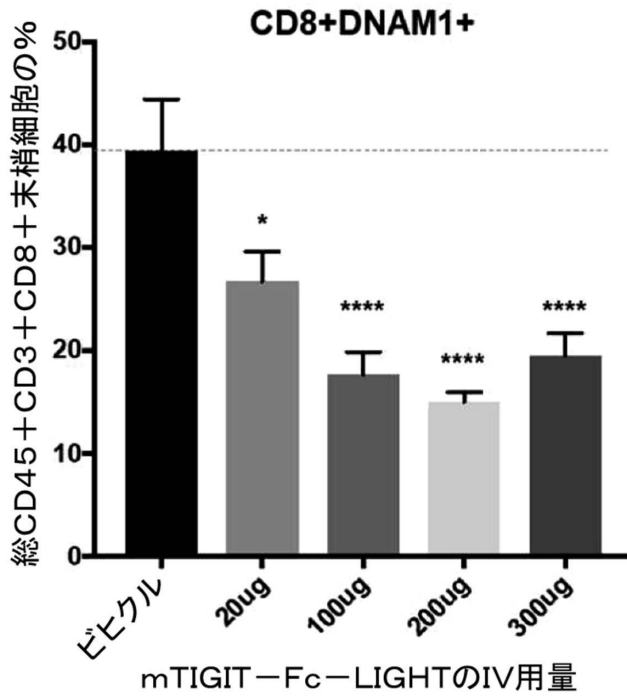
20

30

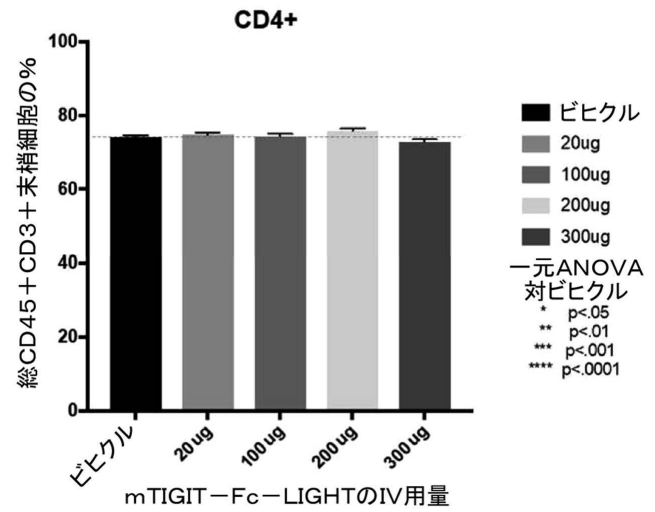
40

50

【図 1 2 L】



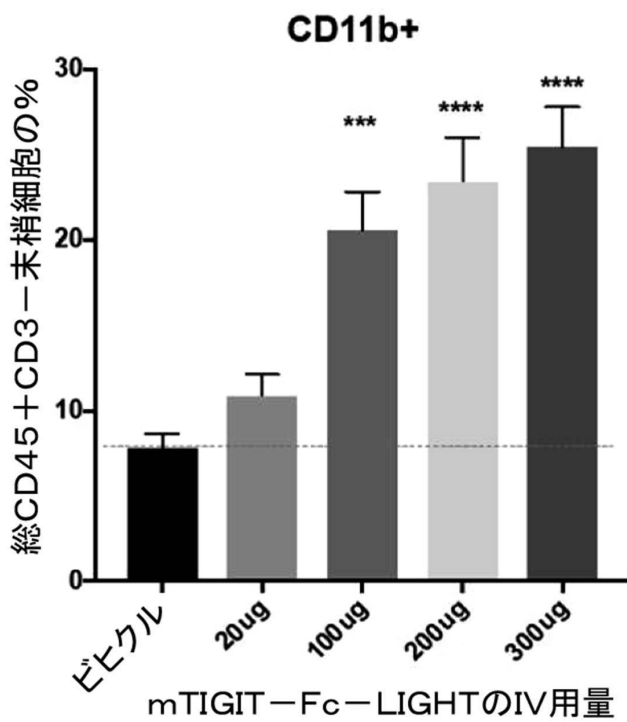
【図 1 2 M】



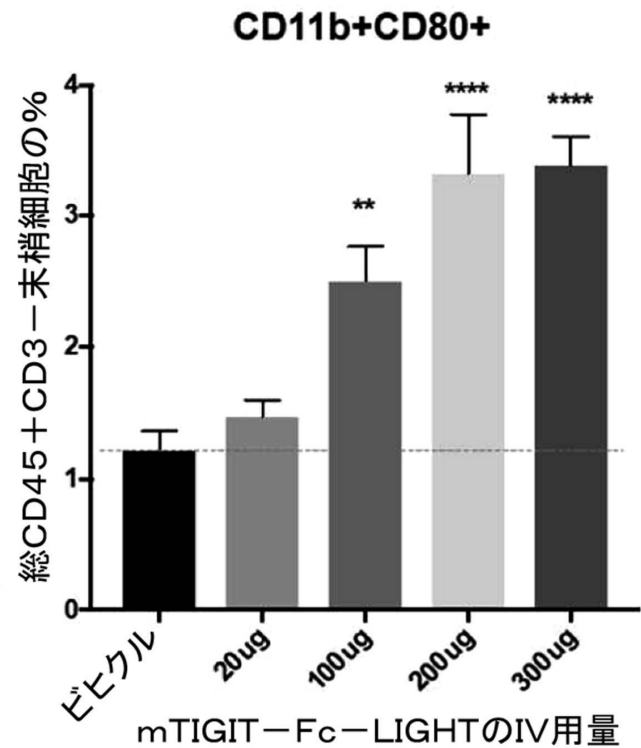
10

20

【図 1 2 N】



【図 1 2 O】

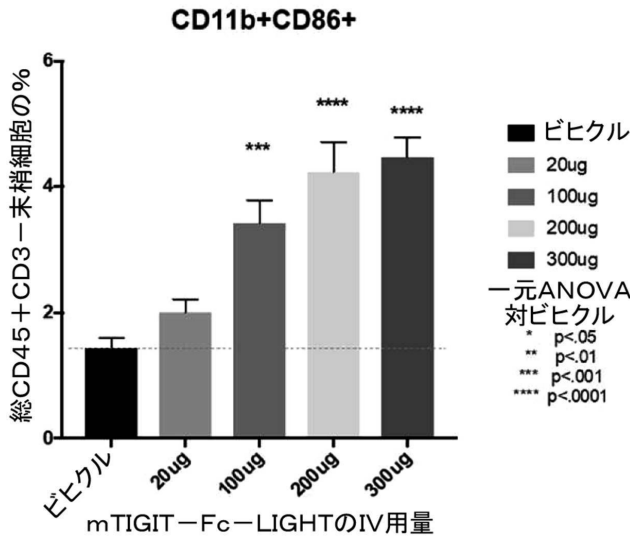


30

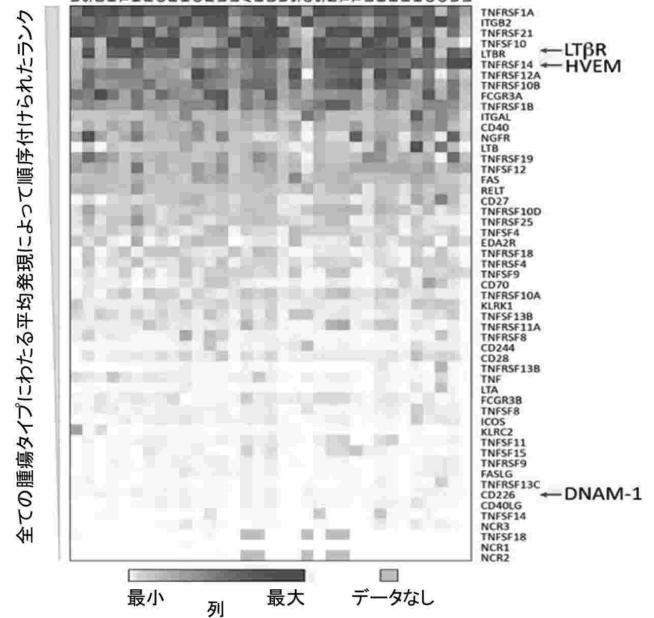
40

50

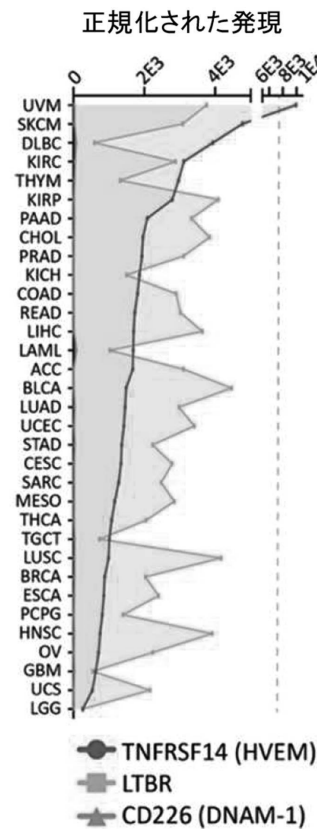
【図 1 2 P】



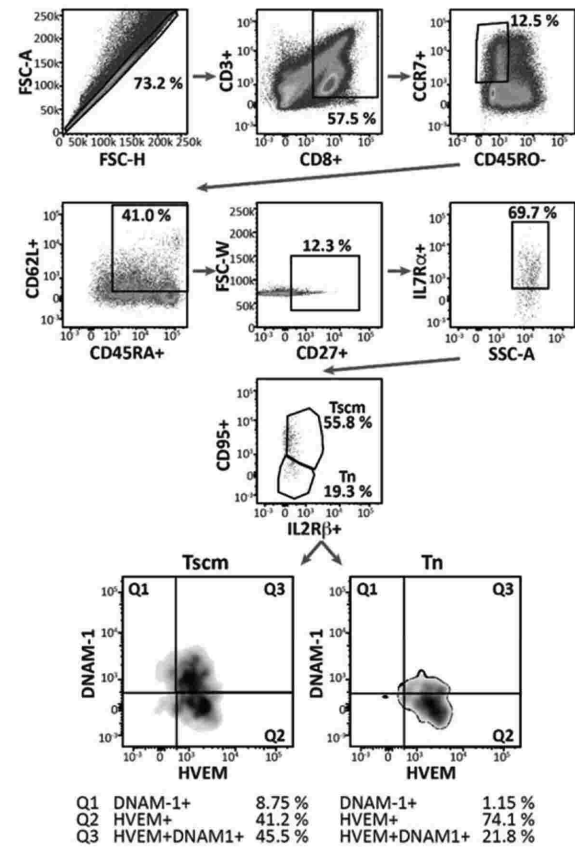
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



10

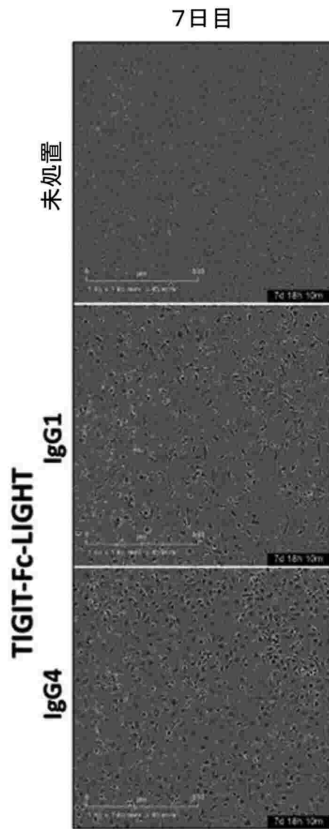
20

30

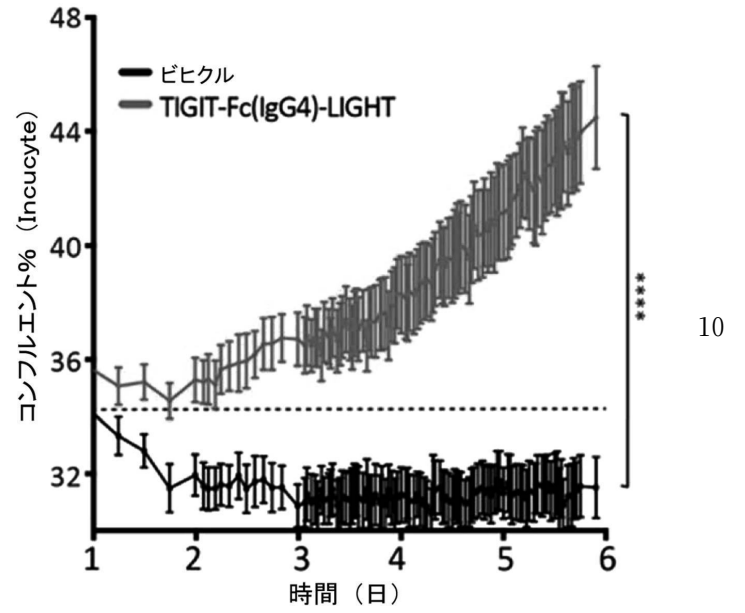
40

50

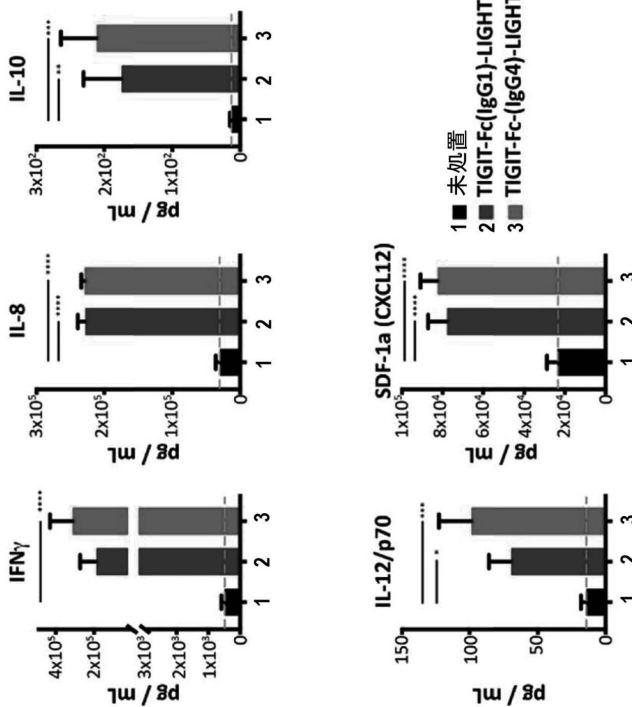
【図 1 4 A】



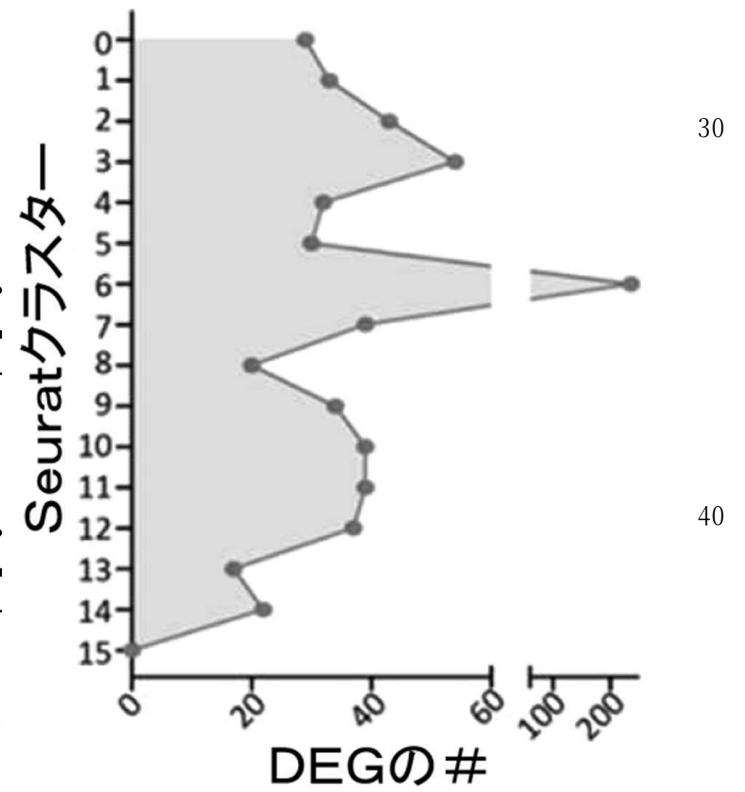
【図 1 4 B】



【図 1 4 C】



【図 1 4 D】



10

20

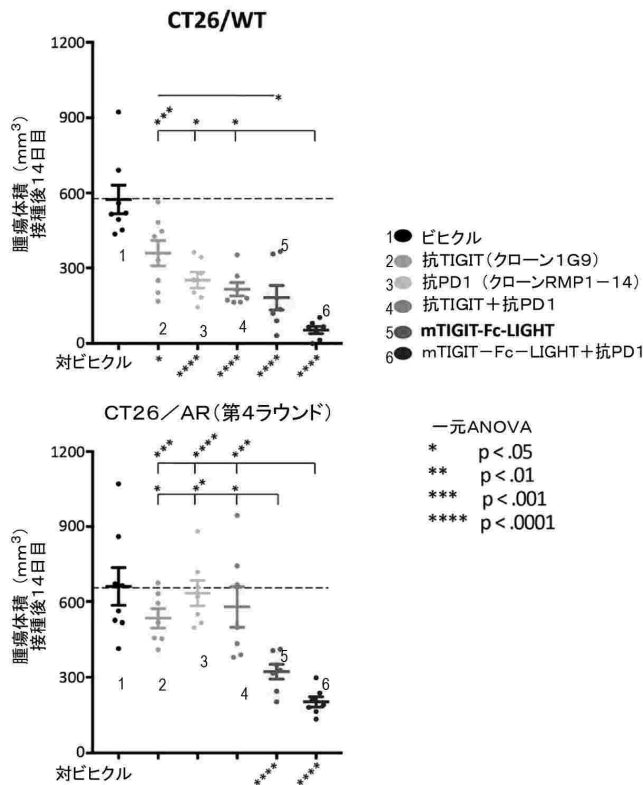
30

40

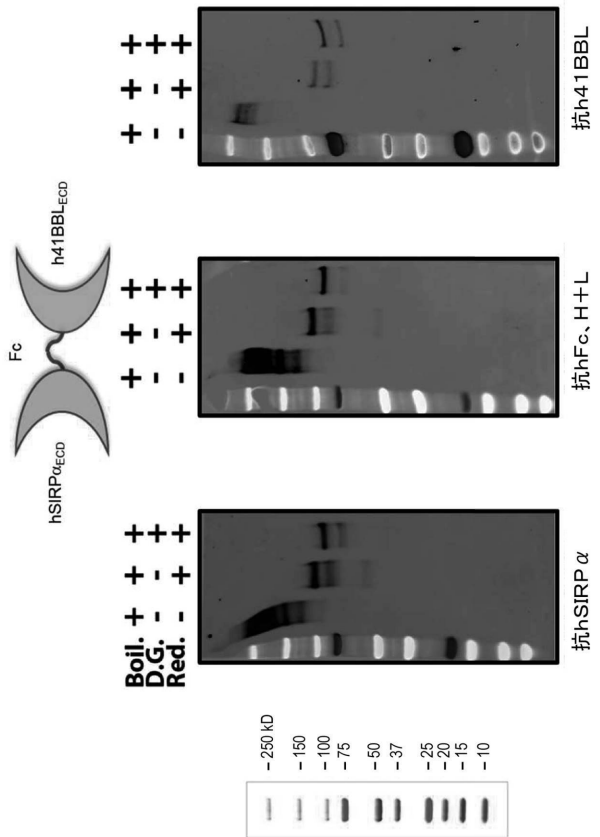
50

【図 15】

マウスTIGIT-Fc-LIGHTは
抗PD1/抗TIGIT CPIよりも優れる



【図 16】



10

20

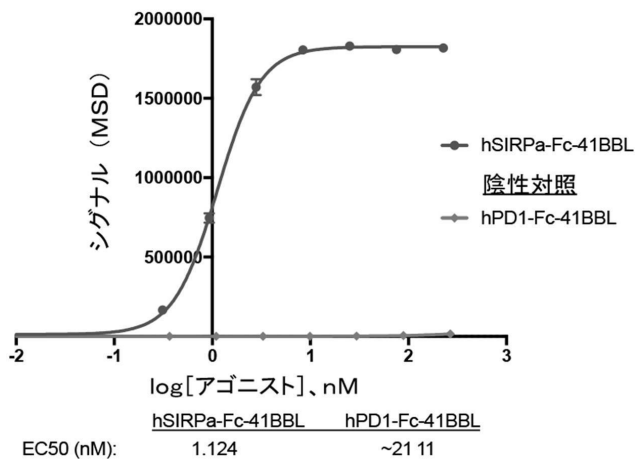
【図 17 A】

ヒトCD47結合アッセイ

コート : hCD47-His (Acro)

検出 : 抗SIRPα (R&D)

Sulfo : 抗ヒツジSulfo (MSD)



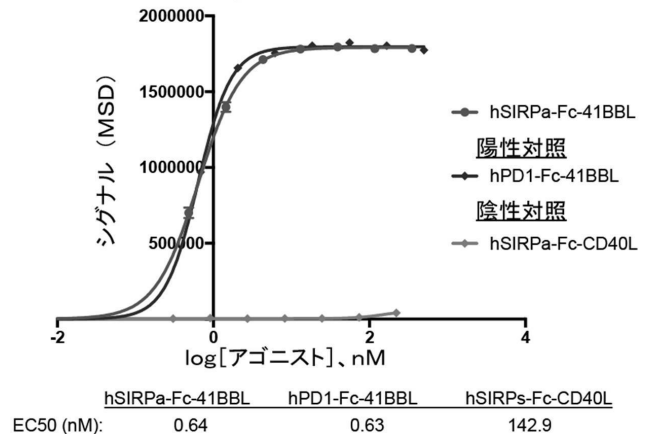
【図 17 B】

ヒト41BB結合アッセイ

コート : h41BB-His (R&D)

検出 : 抗41BBL (R&D)

Sulfo : 抗ヤギSulfo (MSD)



30

40

50

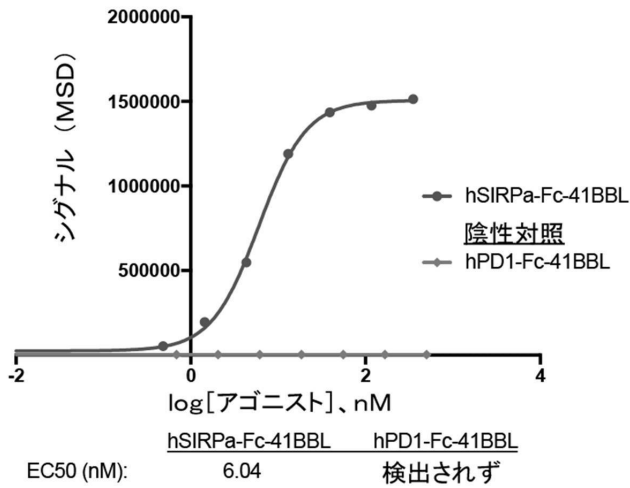
【図 17 C】

ヒトCD47／41BB二重結合アッセイ

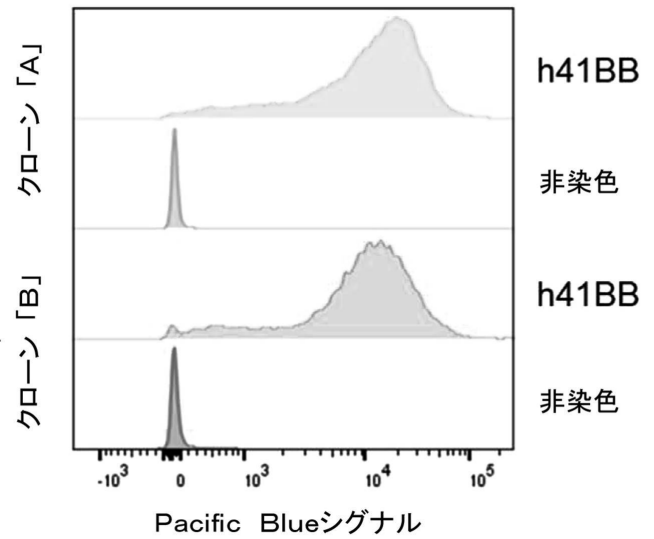
コート : h41BB-His (R&D)

検出 : 抗CD47-His、ビオチン (Acro)

Sulfo : ストレプトアビジンSulfo



【図 18 A】

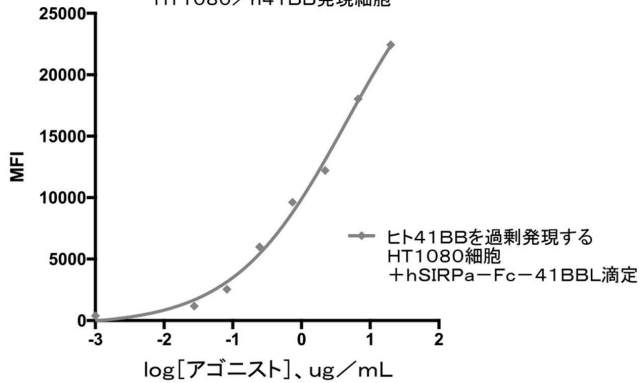


10

【図 18 B】

ヒト41BB細胞結合アッセイ

HT1080/h41BB発現細胞

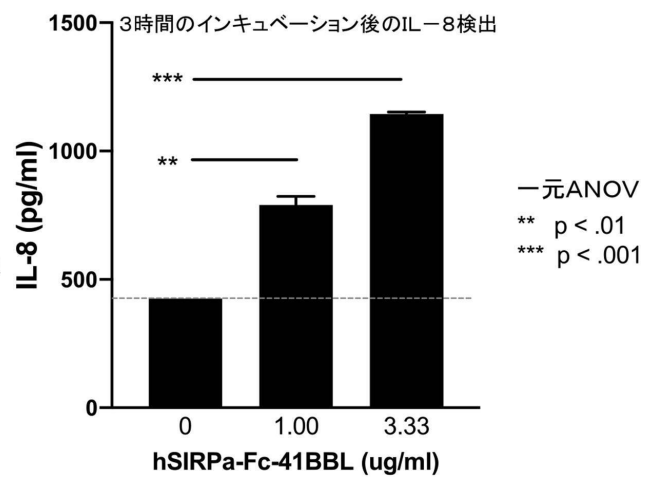


【図 18 C】

IL-8分泌アッセイ

ヒトHT1080/h41BB細胞

3時間のインキュベーション後のIL-8検出



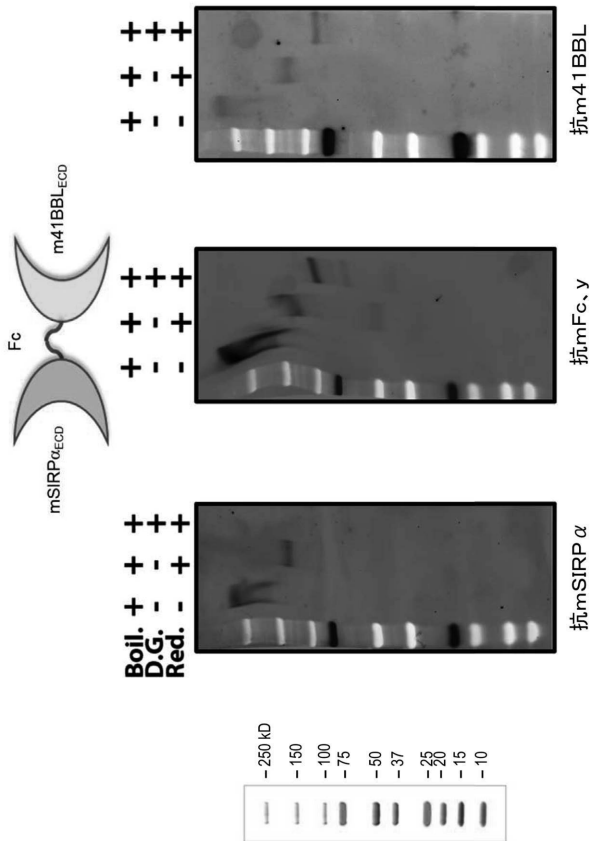
20

30

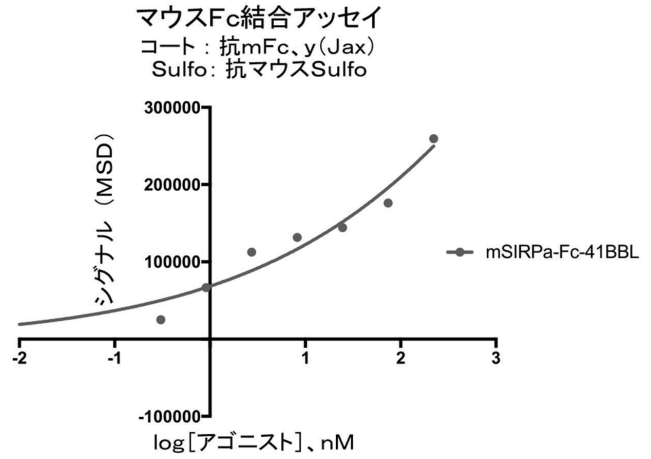
40

50

【図 19】



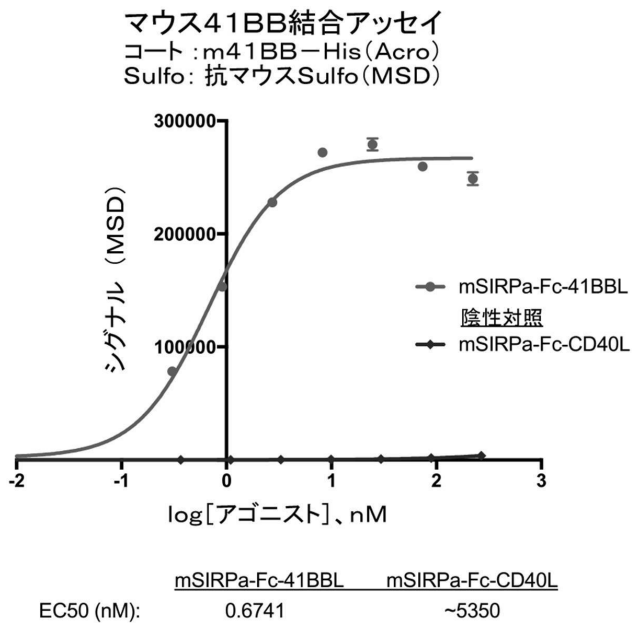
【図 20 A】



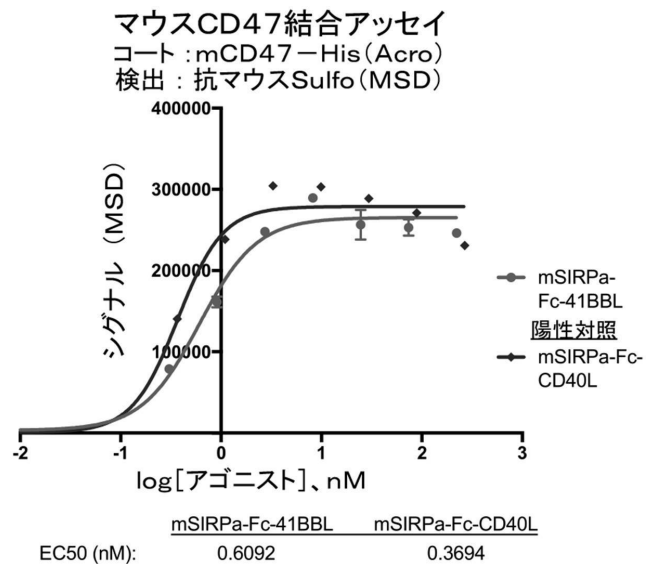
10

20

【図 20 B】



【図 20 C】

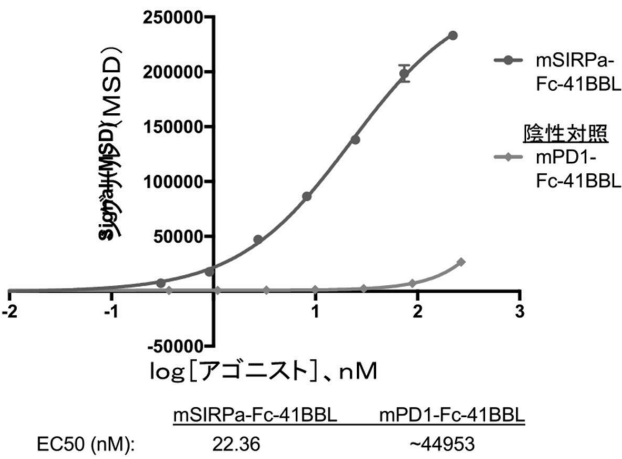


30

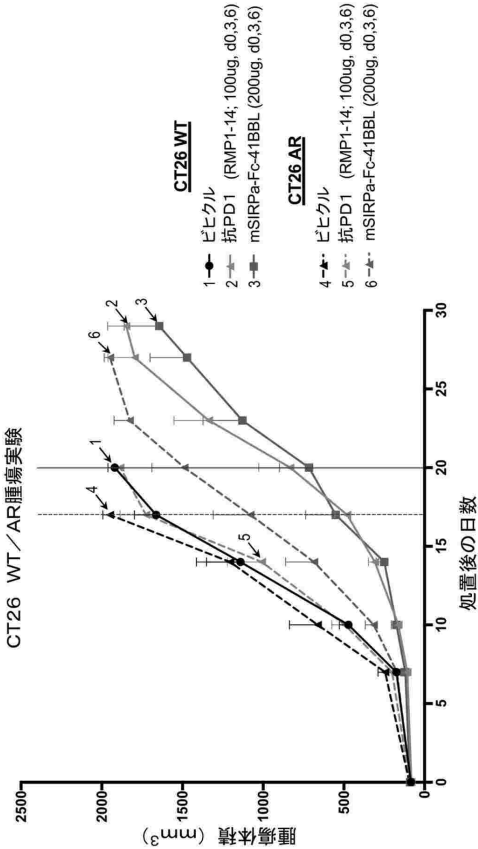
40

50

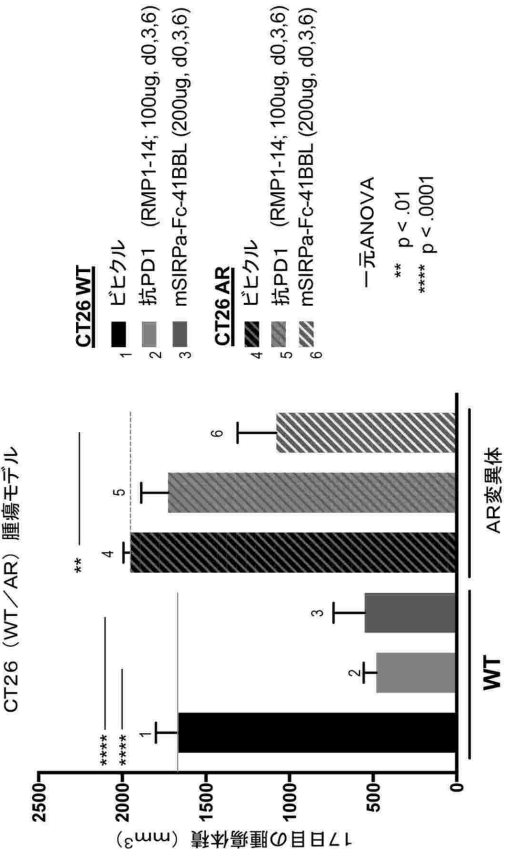
【図 2 0 D】
マウスCD47／41BB二重結合アッセイ
コート : mCD47-Fc(Acro)
検出 : m41BB-His(Acro)
Sulfo: 抗Hisビオチン+streptavidin Sulfo



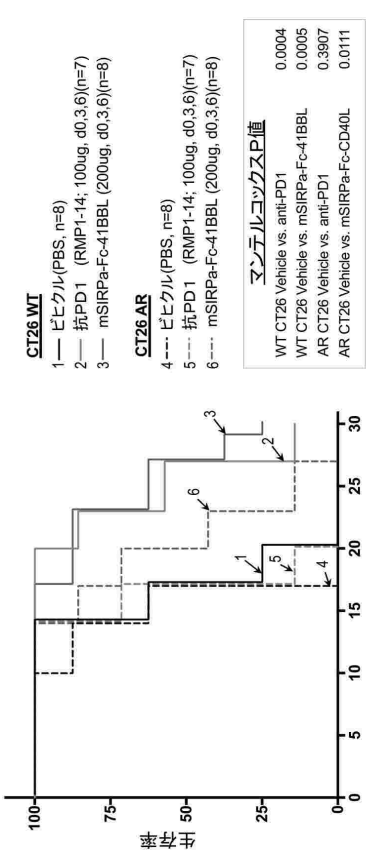
【図 2 1 A】



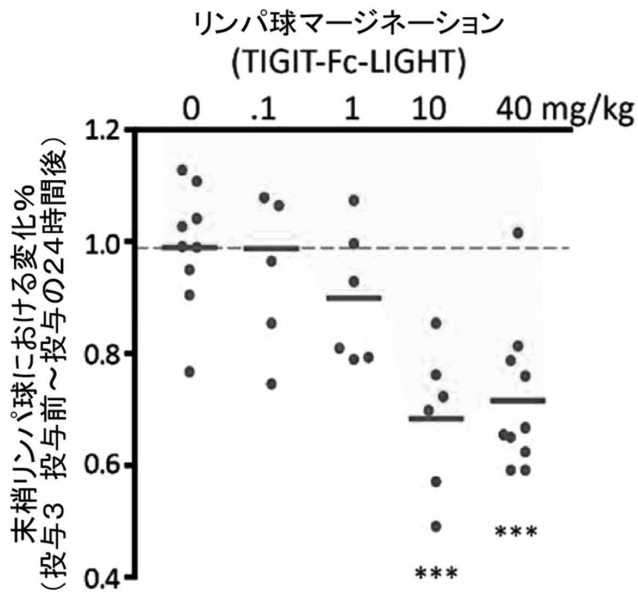
【図 2 1 B】



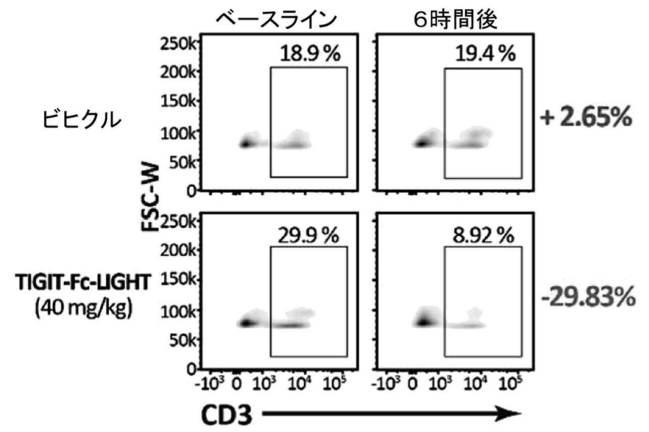
【図 2 1 C】



【図 2 2 A】

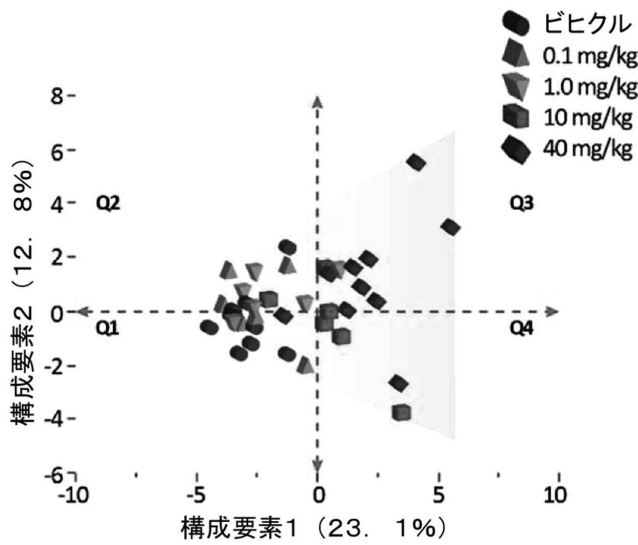


【図 2 2 B】

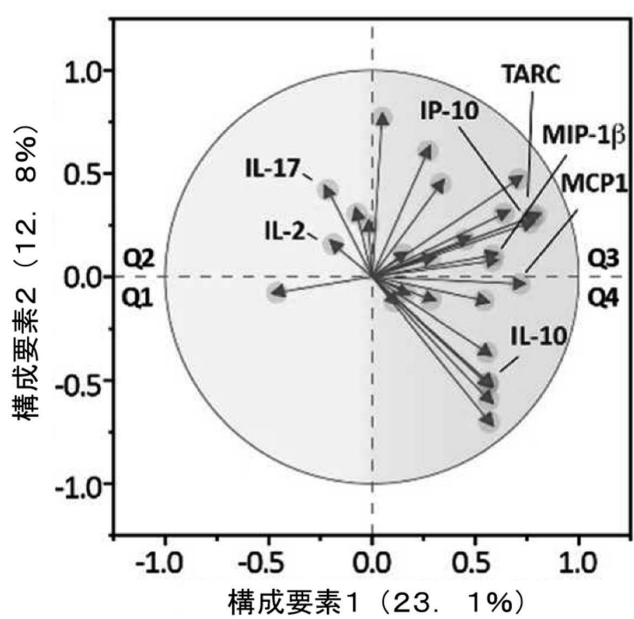


10

【図 2 2 C】



【図 2 2 D】



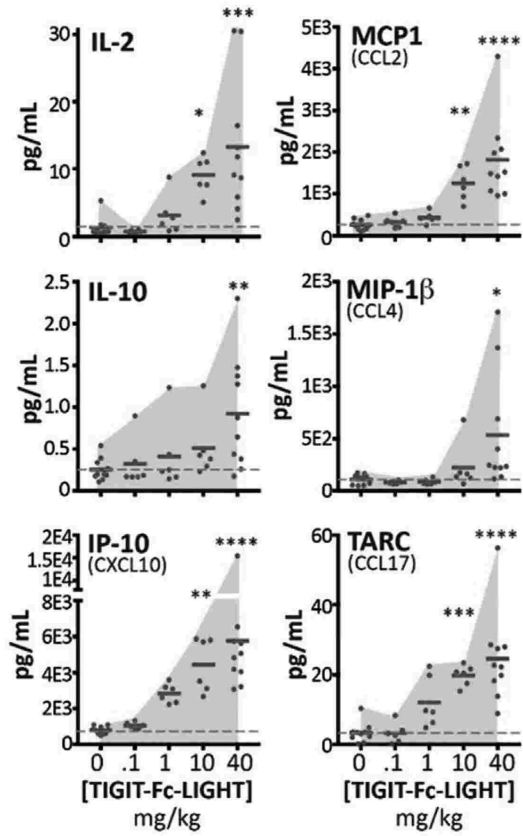
20

30

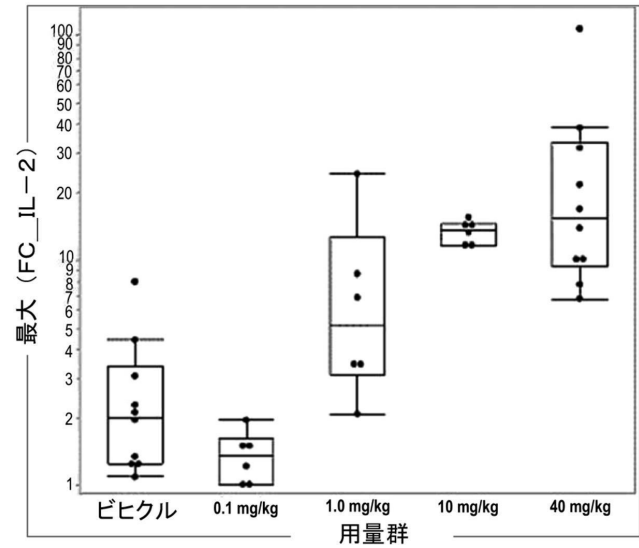
40

50

【図 2 2 E】



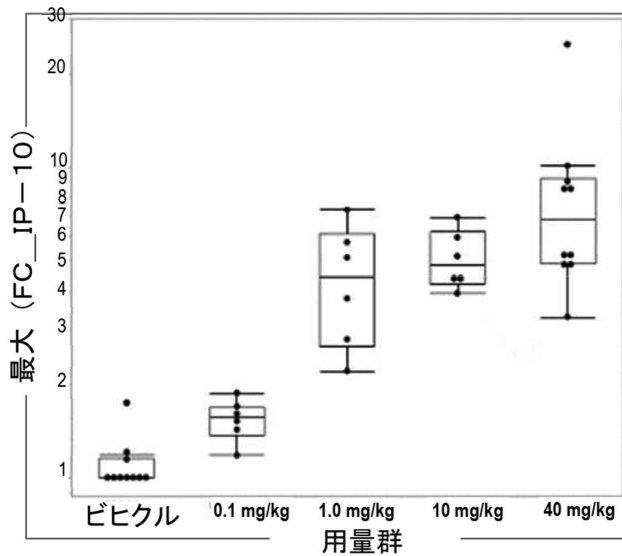
【図 2 2 F】



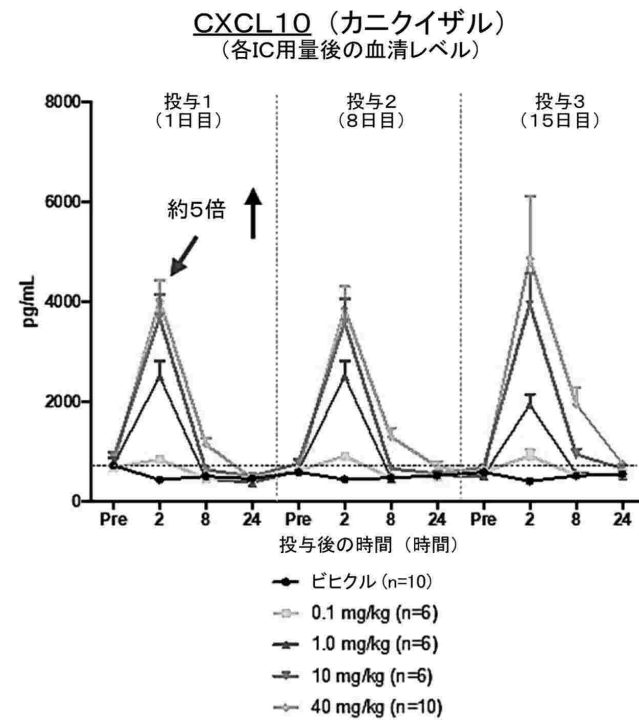
10

20

【図 2 2 G】



【図 2 2 H】

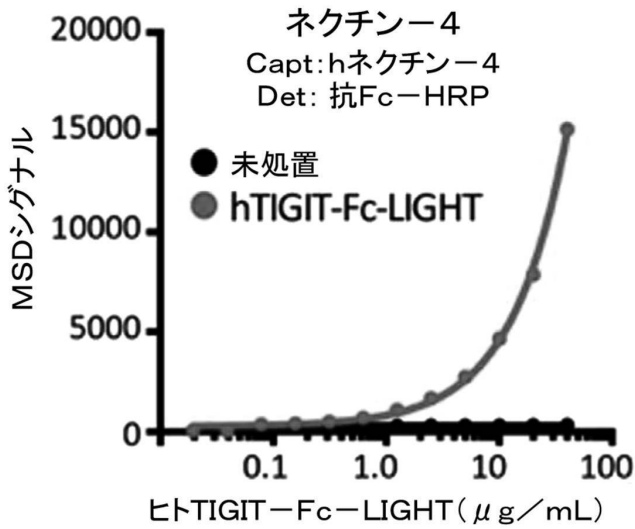


30

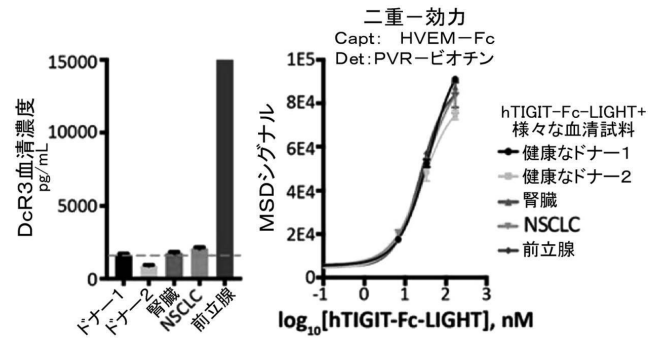
40

50

【図 2 4 B】

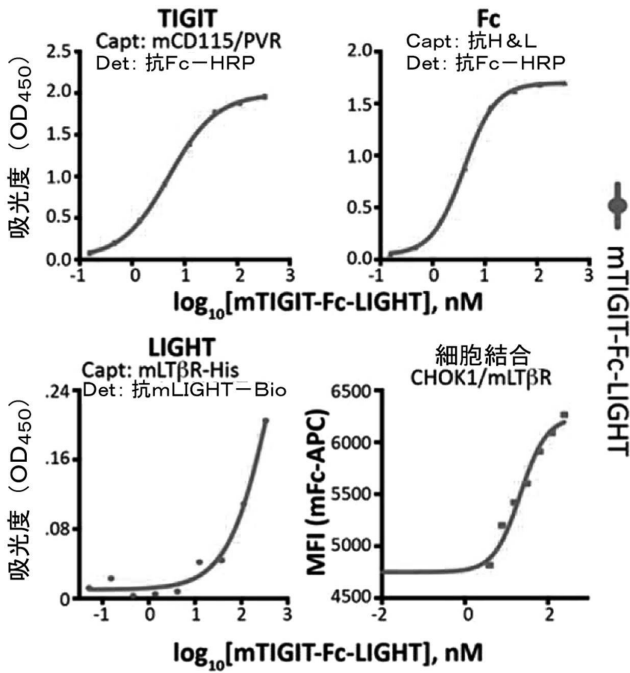


【図 2 4 C】

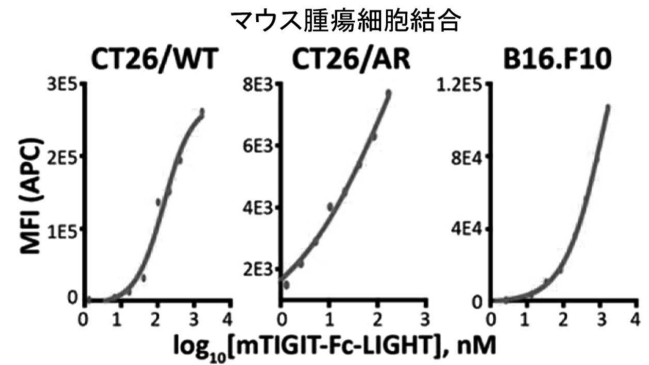


10

【図 2 4 D】



【図 2 4 E】



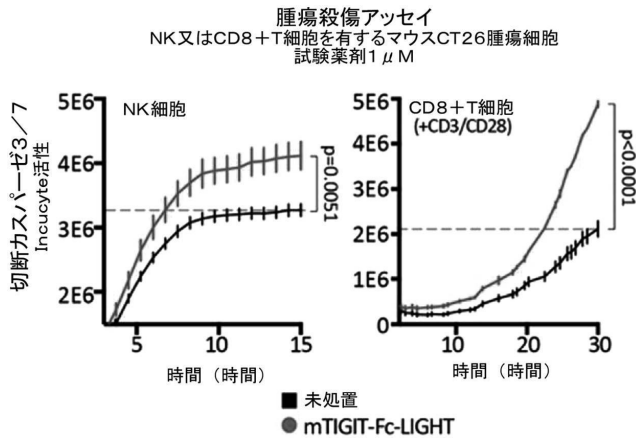
20

30

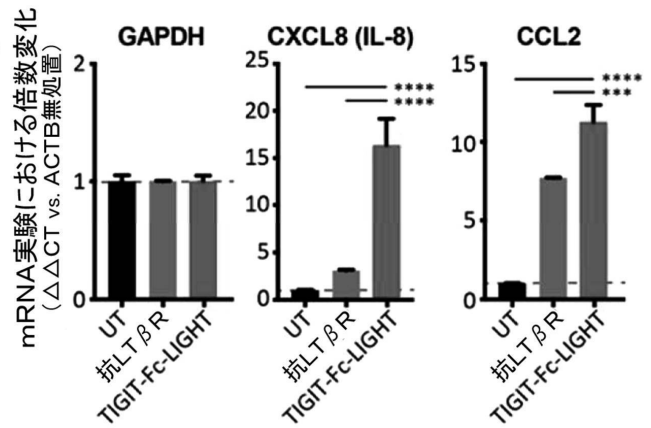
40

50

【図 2 4 F】

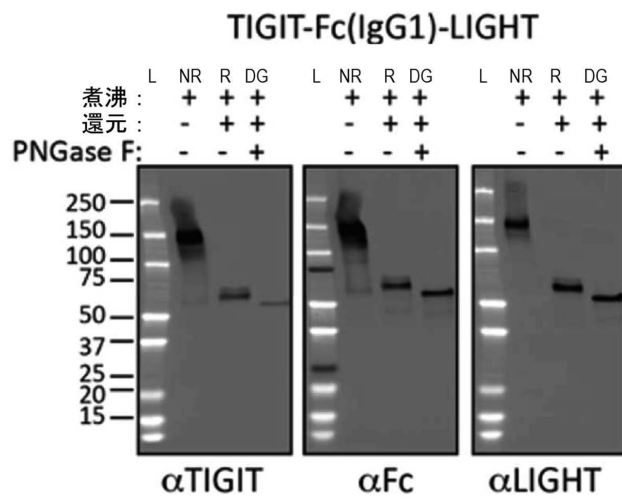


【図 2 4 G】

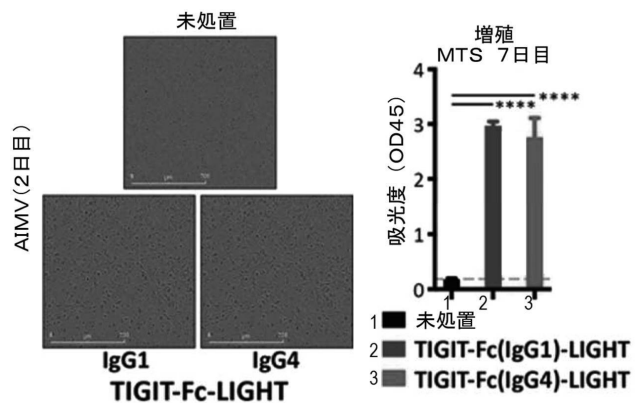


10

【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



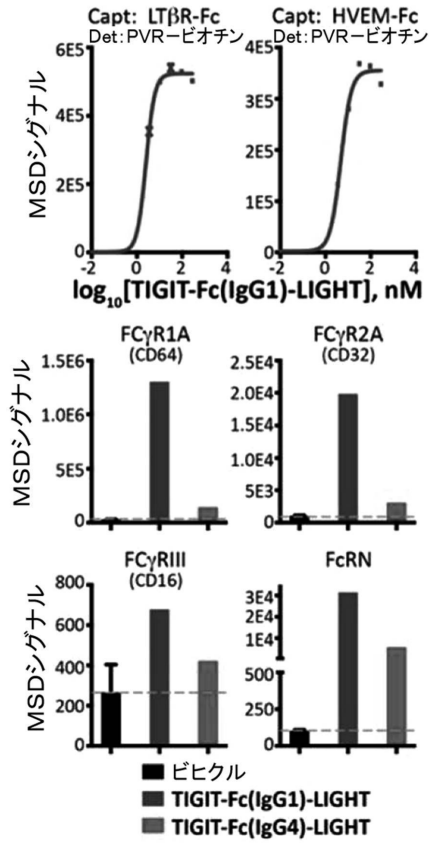
20

30

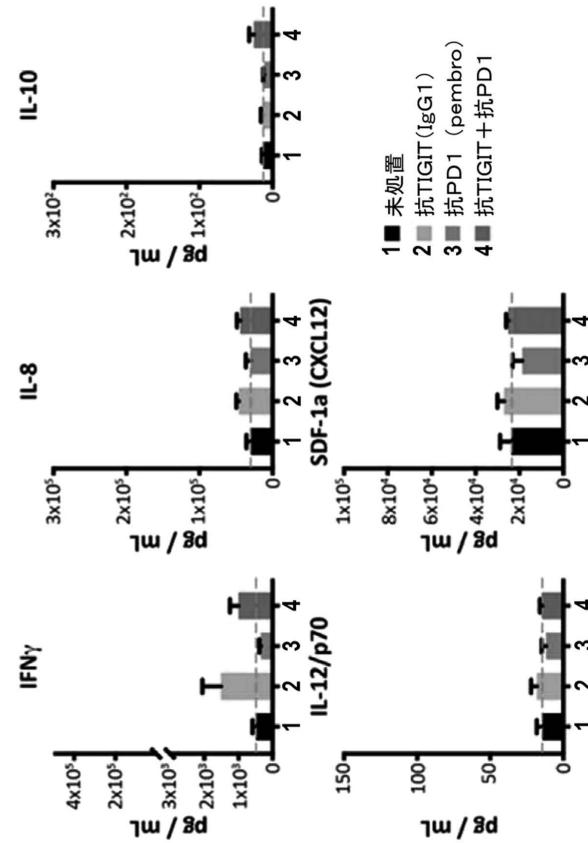
40

50

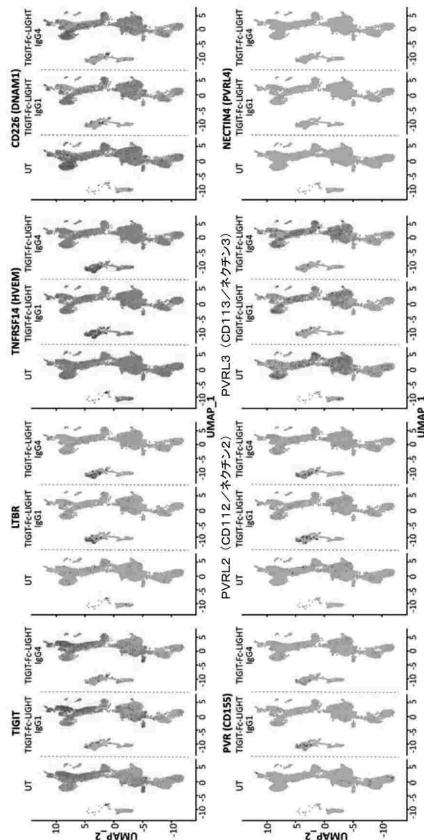
【図 2 5 C】



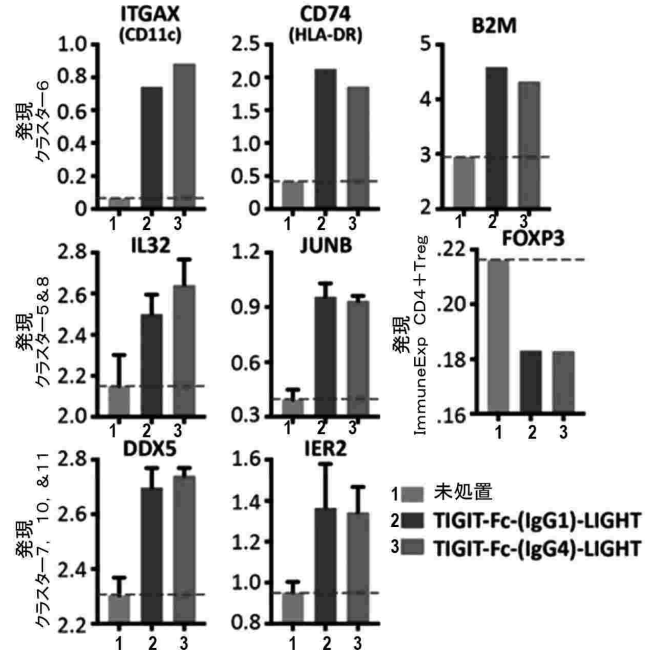
【図 2 5 D】



【図 2 5 E】



【図 2 5 F】



10

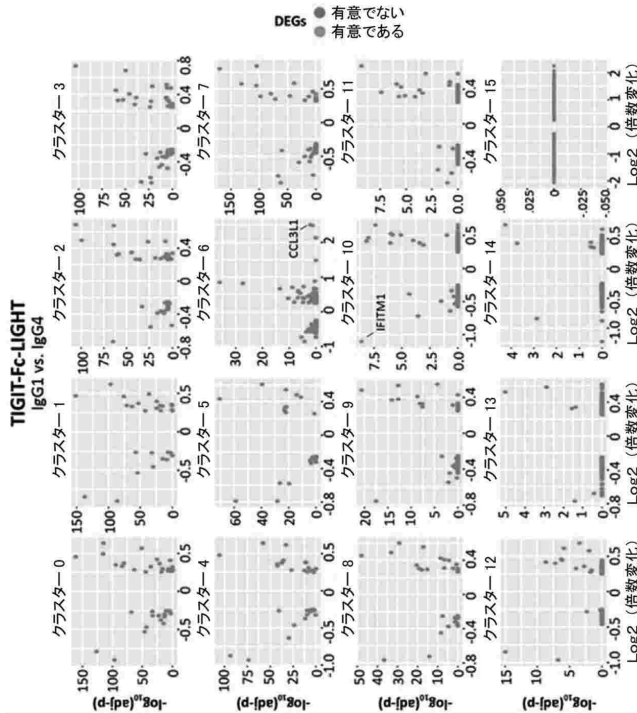
20

30

40

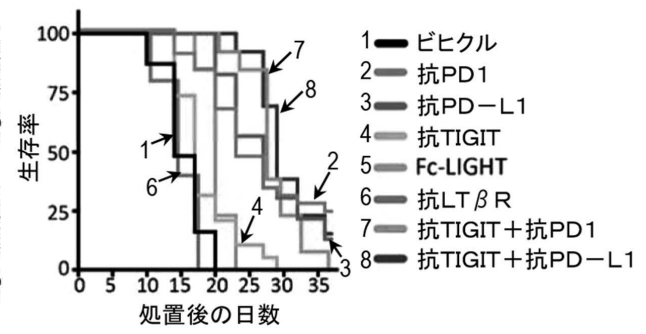
50

【図 2 5 G】



【図 2 6 A】

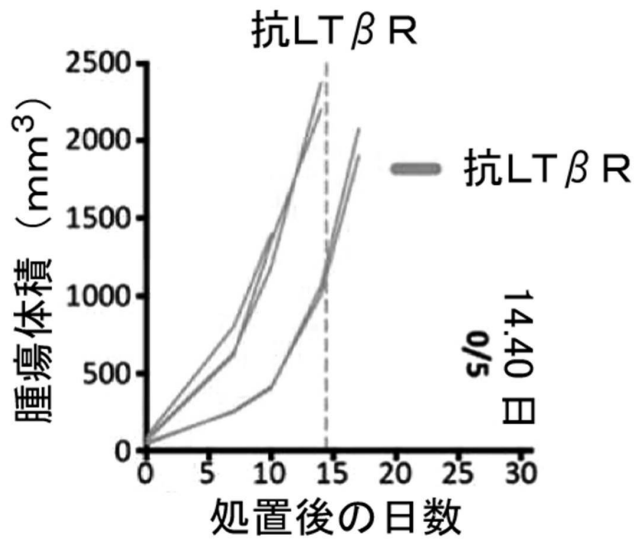
追加のCT26 WTデータ



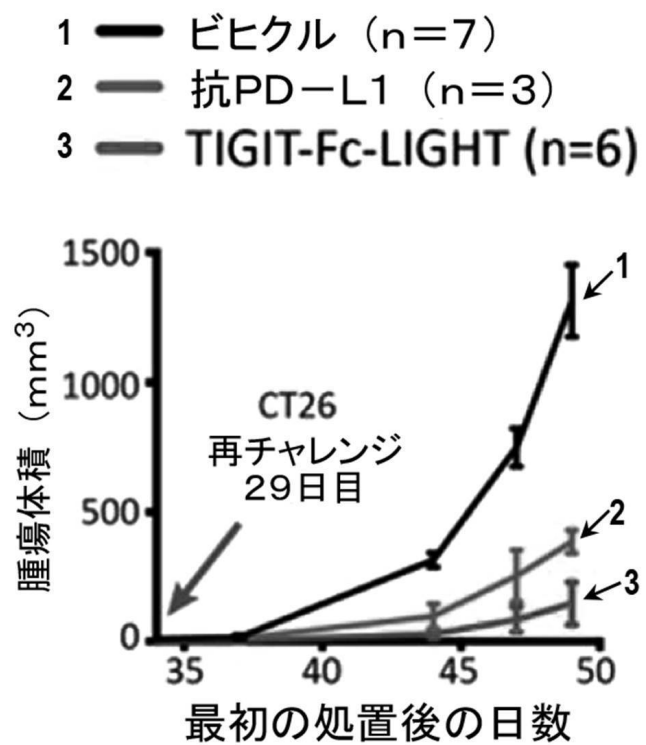
10

20

【図 2 6 B】



【図 2 6 C】

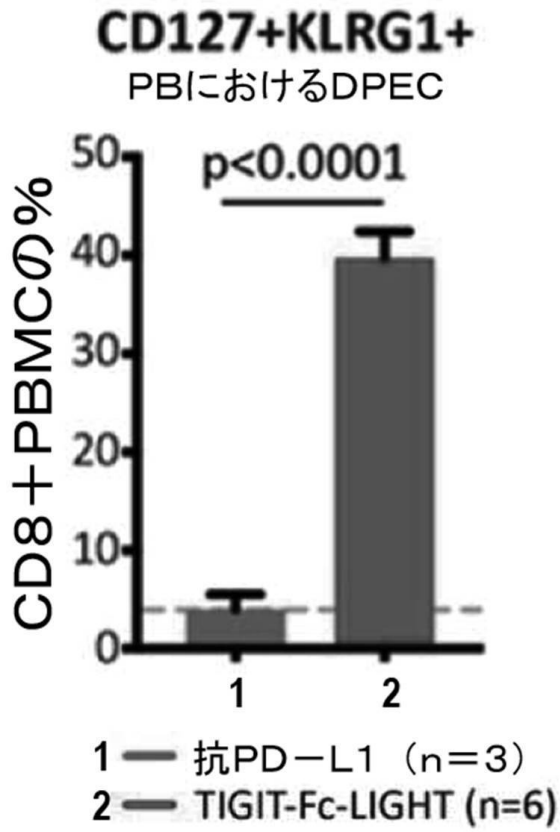


30

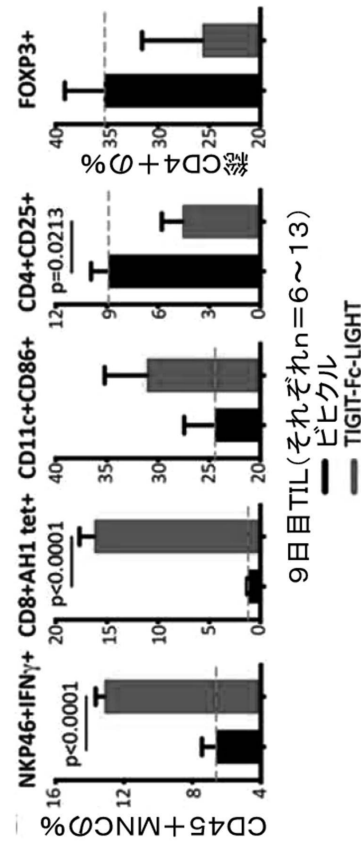
40

50

【図 2 6 D】



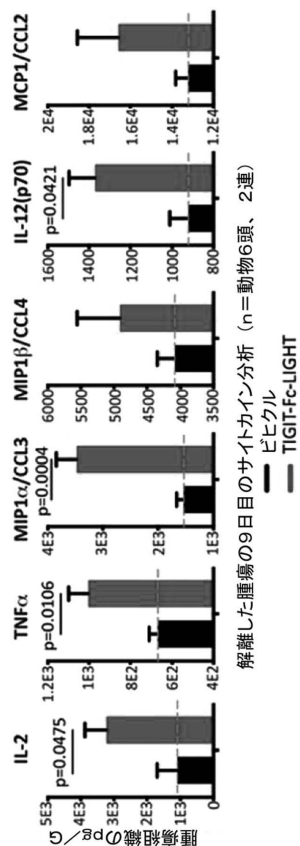
【図 2 6 E】



10

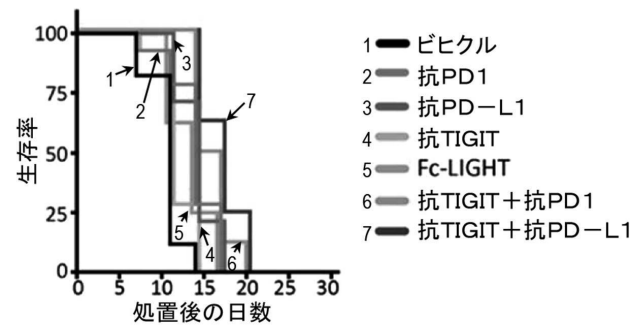
20

【図 2 6 F】



【図 2 6 G】

追加のB16. F10データ

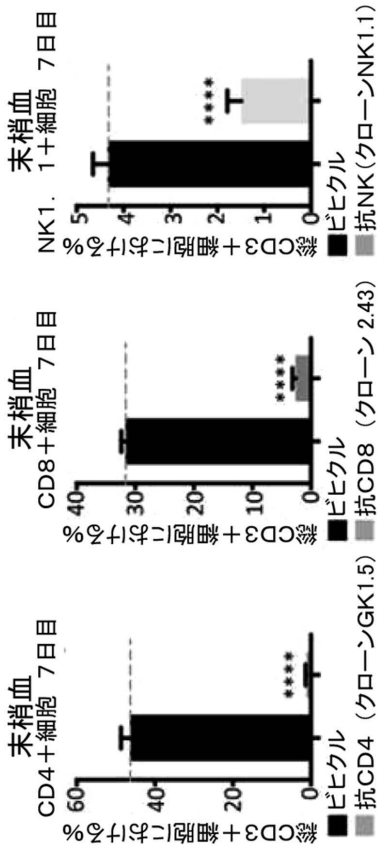


30

40

50

【図 2 6 H】

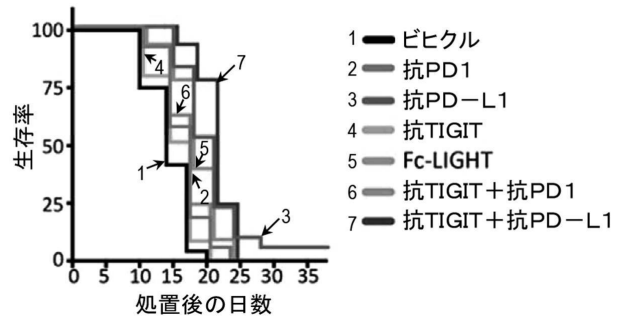


【図 2 7 B】

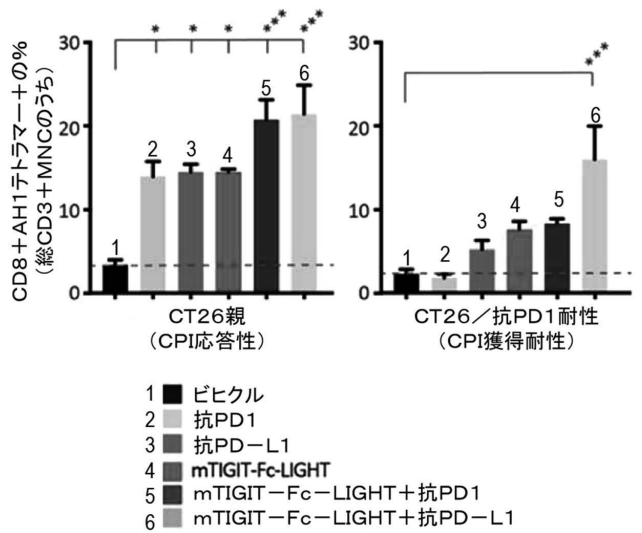
CD226 HVEM	BEVLWHTSVFPAENMSLECVFPMGILTOVEWFKIGTODSDIAIFSPTHGMVIRKPYAER	60 0
CD226 HVEM	VYFLNSTWASNNMTLFFRNASEDDVGYSCSLVTPQGTWQKVI-----OVVQS	109 33
CD226 HVEM	DSFEAAVPSNSHIVSEPGKNTLTCQPMTPVQAVRNKIQPRQIDLLTYCNLVHGRNF	169 74
CD226 HVEM	TSKFPFQIVNSCHGRWSVIVIPDVT-----	195 131
CD226 HVEM	V-SDSGLYRCYLQASAGENETFMRLTVAEGKTDNQITLTVAGGTVLLLLFVSIITIV	254 184
CD226 HVEM	IFLNRRRRRRDLFTESMDTKQAPNNYRSPISTQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFSRRP	314 242
CD226 HVEM	ICVK--RRKPRGVDVIVSVQRKQAEATVIEALQAPDPVTTVAVEETIPSTGRS	
	KTRV 318	
	PNH- 245	
	細胞質ドメイン	

【図 2 7 A】

追加のCT26 ARデータ



【図 2 7 C】



10

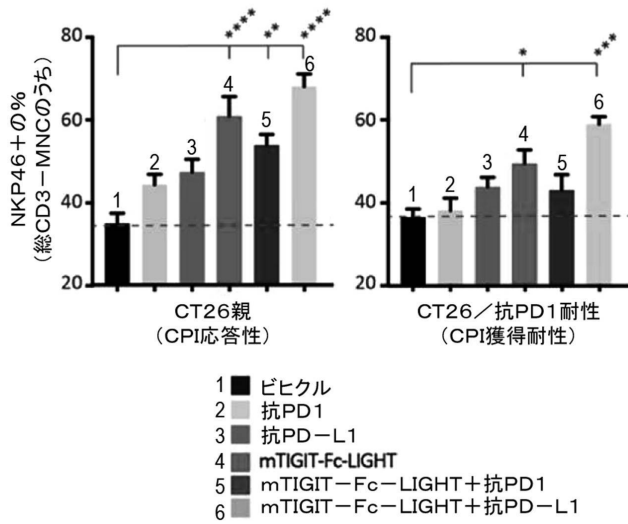
20

30

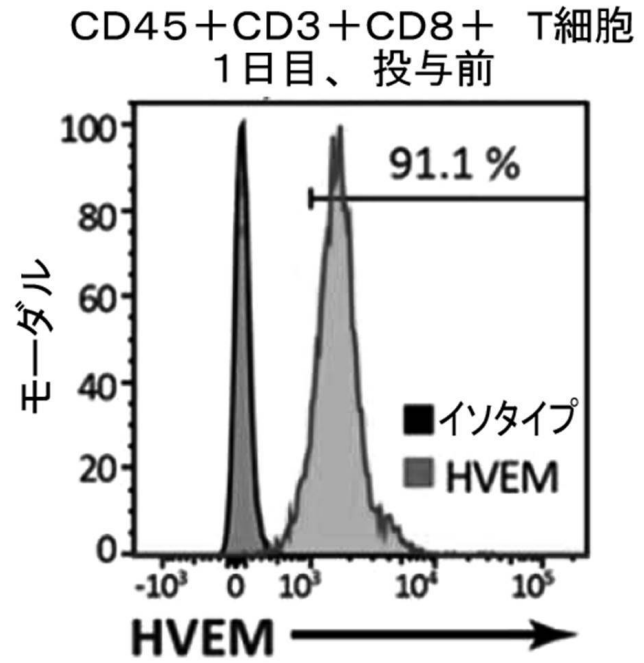
40

50

【図 27 D】



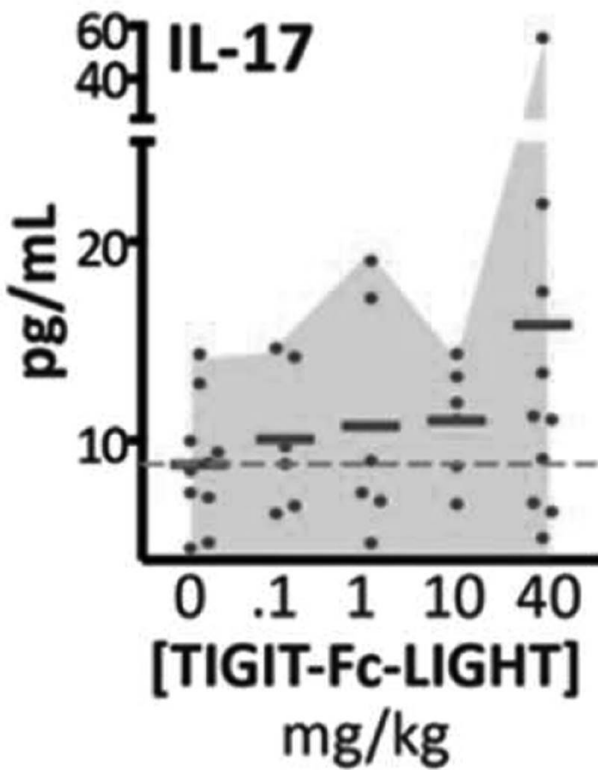
【図 28 A】



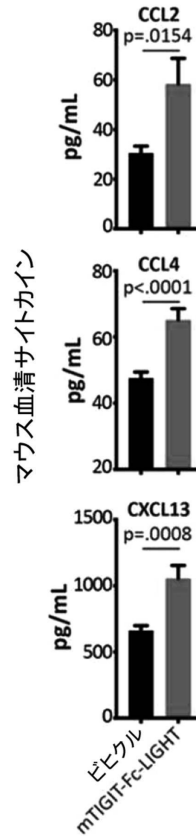
10

20

【図 28 B】



【図 28 C】



30

40

50

【配列表】

2024500065000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/061841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(B) - A61K 38/17; C07K 14/405; C07K 14/525 (2022.01)
CPC - A61K 38/17; C07K 14/405; C07K 14/525 (2022.02)

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	US 2020/0071380 A1 (SHATTUCK LABS INC) 05 March 2020 (05.03.2020) entire document	1-6, 9-11
A	WO 2017/068180 A1 (APOGENIX AG) 27 April 2017 (27.04.2017) entire document	1-6, 9-11
A	WO 2020/176718 A1 (SHATTUCK LABS INC) 03 September 2020 (03.09.2020) entire document	1-6, 9-11

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

29 March 2022

Date of mailing of the international search report

APR 12 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/061841

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.: 7, 8, 12-38, 42-63, 60-85, 87-106, 112-133, 138-157
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see extra sheet(s).

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.:
1-6, 9-11

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/US2021/061841

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 need to be paid.

Group I+: claims 1-6, 9-11, 39-41, 54-59, 86, 107-111, and 134-137 are drawn to chimeric proteins and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to a chimeric protein having a general structure of: N terminus - (a) - (b) - (c) - C terminus, (a) is a first domain; (b) is a linker adjoining the first and second domains, and (c) is a second domain, where the first domain (a) is selected to be SEQ ID NO:10, the linker (b) is selected to be SEQ ID NO:46, and the second domain (c) is selected to be SEQ ID NO:2, and methods comprising the same. It is believed that claims 1-6 and 9-11 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOS: 2, 10, and 46.

Applicant is invited to elect additional chimeric proteins, genes, and/or pathways, and their respective, corresponding, SEQ ID NOS to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a chimeric protein having a general structure of: N terminus - (a) - (b) - (c) - C terminus, (a) is a first domain; (b) is a linker adjoining the first and second domains, and (c) is a second domain, where the first domain (a) is selected to be SEQ ID NO:10, the linker (b) is selected to be SEQ ID NO:47, and the second domain (c) is selected to be SEQ ID NO:2, and methods comprising the same. Additional chimeric proteins, genes, and/or pathways, and their respective, corresponding, SEQ ID NOS will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating cancer, requiring the selection of alternative chimeric proteins where "wherein the linker comprises an amino acid sequence that is at least 95%, or at least 96%, or at least 97%, or at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 112, or SEQ ID NO: 113."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a method for treating a cancer in a subject in need thereof the method comprising a step of administering to the subject an effective amount of a chimeric protein having a general structure of: N terminus - (a) - (b) - (c) - C terminus, (a) is a first domain; (b) is a linker adjoining the first and second domains, and (c) is a second domain, wherein the dose of the chimeric protein administered is between about 0.0001 mg/kg and about 50.0 mg/kg; a method for inducing lymphocyte expansion in a subject in need thereof; a method of evaluating the efficacy of a cancer treatment in a subject in need thereof; (ii) obtaining a biological sample from the subject; (iii) performing an assay on the biological sample to determine level and/or activity of a cytokine; and (iv) continuing dosing if the subject has an increase in the level and/or activity of at least one cytokine; a method of selecting a subject for treatment with a therapy for cancer; a method of determining a cancer treatment for a patient, the method comprising: (i) obtaining a biological sample from a subject; (ii) evaluating the sample for the upregulation of one or more genes associated with a gene ontology (GO) pathway and/or downregulation of one or more genes associated with a gene ontology (GO) pathway; (iii) selecting the cancer therapy based on the evaluation of step (b); wherein the cancer is or is believed to be resistant to an anti-checkpoint agent having an ability to inhibit function and/or activity of PD-1, PD-L1 and/or PD-L2; a method of treating cancer, the method comprising: (i) obtaining a biological sample from a subject; (ii) evaluating the biological sample for the expression of: (i) a gene. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2020/0071380 A1 to Shattuck Labs Inc. discloses a method for treating a cancer in a subject in need thereof (a method for treating a cancer in a subject in need thereof, Para. [0006]) the method comprising a step of administering to the subject an effective amount of a chimeric protein having a general structure of: N terminus - (a) - (b) - (c) - C terminus, (a) is a first domain; (b) is a linker adjoining the first and second domains, and (c) is a second domain (a heterologous chimeric protein comprising: (a) a first domain ... (b) a second domain ... and (c) a linker linking the first domain and the second domain, Para. [0006]; administering a pharmaceutical composition comprising a chimeric protein, Para. [0060]), wherein the dose of the chimeric protein administered is between about 0.0001 mg/kg and about 50.0 mg/kg (and/or chimeric protein used in methods of the present invention (and/or additional agents) is in a range of about 0.01 mg/kg, Para. [0502]); a method for inducing lymphocyte expansion in a subject in need thereof (a method for treating a cancer in a subject in need thereof, Para. [0006]; both agents expanded CD40+dendritic cells/B cells and CD3+ T cells, Para. [0584]).

Further, WO 2020/176718 A1 to Shattuck Labs Inc. a method of evaluating the efficacy of a cancer treatment in a subject in need thereof (a method for evaluating the efficacy of cancer treatment in a subject in need thereof, Pg. 5, Lns. 4-5); (ii) obtaining a biological sample from the subject (obtaining a biological sample from the subject, Pg. 5, Ln. 12); (iii) performing an assay on the biological sample to determine level and/or activity of a cytokine (performing an assay on the biological sample to determine level and/or activity, Pg. 5, Lns. 12-13; levels of cytokine production, Pg. 31, Ln. 28); and (iv) continuing dosing if the subject has an increase in the level and/or activity of at least one cytokine (continuing administration of the heterologous chimeric protein if the subject has an increase in the level and/or activity, Pg. 5, Lns. 13-14; levels of cytokine production, Pg. 31, Ln. 28); a method of selecting a subject for treatment with a therapy for cancer (the methods of selecting a subject for treatment with a therapy for a cancer disclosed herein, Pg. 81, Lns. 31-32); a method of determining a cancer treatment for a patient (the methods of selecting a subject for treatment with a therapy for a cancer disclosed herein, Pg. 81, Lns. 31-32), the method comprising: (i) obtaining a biological sample from a subject (obtaining a biological sample from the subject, Pg. 5, Ln. 12); (ii) evaluating the sample for the upregulation of one or more genes associated with a gene ontology (GO) pathway and/or downregulation of one or more genes associated with a gene ontology (GO) pathway; (iii) selecting the cancer therapy based on the evaluation of step (b) (performing an assay on the biological sample to determine level and/or activity, Pg. 5, Lns. 12-13; levels of cytokine production, Pg. 31, Ln. 28; TIGIT upregulation is thought to be one compensatory checkpoint mechanism observed in tumors refractory to anti-PD-1 therapies, Pg. 80, Lns. 2-3); wherein the cancer is or is believed to be resistant to an anti-checkpoint agent having an ability to inhibit function and/or activity of PD-1, PD-L1 and/or PD-L2 (the subject is refractory to a PD-1 and/or PD-L1 and/or PD-L2 agent, including, for example, nivolumab, Pg. 32, Lns. 30-31) (i) evaluating the biological sample for the expression of: (i) a gene (performing an assay on the biological sample to determine level and/or activity, Pg. 5, Lns. 12-13; levels of...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/061841

...cytokine production, Pg. 31, Ln. 28; TIGIT upregulation is thought to be one compensatory checkpoint mechanism observed in tumors refractory to anti-PD-1 therapies, Pg. 80, Lns. 2-3).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 4 5 A	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 7 5	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 0 7 K 14/725	
	C 0 7 K 16/00	
	C 0 7 K 16/24	
	C 1 2 Q 1/6876 Z	

(32)優先日 令和3年4月9日(2021.4.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/121,083

(32)優先日 令和2年12月3日(2020.12.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

5 0 0、スイート 1 2 0 0 シャタック ラボ, インコーポレイテッド 内

(72)発明者 デ シルヴァ, スレシュ

アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス オースティン、ウェスト 5 ストリート 5 0 0、スイート 1 2 0 0 シャタック ラボ, インコーポレイテッド 内

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR55
QR62 QS24 QS28 QS32 QX01
4C084 AA02 BA01 BA41 CA59 DA26 DA45 NA05 NA14 ZB071 ZB072
ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC75
4C085 AA14 BB01 CC23 EE03
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 EA50
FA74